

E-cadherin és simaizom aktin prognosztikai jelentősége bőrmelanomák kórszövettani diagnózisában

Varo Enikő¹, Egyed-Zsigmond Imre²

¹Bőrgyógyászati Szakrendelő, Marosvásárhely, ²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Patológia Tanszék

Semnificația prognostică a E-caderinei și a actinei musculare netede în diagnosticul histopatologic al melanoamelor maligne cutanate

Studiul molecular al tumorilor maligne a adus informații prețioase în evaluarea prognostică a acestora. Proteinele care joacă rol în tranziția epitelio-mezenchimală, prin care tumora începe să se diseminaze, sunt și cele din familia caderinelor. Actina musculară netedă (SMA) în schimb marchează nu numai celulele mioepiteliale stromale, dar și pe cele care și-au schimbat markerii epiteliali cu cei mezenchimali. Cu ajutorul unei metode morfometrice asistată de calculator, am studiat expresia E-caderinei și a SMA în melanoamele maligne într-un număr de 25 cazuri. Relația dintre invazivitatea melanoamelor și scăderea expresiei e-caderinei și a creșterii expresiei SMA pare să fie constantă, conferind acestor examinări o importanță prognostică.

Cuvinte cheie: E-caderina, actina musculară netedă (SMA), melanoame maligne (MM)

Prognostic significance of E-cadherine and smooth muscle-associated antigen in cutaneous malignant melanomas

The molecular study of malignant cutaneous tumours brings important information to help their prognostic evaluation. Proteins that mediate the epithelial-mesenchymal transition, the process by which a cancer cell disengages from its parent tumour, are important candidates like E-cadherine. The presence of smooth muscle-associated antigen (SMA) probably corresponds to cellular microfilaments. SMA is an important marker of the mesenchymal cells derived from the epithelial cells. The study was effectuated by immunohistochemical coloration and by computer assisted morphometric methods, for quantitative evaluation of E-cadherine and SMA in 25 cases of malignant melanomas. The relationship between melanomas and decreased level of the E-cadherins or increased level of the SMA is a very important constant for prognostic importance.

Keywords: E-cadherine, smooth muscle-associated antigen (SMA), malignant melanomas (MM)

Orvostudományi Értesítő, 2010, 83 (1): 126-129

www.orvtudert.ro

A rosszindulatú daganatok molekuláris vizsgálata értékes adatokkal szolgál a betegség kimentele szempontjából. A hám-mesenchyma átalakulásban (Epithelial-Mesenchymal Transition=EMT) fontos szerepet játszó fehérjék különleges csoportját képezik az E-cadherinek, amelyek ép szerkezettel biztosítják a hámsejtek szoros összekapcsolódását. Daganatos átalakulás esetén szerkezetük és antigenitásuk megváltozik, a sejtek összetapadása csökken és lehetővé válik tovább sodródásuk. A simaizom aktin (SMA) nevű citoskeletális fehérje, ahogy neve is mutatja simaizom sejtekben, mioepithelialis sejtekben, mesenchyma eredetű vagy mesenchyma tulajdonságot nyert sejtekben is kimutatható. Minél több daganatos hámsejt alakul át mesenchymalis sejté, annál nagyobb lesz az SMA mennyisége a daganatsejtek citoplazmájában. Az E-cadherin és a simaizom aktin mennyiségi meghatározását végeztük 25 malignus melanoma szöveteiben, immunhisztokémiai és kvantitatív képfeldolgozás módszerével. A melanoma malignum (MM) invazivitását jelző stádiumbeosztással párhuzamosan csökkent az E-cadherin, ill. növekedett az SMA-pozitív felület a megvizsgált metszetekben, ami prognosztikai jelentőséget kölcsönöz ezen két fehérje kimutatásának.

