



## Expression of the selected adhesive molecules (cadherin E, CD44, LGAL3 and CA50) in papillary thyroid carcinoma

Barbara Nikiel<sup>1</sup>, Mykola Chekan<sup>1</sup>, Magdalena Jaworska<sup>1</sup>, Michał Jarzab<sup>2</sup>, Beata Maksymiuk<sup>1</sup>, Dariusz Lange<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Tumor Pathology,

<sup>2</sup>Department of Tumor Biology,

Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

### Abstract

**Introduction:** The aim of the study was to determine the expression of selected adhesive molecules in papillary thyroid carcinoma.

**Material and methods:** 47 papillary thyroid carcinoma cases and 11 nonmalignant goiter cases were analyzed by immunohistochemistry.

**Results:** Galectin-3 (LGAL3) was a sensitive and specific marker, present in 91% of analyzed tumors and only in 5% of tumor margin. The presence of CA50 was 86% and 3% respectively with only 3% positive non-malignant cases. Cadherin E expression was noted in 91% of primary tumors, in 84% of the surrounding tissue and in 63% of non-malignant goiter. CD44 (DF1485) was observed in 89% of primary tumors and 48% of surrounding tissue; the reaction with BBA10 was more characteristic for metastases.

**Conclusions:** Our study confirms the high diagnostic value of galectin-3 in papillary thyroid carcinoma and reveals the similar efficiency of CA50. CD44 (DF1485) expression in primary tumor is more intensive than in surrounding tis-

sue, but the diagnostical importance is not high because it is often observed in benign lesions. Using of BBA10 is more sensitive, but less specific. High expression of cadherin E in benign lesions impairs its diagnostical application in papillary thyroid cancer.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 326-335)

**Key words:** papillary thyroid carcinoma, adhesive molecules, galectin-3, CA50 antigen



Barbara Nikiel, MSc  
Department of Tumor Pathology,  
Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center  
and Institute of Oncology, Branch Gliwice  
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice  
phone: 032 278 94 01, fax: 032 278 94 15  
e-mail: basia-ni@o2.pl



## Ekspresja wybranych molekuł adhezyjnych (kadheryny E, CD44, LGAL3 i CA50) w raku brodawkowatym tarczycy

Barbara Nikiel<sup>1</sup>, Mykola Chekan<sup>1</sup>, Magdalena Jaworska<sup>1</sup>, Michał Jarząb<sup>2</sup>, Beata Maksymiuk<sup>1</sup>, Dariusz Lange<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Patologii Nowotworów,

<sup>2</sup>Zakład Biologii Nowotworów,

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

### Streszczenie

**Wstęp:** Celem pracy było określenie ekspresji wybranych molekuł adhezyjnych w tkance raka brodawkowego tarczycy zarówno w guzie pierwotnym, jak i w przerzutach do węzłów chłonnych oraz ocena ich przydatności dla celów diagnostycznych i prognostycznych.

**Materiał i metody:** Badaniem objęto grupę 47 chorych na raka brodawkowego tarczycy i 11 chorych operowanych z powodu wola niezłośliwego. Badania przeprowadzono metodą immunohistochemiczną.

**Wyniki:** Pod względem znaczenia diagnostycznego wśród badanych markerów galektyna-3 okazała się jednym z najbardziej czułych i swoistych, o czym świadczy różnica między guzem (91% przypadków dodatnich) a otoczeniem (5%). Molekuła adhezyjna CA50 występowała prawie tak samo często w guzie pierwotnym (86% przypadków), jak i przerzutowym (85%). Jej obecność w otoczeniu zaobserwowano tylko w jednym przypadku (3%), reakcja miała charakter ogniskowy. Kadheryna E występowała w 91% przypadków guza pierwotnego i 84% otoczenia. Dodatnią reakcję obserwowano również w 63% przypadków wola guzkowego. Molekuła CD44, klon DF1485, był obecny w 100% przerzutów do węzłów chłonnych, w 89% guzów pierwotnych i w 48% przypadków otoczenia guza. Molekuła CD44, klon BBA10, występował częściej w przerzutach. **Wnioski:** Spośród badanych markerów największą wartość diagnostyczną w raku brodawkowatym tarczycy wykazał

antygen CA50 i galektyna-3. Ekspresja CD44 (DF1485) w guzie pierwotnym jest znacznie silniejsza niż w otoczeniu, jednak jego wartość diagnostyczna jest niepewna, gdyż występuje on często w zmianach łagodnych tarczycy. Zastosowanie przeciwciała BBA10 zwiększa czułość metody, ale zmniejsza jej swoistość. Częste występowanie kadheryny E w komórkach raka brodawkowego tarczycy, otoczeniu guza i zmianach łagodnych tarczycy nie pozwala na jej zastosowanie diagnostyczne.

(*Endokrynol Pol* 2006; 4 (57): 326–335)

**Słowa kluczowe:** rak brodawkowy tarczycy, molekuły adhezyjne, galektyna-3, antygen CA50



mgr Barbara Nikiel  
Zakład Patologii Nowotworów,  
Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,  
Oddział w Gliwicach  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice  
tel.: 032 278 94 01, faks: 032 278 94 15  
e-mail: basia-ni@o2.pl

### Wstęp

Adhezja komórkowa to dynamiczny proces, dzięki któremu komórki łączą się ze sobą nawzajem i z macierzą zewnątrzkomórkową. Obejmuje procesy sygnalizacyjne, które kontrolują przepływ informacji pomiędzy sąsiednimi komórkami. Podczas embriogenezy interakcje adhezyjne są istotne dla procesów morfogenezy. Silną współzależność między ekspresją molekuł adhezyjnych a strukturą tworzącej się tkanki zaobserwowano, na przykład w badaniach nad lokalizacją winkuliny, która wiąże wewnątrzkomórkową domenę kadheryny w ty-

reocytach w zależności od organizacji struktury nabłonka (w układzie jednowarstwowym lub pęcherzykowym) [1]. Receptory adhezyjne odgrywają zasadniczą rolę w morfogenezie, utrzymywaniu integralności i migracji komórek nabłonka. Największe rodziny receptorów adhezyjnych to: immunoglobuliny, kadheryny, integryny, selektyny i CD44 [2, 3]. W niniejszej pracy analizowano ekspresję kilku molekuł adhezyjnych należących do różnych klas, w tym kadheryny E, antygeny CD44, galektyny-3 oraz antygeny węglowodanowego CA50.