Anyag és módszer

25 bőrmelanoma kórszövettani tulajdonságait vizsgáltuk, immunhisztokémiai módszerrel jelölve az E-cadherin és SMA fehérjéket. Minden egyes formalinban rögzített, paraffinba ágyazott és H-E festett mintán értékeltük a Clark-szintet és megmértük a daganatvastagságot (Breslow), leírtuk a kifeléyesedés ill. esetleges szatellitgócok jelenlétét. Az immunhisztokémiai reakciókhoz két ellenanyagot használtunk: E-cadherin-t (Ab-4-clone NCH-38, Thermo Fisher Scientific Anatomical Pathology, Fremont, USA. Mouse monoclonal antibody. Cellular localisation: cell membrane) és SMA-t (Ab-1-1A4-msa-1, Thermo Fisher Scientific Anatomical Pathology, Fremont, USA. Mouse polyclonal antibody. Cellular localisation: cytoplasmic.). A megjelölt fehérjéket tartalmazó készítményekből MiraxScan (Carl Zeiss, Jena) készülékekkel és MiraxScan számítógépes program segítségével digitális metszeteket készítettünk. A digitális metszetekből a Panoramic Viewer 1.14.25.1 (3DHistech, Budapest) program segítségével esetenként 5 hot spot felvételt készítettünk 10x objektívvel. Ez összesen 125 JPG formátumú digitális képet eredményezett. A digitális képfeldolgozást a NIH (National Institutes of Health, AEÁ) munkatársa, Wayne Rasban által kifejlesztett ImageJ nevű programmal végeztük [10], egy Sony Vaio VGN A-150 hordozható számítógépen (Intel Pentium Centrino 1,6 Ghz, 512Mb RAM), amelyen Windows XP (SP2) operá-

Dr. Varo Enikő

540139 Marosvásárhely - Târgu Mureș

Gh. Marinescu 50

E-mail: varo_eniko@yahoo.com

ciós rendszer futott. Feldolgozásra alkalmasnak azokat a látótereket tartottuk, amelyeknél jól kivehető pozitív sejtcsoportok és szövetstruktúrák látszottak. Pozitívnak azokat a daganatsejteket tekintettük amelyek sejthártyája, ill. citoplazmája sötétbarna volt. A metszetekről készült digitális képek számos főleges szerkezeti információt tartalmaztak, amelyek zavaró hatását kivágásukkal (Edit > Clear outside) szüntettük meg, megjelölve a vizsgálandó területet (a program Polygon tool eszközének segítségével). Az így előkészített (1. ábra) 125 digitális képet morfometriai módszerrel elemeztük [10].

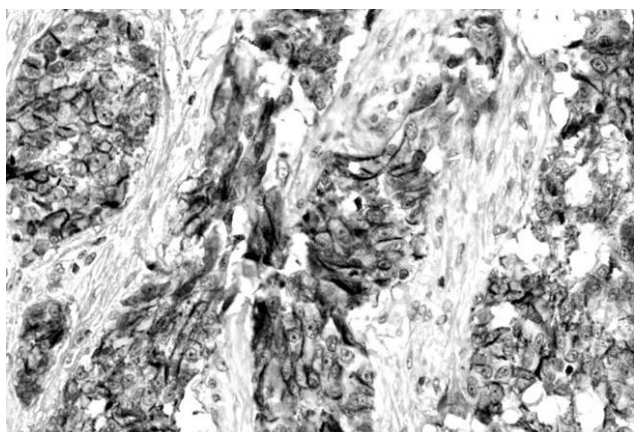
Eredmények

A kapott adatok a különböző színű pixelek számolásával a pozitív immunreakciót mutató felszín arányát jelentik az egész értékelt felszínhez viszonyítva. Tulajdonképpen egy E-cadherin és egy SMA felszín-arányt kaptunk minden