### **Kadheryna E (CDH1)**

Kadheryny są zbudowane z domeny zewnątrzkomórkowej, która wymaga obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do tworzenia połączeń homofilowych między przylegającymi komórkami, domeny transbłonowej i domeny wewnątrzkomórkowej, łączącej się z białkami zwanymi kateninami ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), a za ich pośrednictwem z cytoszkieletem [4]. Kompleks kadherynowo-kateninowy bierze udział we wzmacnianiu mechanicznych właściwości połączeń adhezyjnych i odgrywa ważną rolę w morfogenezie i kontroli wzrostu komórek [5]. Zaburzenia w syntezie  $\alpha$ -kateniny lub wewnątrzkomórkowej domeny kadheryny E (CDH1) są przyczyną powstania komórek niezdolnych do agregacji i adhezji [6]. W badaniach molekuł adhezyjnych ważne jest nie tylko to, czy badana substancja występuje w tkance, ale również to, czy jej lokalizacja komórkowa jest prawidłowa. CDH1 występuje w błonie komórkowej nabłonka, a jej utrata lub przesunięcie z błony do cytoplazmy wiąże się z odróżnicowaniem komórek, wzrostem inwazyjności miejscowej nowotworu i wystąpieniem przerzutów, a zatem gorszym rokowaniem [7]. Uważa się z jednej strony, że to właśnie kadheryna E pełni decydującą rolę w regulacji procesów adhezji komórek nabłonkowych oraz że istnieje ścisły związek między inwazyjnością nowotworu i jej supresyjnym działaniem [8]. Obniżona ekspresja kadheryny E oraz  $\alpha$ -i- $\beta$ -kateniny w pierwotnym raku jelita grubego jest niezależnym, negatywnym czynnikiem prognostycznym. Z drugiej strony, występująca w prawie połowie przerzutów do węzłów chłonnych, wyższa niż w guzie pierwotnym ekspresja molekuł adhezyjnych wiąże się z gorszym rokowaniem. Podobnie, krótszy jest też czas przeżycia chorych z przerzutami do wątroby, wykazującymi podwyższoną ekspresję molekuł adhezyjnych [9].

Rolę CDH1 analizowano także w raku pęcherza moczowego, a otrzymane wyniki sugerują, że kadheryna ta wpływa na inwazyjność komórek raka pęcherza, gdyż jej zaburzona ekspresja wiąże się ze wznowami, progresją i krótszym czasem przeżycia [8].

### **Antygen CD44**

Antygen CD44 należy do odrębnej rodziny cząsteczek adhezyjnych i jest wielofunkcyjną glikoproteiną, która bierze udział w licznych interakcjach międzykomórkowych, takich jak: połączenia limfocytów ze śród-błonkiem, adhezja komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, limfohematopoeza, adhezja homotypowa, aktywacja limfocytów T, uwalnianie cytokin i ruch boczny komórek [10]. Występuje w postaci wielu izoform, których obecność jest wynikiem alternatywnego składania mRNA. Wielkość cząsteczki poszczególnych izoform CD44 zależy od liczby eksonów zaangażowanych w ich powstawanie. Mniejsze występują na

powierzchni komórek układu krwiotwórczego, fibroblastów i komórek glejowych, a większe na komórkach nabłonka. Ligandami dla CD44 są takie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, jak fibronektyna i kolagen [10]. Uważa się, że CD44 może ułatwiać degradację macierzy zewnątrzkomórkowej przez regulację aktywności proteaz zdolnych do trawienia jej komponentów. Głównymi enzymami degradującymi są metaloproteinazy (MMPs, *matrix metalloproteinases*), których sprawne funkcjonowanie jest konieczne dla remodelowania tkanki podczas rozwoju, resorpcji kości, gojenia ran i angiogenezy, a także do infiltracji tkanek przez leukocyty i komórki nowotworowe. Antygen CD44 wpływa na inwazyjność nowotworu poprzez udział w umieszczeniu proteolitycznie aktywnej MMP9 na powierzchni komórek guza [11]. Metaloproteinazy niszczą błonę podstawną, a CD44 bierze udział w formowaniu inwadopodiów poprzez wiązanie domeny cytoplazmatycznej z ankiryną do systemu kurczenia się aktynomiozynowego związanego z błoną i w ten sposób przyczynia się do migracji komórek [12].

### **Galektyna-3**

Galektyna-3 (LGAL3) to proteina o masie około 30 kDa należąca do lektyn wiążących  $\beta$ -galaktozydy [13, 14]. Galektyny biorą udział w adhezji międzykomórkowej i do macierzy zewnątrzkomórkowej, we wzroście komórek, regulacji cyklu komórkowego i apoptozie, a także transformacji nowotworowej. W komórkach pęcherzykowych tarczyc płodowych wykazano niską ekspresję galektyny-1 i brak ekspresji galektyny-3. Sugeruje to, że galektyna-1 może być uznana za antygen rakowo-płodowy, a galektyna-3 powstaje w nich *de novo* podczas transformacji nowotworowej [15]. Występowanie tych galektyn w łagodnych i złośliwych guzach tarczycy było również przedmiotem badań Xu i wsp. Nowotwory złośliwe pochodzenia pęcherzykowego charakteryzowała silna ekspresja galektyny-1 i galektyny-3, natomiast zarówno w przylegającej do nich prawidłowej tkance tarczycy, jak i w zmianach łagodnych reakcja ta nie występowała. Słabą reakcją zaobserwowano również w komórkach okołopęcherzykowych. Według autorów świadczy to o tym, że obecność galektyny wiąże się z transformacją nowotworową nabłonka tarczycy, a ocena ekspresji galektyny może być wiarygodną metodą różnicującą zmiany łagodne od złośliwych [16].