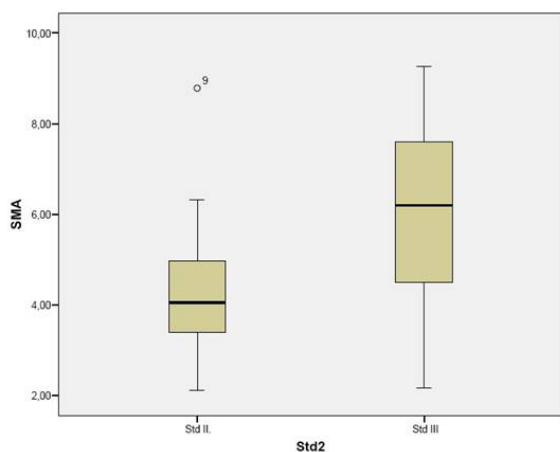
mért *hot spot* gócból. Az öt mért értékből minden esetben középértéket számoltunk és azokat táblázatba foglaltuk (1. táblázat)

Adatainkat statisztikai módszerrel vizsgálva az E-cadherin esetén sikerült bizonyítani a nemparaméteres Mann-Whitney-tesztel, hogy szignifikáns különbség van a II és III stádiumok között ($p=0,009$).

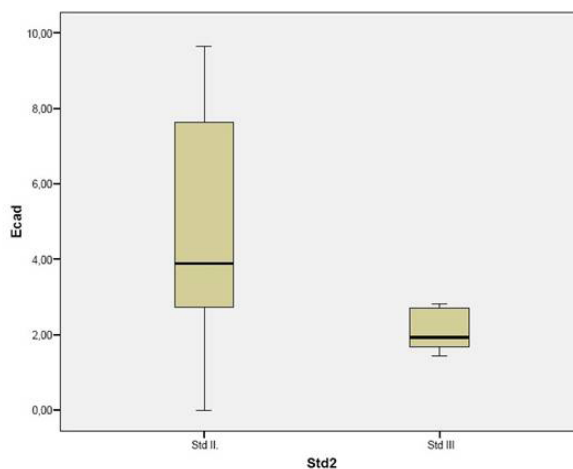
A mérések eredményeit jól tükrözik a *box plot* grafikonok is, amelyek, mind az E-cadherin, mind pedig az SMA esetek feldolgozása kapcsán, két súlyossági foknak megfelelően mutatják a medián értékek szintkülönbségét. A mért felületértékek által jelzett fehérje jelenlét erőssége (az immunreakció expressziója) változik az MM súlyossági fokával: II-es stádiumban nagyobb, III-as stádiumban kisebb az E-cadherin pozitív területek aránya (2. ábra), II-es stádiumban kisebb, III-as stádiumban nagyobb az SMA-pozitív területek aránya (3. ábra).



1. ábra. Számítógépes képfeldolgozás részeredményeként az S-88.331 eset E-cadherin területeinek számlálására előkészített *hot spot* képe (bal oldalon: E-cadherin pozitív immunhisztokémia készítmény, jobb oldalon: elkülönített E-cadherin pozitív területek)



2. ábra. E-cadherin felületértékének változása a melanoma malignum súlyosbodásával



3. ábra. SMA felületértékének változása a melanoma malignum súlyosbodásával

1. táblázat. A feldolgozott esetek kórszöveti diagnózisa, stádiuma és immunmorfológiai adatai