### **Antygen węglowodanowy CA50**

Antygen CA50 jest jednym z antygenów węglowodanowych spokrewnionych z układem grupowym krwi Lewis. Antygeny te wchodzi w skład różnych glikoprotein uczestniczących w procesach adhezji komórkowej. Przeciwciała CA50 reaguje z sialowanym antygenem Le(a) [sLe(a)], który jest sialowaną lakto-N-tetraozą (czyli

antygenem CA50) [17]. Antygeny Le(a) i sLe(a) badano w rakach układu pokarmowego, raku pęcherza moczowego, prostaty, piersi i rakach tarczycy [18–25]. Obecność antygenów układu grupowego krwi Lewis wykazano po raz pierwszy immunohistochemicznie w rakach tarczycy w drugiej połowie lat 80., a w 1998 roku van Hoeven i wsp. [26] wykazali, że sLe(a) występuje w połowie biopłatów cienkoigłowych raków tarczycy, a Le(x) w 75% przypadków. Autorzy ci zwracali uwagę, że testy immunohistochemiczne na obecność tych markerów mogą służyć jako badania pomocnicze przy trudnych interpretacyjnie wynikach biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC).

## Cel pracy

Celem pracy było określenie ekspresji wybranych molekuł adhezyjnych (kadheryny E, CD44, LGAL3 i CA50) w raku brodawkowatym tarczycy, zarówno w guzie pierwotnym, jak i w przerzutach do węzłów chłonnych oraz ocena ich przydatności diagnostycznej i prognostycznej.

## Materiał i metody

Badaniem objęto grupę 47 chorych na raka brodawkowatego tarczycy. Materiał tkankowy pochodził z operacji przeprowadzonych w Instytucie Onkologii w Gliwicach w latach 1996–1998.

Badaną grupę podzielono na dwie podgrupy:

- chorzy z przerzutami do węzłów chłonnych;
- chorzy bez przerzutów do węzłów chłonnych w czasie rozpoznania.

Grupę kontrolną stanowiło 11 chorych operowanych z powodu wola guzkowego.

Do badań wykorzystano tkanki rutynowo utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie. Błoczki parafinowe cięto na skrawki o grubości 4  $\mu$ m, na szkiełka podstawowe pokryte poli-L-lizyną.

Badania przeprowadzono metodą immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciw następującym antygenom:

- galektynie-3 — NCL-GAL3 (firmy Novocastra);
- kadherynie E (CDH1) — Ecad (firmy DAKO);
- CD44 — DF1485 (firmy DAKO) — BBA10 (firmy R&D);
- sialowanemu Le(a) i sialowanej lakto-N-tetraozie — CA50 (firmy CanAg Diagnostics).

W celu uwidocznienia reakcji antygen–przeciwciało użyto systemu EnVision+/HRP Anti-Mouse (firmy Dako). Chromogenem dla peroksydazy był DAB+ (firmy Dako), który w efekcie utlenienia daje nierozpuszczalny w wodzie produkt barwy brązowej. Uzyskane reakcje immunohistochemiczne miały charakter błonowy (CDH1, CD44), cytoplazmatyczny i błonowy (CA50) lub cytoplazmatyczny i jądrowy (LGAL3).

## Sposób oceny reakcji

Reakcję oceniano pod względem intensywności (I) i rozległości (R) w skali od 0 do 3.

Intensywność (I)

3 — intensywne zabarwienie widoczne pod małym powiększeniem (100  $\times$ );

2 — intensywne zabarwienie widoczne pod średnim powiększeniem (200  $\times$ );

1 — słabe zabarwienie widoczne dopiero pod średnim powiększeniem;

0 — brak zabarwienia.

Rozległość (R)

3 — reakcja rozległa (widoczna w każdym polu przy powiększeniu 200  $\times$ );

2 — reakcja częściowa (widoczna w każdym polu przy powiększeniu 100  $\times$ );

1 — reakcja ogniskowa;

0 — brak reakcji.

Po oznaczeniu intensywności i rozległości reakcji obliczono wskaźnik, który jest iloczynem obu tych wartości ( $I \times R$ ).

## Wyniki

### Kadheryna E (CDH1)

Półościowa ocena ekspresji CDH1 była bardzo trudna ze względu na heterogenny charakter reakcji. Komórki o mocno zabarwionej błonie sąsiadowały z komórkami słabo zabarwionymi lub nawet o ujemnej reakcji, zarówno w guzie (ryc. 1), jak i w otoczeniu (ryc. 2). Nie zaobserwowano korelacji między występowaniem CDH1 w guzie pierwotnym a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. U chorych z przerzutami odnotowano 90% przypadków reakcji dodatniej, natomiast u chorych bez przerzutów — 92%. Ekspresja CDH1 w przerzutach była słabsza pod względem intensywności i rozległości. Zaobserwowano też, że u chorych bez przerzutów rzadziej pojawia się CDH1 w otoczeniu guza. Biorąc pod uwagę całą grupę badaną, CDH1 występowała w 91% przypadków guza pierwotnego i 84% przypadków otoczenia guza. Dodatnią reakcję oznaczono również w 63% przypadków wola niezłośliwego (tab. I).

### Antygen CD44

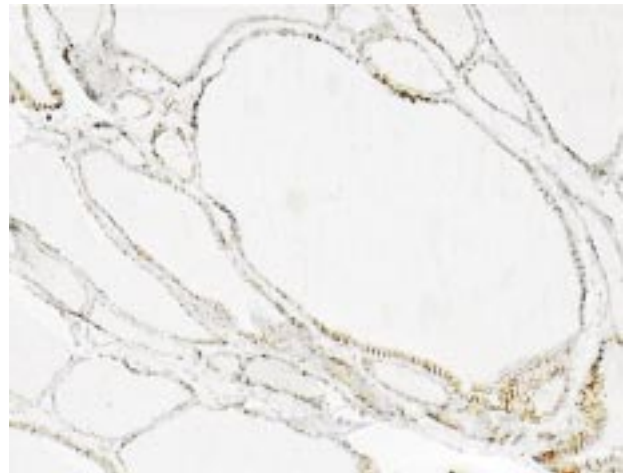
Antygen CD44 (klon DF1485) był obecny w 100% przerzutów do węzłów chłonnych, w 89% guzów pierwotnych i w 48% przypadków otoczenia guza. Zatem różnica w poziomie ekspresji CD44 w guzie i otoczeniu w porównaniu z kadherynami była większa (ryc. 3). W grupie kontrolnej antygen ten występował w 100% przypadków (tab. I).

Antygen CD44 (klon BBA10) podobnie, występował częściej w przerzutach, bo w 93% przypadków, natomiast w guzie pierwotnym występował nieco rzadziej



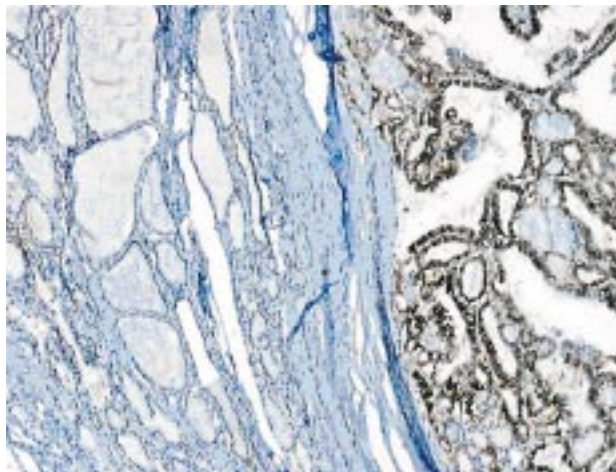
**Rycina 1.** Ekspresja kadheryny E w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie (pow. 200 ×)

**Figure 1.** Cadherin E expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor (100 ×)



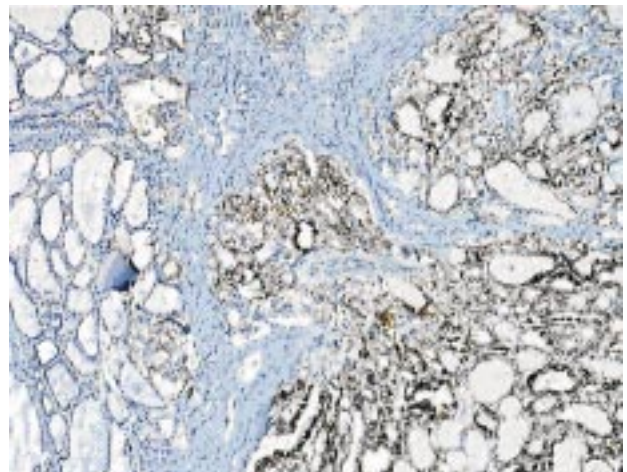
**Rycina 2.** Ekspresja kadheryny E w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w otoczeniu guza (pow. 100 ×)

**Figure 2.** Cadherin E expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in surround tissue (100 ×)



**Rycina 3.** Ekspresja CD44 (DF1485) w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie i otoczeniu guza (pow. 100 ×)

**Figure 3.** CD44 (DF1485) expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor and surround tissue (100 ×)



**Rycina 4.** Ekspresja CD44 (BBA10) w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie i otoczeniu guza (pow. 100 ×)

**Figure 4.** CD44 (BBA10) expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor and surround tissue (100 ×)

niż w reakcji z użyciem klonu DF1485 (87% przypadków, z tego 46% o maksymalnej intensywności), jednak odsetek reakcji o maksymalnej intensywności był znacznie wyższy i wyniósł 76%. Znacznie częściej, bo w 70% przypadków, obserwowano też reakcję w otoczeniu (ryc. 4) (tab. I).

### Galektyna-3 (LGAL3)

Pod względem znaczenia diagnostycznego galektyna-3 była jednym z najbardziej czułych i swoistych wśród badanych markerów, o czym świadczy różnica w ekspresji między guzem a otoczeniem, odpowiednio: 91% i 5% przypadków (ryc. 5). Różnica między grupą badaną

a kontrolną jest już mniejsza, gdyż w grupie kontrolnej zaobserwowano reakcję dodatnią w 63% przypadków, przy czym w żadnym z ocenianych preparatów nie miała ona maksymalnej rozległości, natomiast w grupie raków 85% guzów pierwotnych i 100% przerzutów charakteryzowało się reakcją o maksymalnej rozległości (tab. I).

### Antygen CA50

Antygen ten występował prawie tak samo często w guzie pierwotnym, jak i w przerzutach, odpowiednio w 86% i 85% przypadków (tab. I). Reakcja w raku brodawkowatym tarczycy charakteryzowała się dużą intensywnością i rozległością (ryc. 6). Jego obecność

Tabela I

Ekspresja molekuł adhezyjnych w raku brodawkowym tarczycy i grupie kontrolnej

Table I

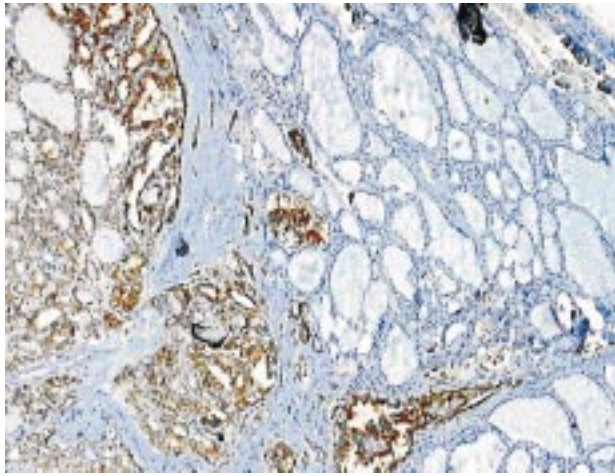
Expression of adhesive molecules in papillary thyroid carcinoma and control group