	<i>Eset</i>	<i>Kórszövet</i>	<i>Stádium</i>	<i>SMA%</i>	<i>E-cad %</i>
1	103520	Nodularis, kifekélyesedő, Cl V Br 12	II C	3,39	1,73
2	108426	Nodularis, kifekélyesedő, Cl IV Br 5	II C	2,33	0,00
3	109707	Amelanoticus, invazív Cl IV, Br 6	II A	3,22	4,48
4	119231	Nodularis, kifekélyesedő, Cl V Br 13	II C	3,54	4,48
5	129611	Nodularis, kifekélyesedő, Cl IV BR 6	III B	8,78	2,77
6	134451	Nodularis, kifekélyesedő, kísérő góccok Cl V Br 8	III B	9,26	1,44
7	152618	Superficialisan terjedő, Cl II Br 4	II B	4,09	7,95
8	154247	Nodularis, kifekélyesedő, Cl IV Br 6	II C	3,17	8,11
9	166264	Orrnyálkahártya melanoma	II B	8,78	2,73
10	71643	Nodularis, kifekélyesedő, Cl V Br 8	II C	4,35	9,64
11	80439	Nodularis, kifekélyesedő, kísérő góccok, Cl IV Br 7	III B	5,57	2,64
12	87841	Nodularis, Cl IV Br13	IIIA	6,2	1,61
13	87843	Superficialisan terjedő, Cl III Br 4	II B	4,88	7,63
14	88331	Nodularis, kifekélyesedő, Cl IV Br 5,2	II C	6,31	3,28
15	89096	Nodularis, Clark IV Br 6	II B	3,41	3,71
16	100834	Nodularis, Cl IV Br 5	II B	2,11	8,97
17	78473	Nodularis, Cl III, Br 9	III A	3,41	2,81
18	155394	Nodularis, kifekélyesedő, kísérő góccokkal, Cl. III Br.4.	III B	2,17	1,76
19	164293	Nodularis, kifekélyesedő Cl IV, Br 1,13	II A	4,17	3,90
20	75608	Nodularis, Cl.III, Br 2,16	II A	4,01	2,50
21	96335	Nodularis, Cl IV Br 4	II A	5,23	3,90
22	136576	Nodularis, kifekélyesedő, Cl V, Br 6	III A	6,42	1,93
23	151003	Nodularis, Cl V Br 10	II B	5,86	2,63
24	157311	Mikroinvazív Cl II Br3	II B	4,98	3,88
25	103517	Nodularis, kifekélyesedő, Cl V Br 7,1	II C	3,97	2,94

Megbeszélés

Az MM továbbra is közegészségügyi gond, egyre gyakoribb megjelenése és korai áttétei miatt [8]. Szövetében újabban egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az EMT jelenségeinek, amelyek során a daganatsejtek elveszítik sejtkapcsolataikat, hámszövetüket és fokozatosan különálló, mozgékony, mesenchyma sejtekké alakulnak, lehetővé téve az áttétképzést [4].

Jelentős EMT mediátor a transzmembranalís cadherin glikoprotein csoport, amelynek egyik képviselője az E-cadherin, kalcium-függő homofil kötéssel kapcsolja össze a sejteket a desmosomák területén, felületalakító szerepet töltve be [6, 7, 9]. Ellenőrzi a sejtek vándorlását, befolyásolja a sejt differenciálódást, a sejtburjánzást és az apoptózist. Az E-cadherin kimutatható a melanocytákban és a naevus sejtekben is, alacsony értékekben a primér tumorban és egyáltalán nem az invazív és metasztatáló melanomákban [2]. A melanocyták az alaphártyán helyezkednek el és ott heterotípusos sejt-sejt viszonyt

alakítanak ki az alap hámszövetekkel az E-cadherin segítségével. Az E-cadherin kifejezés elvesztését daganatos átalakulás követi, nem csak különböző rosszindulatú bőrdaganatokban, hanem más hámeredetű daganatokban is, mint például nyelőcső-, vastagbél-, gyomor- és emlő-karcinómákban. A melanomákban ezek az összefüggések változóak [3, 5, 14]. Csökkent E-cadherin expresszió általában összefügg távoli metasztatázisok megjelenésével és alacsonyabb differenciáltságú, magasabb stádiumú daganatokra jellemző [1, 12]. Általában, csökkent E-cadherin érték nagyobb Breslow tumorvastagsággal társul [16]. Egészséges melanocytákban egyformán kifejeződik az E- és a P-cadherin. Bár az E-cadherinnek nagyobb jelentősége van a sejtadhéziós folyamatban a P-cadherin érték csökkenésének nagyobb jelentősége van a daganat áttétképző hajlamának megítélésében [13].