	I/R	Guz		Otoczenie		Przerzut		Kontrola	
		Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%
LGAL3	3/3	40	85,11	–	–	15	100,00	–	–
	3/2	2	4,26	1	2,78	–	–	1	9,09
	3/1	1	2,13	1	2,78	–	–	–	–
	2/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/2	2	4,26	1	2,78	–	–	2	18,18
	2/1	1	2,13	2	5,56	–	–	1	9,09
	1/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/2	–	–	2	5,56	–	–	1	9,09
	1/1	–	–	10	27,78	–	–	1	9,09
	0	1	2,13	19	52,78	–	–	4	36,36
CA50	3/3	6	13,64	–	–	3	21,43	–	–
	3/2	18	40,91	–	–	6	42,86	–	–
	3/1	13	29,55	–	–	3	21,43	1	9,09
	2/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/2	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/1	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/2	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/1	1	2,27	1	3,45	–	–	–	–
	0	6	13,64	28	96,55	2	14,29	10	90,91
CD44 (DF1485)	3/3	19	40,43	–	–	6	40,00	10	90,91
	3/2	3	6,38	1	3,23	2	13,33	1	9,09
	3/1	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/3	4	8,51	–	–	–	–	–	–
	2/2	6	12,77	–	–	3	20,00	–	–
	2/1	–	–	1	3,23	–	–	–	–
	1/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/2	3	6,38	2	6,45	–	–	–	–
	1/1	7	14,89	11	35,48	4	26,67	–	–
	0	5	10,64	16	51,61	–	–	–	–
CD44 (BBA10)	3/3	29	61,70	–	–	10	66,67	–	–
	3/2	6	12,77	3	9,09	3	20,00	2	18,18
	3/1	1	2,13	2	6,06	–	–	–	–
	2/3	1	2,13	1	3,03	–	–	1	9,09
	2/2	2	4,26	5	15,15	–	–	–	–
	2/1	–	–	4	12,12	1	6,67	–	–
	1/3	–	–	1	3,03	–	–	–	–
	1/2	2	4,26	–	–	–	–	3	27,27
	1/1	1	2,13	7	21,21	–	–	2	18,18
	0	6	12,77	10	30,30	1	6,67	3	27,27
CDH1	3/3	7	15,22	–	–	3	20,00	–	–
	3/2	12	26,09	6	19,35	2	13,33	4	36,36
	3/1	5	10,87	1	3,23	1	6,67	–	–

cd. →

I/R	Guz		Otoczenie		Przerzut		Kontrola	
	Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%
2/3	4	8,70	8	25,81	2	13,33	–	–
2/2	4	8,70	5	16,13	–	–	–	–
2/1	4	8,70	–	–	1	6,67	2	18,18
1/3	2	4,35	1	3,23	–	–	–	–
1/2	3	6,52	3	9,68	2	13,33	–	–
1/1	1	2,17	2	6,45	3	20,00	1	9,09
0	4	8,70	5	16,13	1	6,67	4	36,36

LGAL3 — Galektyna-3; CA50 — Antygen węglowodanowy CA50; aCD44 (DF1485) — antygen CD44 badany dwoma różnymi przeciwciałami; CD44 (BBA10); CDH1 — kadheryna 1



**Rycina 5.** Ekspresja LGAL3 w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie i otoczeniu guza (pow. 100 ×)

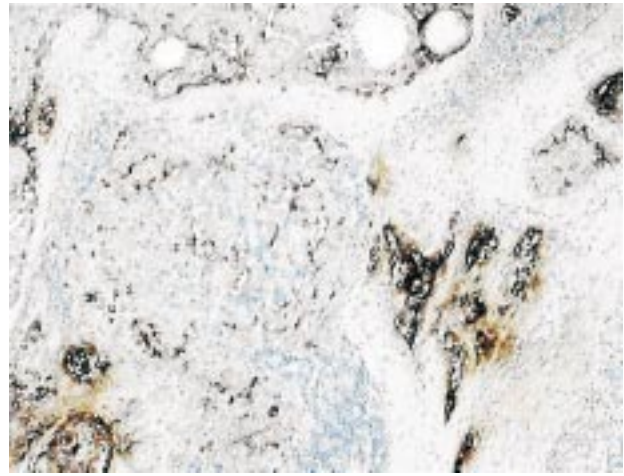
**Figure 5.** LGAL3 expression in Papillary Thyroid Carcinoma, reaction in tumor and surround tissue (100 ×)

w otoczeniu zaobserwowano tylko w jednym przypadku, a reakcja miała charakter ogniskowy. Podobnie w grupie kontrolnej odnotowano jeden przypadek dodatni z ogniskową ekspresją.

## Dyskusja

Badane białka adhezyjne można analizować pod różnym względem, zarówno w aspekcie ich znaczenia dla biologii raka, jak i informacji o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym, które wnoszą ich oznaczenie. W niniejszej pracy główny nacisk położono na aspekt diagnostyczny, chociaż z porównania częstości ekspresji markera w guzach, którym towarzyszyły przerzuty do węzłów chłonnych, z guzami o mniejszym stopniu zaawansowania można wyciągać pewne wnioski o potencjalnym znaczeniu prognostycznym danego markera.

Galektyna-3 jest znanym i często stosowanym w diagnostyce markerem raka tarczycy, choć kontro-



**Rycina 6.** Ekspresja CA50 w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie (pow. 100 ×)

**Figure 6.** CA50 expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor (100 ×)

wersyjnym. Świadczy o tym duża liczba prac i skrajnie różne poglądy na temat jej przydatności oznaczania. Dużym uproszczeniem byłoby stwierdzenie, że im starsze prace, tym bardziej optymistyczne doniesienia, gdyż dyskusja wciąż trwa i liczba zwolenników zarówno jednego, jak i drugiego poglądu nie maleje. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy galektyna-3 okazała się niezwykle wartościowym markerem raka brodawkowatego tarczycy. Prawie wszystkie guzy pierwotne charakteryzowały się dodatnią reakcją na galektynę-3 (46 z 47), zarówno w grupie chorych z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i bez przerzutów. W zdecydowanej większości przypadków reakcja ta była intensywna i rozległa. Wśród badanych markerów galektyna-3 okazała się jednym z najbardziej swoistych i czułych pod względem znaczenia diagnostycznego, o czym świadczy różnica w intensywności i rozległości reakcji między guzem a otoczeniem. Dowodzi tego również różnica między badaną grupą raków brodawkowatych, w której najwyższy wskaźnik oznaczono w 85,1%

przypadków, a grupą kontrolną łagodnych rozrostów brodawkowatych, w której reakcja była słabsza i w żadnym przypadku nie oznaczono najwyższego wskaźnika.

Już w 1998 roku Orlandi i wsp. [27], badając materiał otrzymany z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, po porównaniu z materiałem histologicznym, uznali galektynę-3 za wiarygodny, tani i łatwy w oznaczaniu marker przydatny w przedoperacyjnej diagnostyce guzów tarczycy, a szczególnie raka brodawkowatego. Podobnie w 1999 roku Inohara i wsp. [28] dowodzą, że oznaczanie galektyny-3 zwiększa dokładność diagnostyki różnicowej zmian łagodnych i złośliwych tarczycy. W 2003 roku Giannini i wsp. [29], porównując przydatność różnych metod oznaczania galektyny-3, otrzymali pełną zgodność między wynikami uzyskanymi w metodzie immunocytochemicznej i immunohistochemicznej, co pozwoliło im na uznanie tego markera za wartościowy w przedoperacyjnej diagnostyce cytologicznej guzów tarczycy. Pisani i wsp. [30], autorzy pracy na temat diagnostyki cytologicznej utajonego raka brodawkowatego, stanowczo stwierdzają, że oznaczanie galektyny-3 powinno być częścią procedury wspomagającej klasyczną ocenę cytologiczną w przypadkach niejednoznacznych diagnostycznie. Oznaczanie galektyny-3 było pomocne w przedoperacyjnej diagnostyce minimalnie inwazyjnego raka pęcherzykowego [14]. Należy podkreślić, że przydatność diagnostyczna galektyny-3 zależy od typu raka. O ile w raku brodawkowatym ekspresja galektyny-3 niemal swoiście pojawia się w komórkach raka, to w różnicowaniu guzów pęcherzykowych wartość diagnostyczna metody jest zdecydowanie niższa.

Część autorów zaleca stosowanie oznaczania galektyny-3 jako wskaźnika o wysokiej swoistości, bardzo pomocnego przy różnicowaniu trudnych diagnostycznie przypadków gruczolaka od raka pęcherzykowego, a także pęcherzykowej postaci raka brodawkowatego [16, 27]. Z kolei w innych pracach dominuje pogląd, że wartość diagnostyczna galektyny-3 jako markera jest niska, gdyż występuje ona zarówno w zmianach łagodnych, jak i złośliwych [31]. Analizowano również wpływ galektyny-3 na inwazyjność raka i zaobserwowano korelację między zawartością galektyny-3 w guzie pierwotnym i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Guzy pierwotne, które charakteryzowały się wyższą ekspresją galektyny-3, częściej tworzyły przerzuty. Ujawniono, że utkanie przerzutu zawierało więcej galektyny niż guz pierwotny [32]. Badane przez autorów niniejszej pracy przypadki raka brodawkowatego tarczycy odznaczały się bardzo wysoką ekspresją galektyny-3 i to zarówno w grupie z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i bez przerzutów. Nie zaobserwowano znacząco wyższej ekspresji galektyny-3 w przerzutach nowotworowych w stosunku do guza pierwotnego.

Otrzymane przez autorów wyniki wydają się wskazywać, że galektyna-3 jest przydatnym markerem w diagnostyce raka brodawkowatego tarczycy. Na potwierdzenie tej tezy można przytoczyć wyniki Bartolazziego i wsp. [33], którzy przeprowadzili badania wielośrodkowe nad galektyny-3 i CD44v6 w ponad 1000 przypadków guzów tarczycy. W 75 przypadkach prawidłowej tkanki tarczycy odnotowano brak ekspresji obu markerów. Na 287 przypadków zmian łagodnych w 280 nie wykazano reakcji na galektynę-3, natomiast zaobserwowano wzrost ekspresji CD44v6 w zmianach proliferacyjnych łagodnych. Wśród 311 przypadków zmian złośliwych o różnym typie histologicznym i różnym stopniu zróżnicowania (z wyjątkiem raka rdzenia) 293 przypadki (94%) dały dodatnią reakcję na galektynę-3, a 253 przypadki (81%) wykazały dodatnią reakcję na CD44v6. Ponadto autorzy zaobserwowali, że w grupie minimalnie inwazyjnego raka pęcherzykowego komórki wykazujące obecność galektyny-3 znajdowano głównie w obszarach ogniskowej inwazji torebki. Zatem można przypuszczać, że podejrzane gruczolaki pęcherzykowe z dodatnią reakcją na galektynę-3 są prawdopodobnie wczesnymi rakami tarczycy z molekularnymi oznakami transformacji. Na wartość galektyny-3 i CD44v6 jako markerów różnicujących w materiale cytologicznym raka pęcherzykowego od gruczolaka pęcherzykowego zwracają również uwagę Maruta i wsp. [34], chociaż jednocześnie zauważają oni brak korelacji między tymi markerami i naciekaniami torebki oraz naczyń w materiale histologicznym, rozmiarem guza i pojawieniem się przerzutów.