SMA vagy simaizom alfa-aktin, egy sejtvezeték, amely leggyakrabban az érfal izomsejtjeiben, pericytákban, dermális szőrtüszőkben, miofibroblasztokban mutatható ki, de leírták sebgyógyulás sarjszövetében és daganatos

szövetzaporulatokban is [11]. SMA expresszió pozitív melanoma áttétekben és negatív az elsődleges daganatban [15]. Az elsődleges daganat sejtei kezdetben olyan anyagokat termelnek, amelyekkel meggátolják az aktin felszaporodását: plateled derived growth factor (PDGF) [11]. SMA kimutatása nagyon ritka az első stádiumokban lévő melanomáknál, alacsony a nagyobb stádiumokban és felszaporodott áttétes, ill. dezmoplasztikus melanomákban [15]. Megvizsgált eseteinkben a csökkent E-cadherin értékek tumor invázióra utalnak, ami a megjelenő és enyhén emelkedett SMA-val összefüggésben jelzi a betegség rossz kimenetét.

Következtetések

Az E-cadherin és SMA expresszió digitális képfeldolgozással mért változása prognosztikai előrejelző módszerként felhasználható MM esetek ellátásában.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Dr. Mezei Tibornak a képfeldolgozásban, Dr. Koncsag Elődnek az adatok statisztikai értelmezésében nyújtott segítségét.

Irodalom

1. Bringuier P.P., Urbase R., Sshaafsma H.E. et al – *Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors*, Cancer Res., 1993, 53: 3241-3245.
2. Danen E.D.J., de Vries T. J., Morandini R. et al. – *E-cadherin expression in human melanoma*, Melanoma Res, 1996, 6:127-131.
3. Dolled-Filhart M., McCabe A., Giltnane J. et al. – *Quatitative in situ analzsis of beta-catenin expression in breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome*, Cancer Res, 2006, 66:5487-5494.
4. Guarino M., Rubino B., Ballabio G. – *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*, Pathol, 2007, 39:305-308.
5. Gould Rothberg B.E., Bracken M.B. – *E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis*, Breast Cancer Res Treat, 2006, Epub: DOI 10.1007/s10549-006-9248-2, 100:139-148.
6. Halbleib J.M., Nelson W.J. – *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*, Genes Dev, 2006, 20:3199-3214.
7. Huber M.A., Kraut N., Beug H. – *Molecular requirements for epithelialmesenchymal during tumor progression*, Curr Opin Cell Biol, 2005, 17:548-558.
8. Jemal A., Siegel R., Ward E. et al. – *Cancer statistics, 2007*. CA Cancer J Clin 2007, 57:43-66.
9. Luo J., Chen J., Deng Z.L. et al. – *Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?* Lab Invest 2007, 87:97-103.
10. Mezei T., Gurzu S., Horváth E. et al. – *p53-at és Ki67-et expresszáló daganatsejtek számlálása manuális és morfometriai módszerekkel. Összehasonlító tanulmány, Orvostudományi Értesítő*, 2007, 80(1):38-42.
11. Okamoto-Inoue M., Nakayama J., Hori Y. et al. – *Human malignant melanoma cells release a factor that inhibits the expression of smooth muscle alfa-action*, J Dermatol Sci, 2000, 23:170-177.
12. Otto T., Birchmeier W., Schidt V. et al. – *Invers relation of E cadherin and autocrine mobility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas*, Cancer Res, 1994, 54 (12):3120-3123.
13. Sanders D.S.A., Blessing K., Hassan G.A.R. et al. – *Alteration in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours*, J Clin Pathol Mol Pathol, 1999, 52:151-157.
14. Takayama T., Shiozaki H., Shibamoto S. et al. – *H-catenin expression in human cancers*, Am J Pathol, 1996, 148:39-46.
15. Tsukamoto H., Mishima Y., Hayashibe K. et al. – *Alpha-smooth muscle actin expression in tumor and stromal cells of benign and malignant human pigment cell tumors*, J Invest Dermatol, 1992, 98(1):116-120.
16. Zhang X.D., Hersey P. – *Expression of catenins and p120 cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alfa-catenin expression is associated with melanoma progression*, Pathol, 1999, 31:239-246.