Następnym badanym markerem był antygen węglowodanowy CA50. Wielu autorów sugeruje, że obecność antygenów spokrewnionych z układami grupowymi krwi (w tym CA50) w tkance nowotworowej stanowi negatywny czynnik prognostyczny. W raku żołądka ekspresja sLe(a) ma negatywne znaczenie rokownicze, a w zaawansowanej jego postaci koreluje z przerzutami do otrzewnej [35]. Inni dowodzą pozytywnej roli tych markerów, i tak Lipponen i Eskelinen, badając ekspresję CA50 w raku przejściowokomórkowym pęcherza moczowego, zaobserwowali, że progresja ściśle wiązała się z negatywnym odczynem na CA50 [21]. W niniejszej analizie ekspresji CA50 w raku brodawkowatym tarczycy zaznaczyła się przede wszystkim wartość diagnostyczna tego markera, na którą wskazuje fakt częstej jego obecności w raku brodawkowatym tarczycy, przy równoczesnym rzadkim występowaniu w zmianach łagodnych. Tylko w jednym przypadku obserwowano intensywną, ale ogniskową reakcję i praktycznie brak ekspresji w otoczeniu guza. Można więc wnioskować, że przeciwciała przeciw temu antygenowi mogłoby znaleźć szersze niż dotąd zastosowanie diagnostyczne. Jednocześnie należy wyjaśnić,



że dla tego antygeny nie ma odpowiednika w badaniach na poziomie RNA, gdyż jego ekspresja jest nie tyle bezpośrednio zależna od aktywacji transkrypcji konkretnego genu, co ma związek z aktywnością enzymów wbudowujących określone łańcuchy węglowodanowe w różne glikoproteiny powierzchniowe.

W opracowaniach dotyczących ekspresji CD44 najczęściej uwagi poświęca się CD44v6. W badaniach nad obecnością CD44v6 w nowotworach płuc zaobserwowano pełną korelację pomiędzy jego ekspresją w guzie pierwotnym i w przerzutach. Nie stwierdzono jednak korelacji między ekspresją tego markera a zaawansowaniem klinicznym [36]. Przeciwnie, Bankfalvi i wsp. [37] w badaniach nad ekspresją CD44 w raku piersi odnotowali związek między utratą CD44v6 a znacznie bardziej zaawansowanym stanem klinicznym. Silna reakcja na CD44v6 korelowała również z dłuższym okresem przeżycia.

Z kolei Yu i Stamenkovic opisują interakcje CD44 i metaloproteinaz wpływające na wzrost inwazyjności miejscowej i rozsiewu nowotworów [11]. W materiale autorów prezentowanej pracy antygen CD44 występował częściej w przerzutach niż w guzach pierwotnych. Ponadto ekspresja CD44 w samych przerzutach nowotworowych była większa niż w guzach pierwotnych. Dotyczyło to zarówno klonu DF1485, jak i BBA10, co może sugerować pewne znaczenie prognostyczne tego markera. Pod względem diagnostycznym klon BBA10 okazał się bardziej czułym, lecz mniej swoistym od DF1485. Zastanawia więc fakt, że w grupie kontrolnej ujawniono słabszą reakcję niż z DF1485.

Kolejnym badanym markerem była kadheryna E (CDH1). Chociaż w badaniach tej kadheryny uzyskano różne wyniki, niektórzy autorzy nazywają wręcz tę transbłonową glikoproteinę supresorem inwazji i przerzutowania w rakach tarczycy [38]. Inni jednak odnotowują brak korelacji między występowaniem kadheryny E w guzie i przerzutami czy innymi cechami klinicznymi [39]. Biorąc pod uwagę fakt, że CDH1 występuje w prawidłowych komórkach nabłonkowych, a obniżenie jej ekspresji może być interpretowane jako sygnał odróżnicowania komórki, autorzy badali również jej wartość diagnostyczną w raku brodawkowatym tarczycy. Z badań autorów niniejszej pracy wynika, że ocena reakcji jest trudna, ze względu na jej heterogenność. Komórki o mocno zabarwionej błonie sąsiadowały z komórkami słabo zabarwionymi lub nawet o ujemnej reakcji. O takim rozkładzie ekspresji informowali wcześniej inni autorzy [40]. Heterogenność ta występowała zarówno w guzie, jak i w jego otoczeniu, które stanowiło kontrolę wewnętrzną.

W pierwotnym raku jelita grubego zaobserwowano, że prawie połowa przerzutów do węzłów chłonnych wykazała wyższą ekspresję kadheryny E niż guzy

pierwotne [9]. W niniejszych badaniach przerzuty do węzłów chłonnych charakteryzowały się słabszą reakcją na CDH1 niż guzy pierwotne, zarówno pod względem intensywności, jak i rozległości.

## Wnioski

1. Spośród badanych markerów (LGAL3, CA50, CD44, CDH1) największą wartość diagnostyczną w raku brodawkowatym tarczycy wykazał antygen CA50 i galektyna-3.
2. Ekspresja CD44 (DF1485) w guzie pierwotnym jest znacznie silniejsza niż w otoczeniu, jednak jego wartość diagnostyczna jest niepewna, gdyż występuje on często w zmianach łagodnych tarczycy. Zastosowanie przeciwciała BBA10 zwiększa czułość metody, ale zmniejsza jej swoistość.
3. Częste występowanie kadheryny E w komórkach raka brodawkowatego tarczycy, otoczeniu guza i zmianach łagodnych tarczycy nie pozwala na jej zastosowanie diagnostyczne.

## Piśmiennictwo

1. Yap A, Stevenson B, Waters M i wsp. Vinculin localization and actin stress fibers differ in thyroid cells organized as monolayers or follicles. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; 32: 318–331.
2. Dahlman T, Grimelius L, Wallin G i wsp. Integrins in thyroid tissue: upregulation of  $\alpha 2\beta 1$  in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 104–112.
3. Żeromski J, Ławniczak M, Galbas K i wsp. Expression of CD56/ N-CAM antigen and some other adhesion molecules in various human endocrine glands. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; 36: 119–125.
4. Cerrato A, Fulciniti F, Avallone A i wsp. Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. *J Pathol* 1998; 185: 267–272.
5. Shih-Horn Huang, Jiahn-Chun Wu, King-Jen Chang i wsp. Distribution of the cadherin-catenin complex in normal human thyroid epithelium and thyroid carcinoma cell line. *J Cell Biochem* 1998; 70: 330–337.
6. Ropponen K, Eskelinen M, Lipponen P i wsp. Reduced expression of  $\alpha$  catenin is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 1999; 52: 10–16.
7. Kooy A, Tank B, Jong A i wsp. Expression of E-cadherin,  $\alpha$ - &  $\beta$ -catenin, and CD44v6 and the subcellular localization of E-cadherin and CD44v6 in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Human Pathology* 1999; 30: 1328–1335.
8. Popov Z, Medina S, Lefrere-Belda i wsp. Low E-cadherin expression in bladder cancer at the transcriptional and protein level provides prognostic information. *Br J Cancer* 2000; 83: 209–214.
9. Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 77: 201–207.
10. Soukka T, Salmi M, Joensuu H i wsp. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Research* 1997; 57: 2281–2289.
11. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & Development* 1999; 13: 35–48.

12. Bourguignon L, Gunja-Smith Z, Iida N i wsp. CD44v3,8–10 is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 206–215.
13. Bernet V, Anderson J, Vaishnav Y i wsp. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4792–4796.
14. Saggiorato E, Cappia S, De Giuli P i wsp. Galectin-3 is a presurgical immunocytochemical marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5152–5158.
15. Savin S, Cvejić D, Janković M. Expression of galectin-1 and galectin-3 in human fetal thyroid gland. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 479–483.
16. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995; 147: 815–822.
17. Johansson C, Nilsson O, Baeckstrom i wsp. Novel epitopes of the CA50-carrying antigen: chemical and immunochemical studies. *Tumor Biology* 1991; 12: 159–170.
18. Kobayashi K, Sakamoto J, Tsuyoshi K i wsp. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 919–924.
19. Xiao-Feng Sun, Hong Zhang. Expression of tumor-related antigens Lewis-a, Lewis-b, X, Y, SPan-1 and CEA in relation to differentiation and prognosis in rectal adenocarcinomas. *APMIS* 1996; 104: 784–788.
20. Murata K, Egami H, Shibata Y i wsp. Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis-a, Lewis-b, Lewis-x, Lewis-y, CA19-9, CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 67–75.
21. Lipponen P, Eskelinen M. Expression of C-50 antigen as a prognostic variable in transitional cell bladder tumors. *Br J Urol* 1993; 71: 192–198.
22. Idikio H, Manickavel V. Correlation of blood group antigen expression and oncogene-related proteins in malignant prostatic tissues. *Path Res Pract* 1991; 187: 189–197.
23. Idikio HA, Manickavel V. A, B, H, and Lewis-a and Lewis-b blood group antigens in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptor and disease status. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119: 486–492.
24. Vierbuchen M, Schroder S, Larena A, Uhlenbruck G, Fischer R. Native and sialic acid masked Lewis(a) antigen reactivity in medullary thyroid carcinoma. Distinct tumour-associated and prognostic relevant antigens. *Virchows Arch* 1994; 424: 205–211.
25. Vierbuchen M, Larena A, Schroder S i wsp. Blood group antigen expression in medullary carcinoma of the thyroid. An immunohistochemical study on the occurrence of type 1 chain-derived antigens. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992; 62: 79–88.
26. van Hoeven K, Kovatich A, Miettinen M. Immunocytochemical evaluation of HBME-1, CA 19-9, and CD15 (Leu-M1) in fine-needle aspirates of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 1998; 18: 93–97.
27. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G i wsp. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3015–3020.
28. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T i wsp. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999; 85: 2475–2484.
29. Giannini R, Faviana P, Cavinato T i wsp. Galectin-3 and oncofetal-fibronectin expression in thyroid neoplasia as assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunocytochemistry in cytologic and pathologic specimens. *Thyroid* 2003; 13: 765–770.
30. Pisani T, Vecchione A, Giovagnoli M. Galectin-3 immunodetection may improve cytological diagnosis of occult papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 1111–1112.
31. Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R i wsp. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2004; 45: 493–500.
32. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S i wsp. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Human Pathol* 2000; 31: 428–433.
33. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M i wsp. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; 357: 1644–1650.
34. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H i wsp. Immunostaining of galectin-3 and CD44v6 using fine-needle aspiration for distinguishing follicular carcinoma from adenoma. *Diagn Cytopathol* 2004; 31: 392–396.
35. Ikeda Y, Mori M, Kajiyama K i wsp. Immunohistochemical expression of sialyl Tn, sialyl Lewis a, sialyl Lewis a-b-, and sialyl Lewis x in primary tumor and metastatic lymph nodes in human gastric cancer. *J Surg Oncol* 1996; 62: 171–176.
36. Fasano M, Sabatini M, Wiczorek R i wsp. CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors. A role in histogenesis. *Cancer* 1997; 80: 34–41.
37. Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann i wsp. Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumor progression. *Histopathology* 1998; 33: 107–116.
38. Wasielewski R, Rhein A, Werner M i wsp. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997; 57: 2501–2507.
39. Kapran Y, Ozbey N, Molvalilar S i wsp. Immunohistochemical detection of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in papillary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 578–585.
40. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas i wsp. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 1998; 185: 71–78.