Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI XCI, knj. 30.

Rezaković, Džemal

2002

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/bd15ed37-b36d-4fde-9b5a-2482564851dc

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

ISSN 1512-8245



AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XCI

Odjeljenje medicinskih nauka

Knjiga 30

Centar za medicinska istraživanja

Knjiga 1

Redakcioni odbor

Jela Grujić-Vasić, Faruk Konjhodžić, Slobodan Loga

Urednik

Džemal Rezaković
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 2002

Imunohistohemijska studija epitelne displazije u ravnoj upalno promijenjenoj sluznici debelog crijeva

Aleksandar Nikulin[1)], Svjetlana Radović[2)], Ivan Selak [2)]

Epitelna displazija (ED) je prekancerozna lezija jednorednog i višeslojnog epitela. Radi se o specifičnom stanju epitela, čija pojava povećava rizik od nastanka karcinoma. Kod ED javlja se pojačana proliferacija i dediferencijacija stanica, koje vode razvoju epitelnih abnormalnosti. ED je dobro diferenciran skup morfoloških entiteta i predstavlja morfološku ekspresiju jednog stepena zbivanja koji nastaju na putu formiranja karcinoma. Dinamika progredirajućih promjena u ED koja nastaje u ravnoj mukozi kolona, poznata je samo na osnovu morfoloških zbivanja, dok su zbivanja koja nastaju na molekularnom nivou uglavnom nepoznata. Molekularna odstupanja prethode i diktiraju stanični fenotip, ali nisu primjetna pri svjetlosnoj mikroskopiji preparata bojenih standardnom hematoksilin-eozin metodom. Imunohistohemijska bojenja omogućavaju detekciju dijagnostički vrijednih antigena, na osnovu čije količine i načina prezentiranja se može suditi o procesima preobrazbe koji nastupaju u tkivu. U transformišućim stanicama dolazi do promjena u čitavom nizu antigena, čijim se ispitivanjem, na posredan način, mogu dobiti informacije o funkcionalnim zbivanjima unutar stanica.

Cilj

Cilj rada je da se primjenom široke palete antitijela za različite antigene rezidentnih stanica, dođe do saznanja o biološkom karakteru ED koja je nastala u ravnoj sluznici kolona. Ispitat će se: u kom stepenu ED, koji je određen na osnovu tradicionalnih morfoloških kriterija, dolazi do promjene u načinu prikazivanja pojedinih antigena (pojave ili gubitka antigena, povećanja ili smanjenja njihove količine, promjene lokacije antigena, promjene intenziteta obojenosti antigena); za koji su stepen intenziteta ED vezane ove promjene; da se ispita obim stanične proliferacije koji određuje stepen agresivnosti lezije; da li je ED praćena promjenom u brojnosti neuroendokrinih

1) Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

2) Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

stanica, na osnovu čega se može indirektno suditi o količini prisutnih hormona koje one stvaraju, a koji imaju upliva na održanje i ponašanje populacije epitelnih stanica; da se odredi brojnost perikriptalnih fibroblasta, stanica mezenhimalnog porijekla, koji učestvuju u regulaciji rasta i diferencijacije epitelnih stanica; da se odrede eventualne promjene u bazalnim membranama žljezdanih kripti, na osnovu čega se mogu dobiti informacije o zbivanjima na nivou ekstracelularnog matriksa, u kojem su BM jedna od osnovnih komponenti; odrediti ulogu celularnog imunološkog odbrambenog sustava u nastanku i progresiji ED, kao i to da li se na osnovu karaktera mononuklearne stanične reakcije može predvidjeti dalje ponašanje ispitivane lezije; sagledavanjem dobijenih relevantnih podataka odrediti eventualnu inicijalnu tačku maligne transformacije, odnosno njenu vezanost za određeni stadij ED.

Materijal i metode

Pregledat će se biopsijski uzorci ravne sluznice kolona najmanje 250 pacijenata, kod kojih se pri rutinskom endoskopskom pregledu postavi dijagnoza upalnog procesa bilo koje etiologije. Iz tekućeg obdukcionog materijala, uzet će se biopsijski uzorci sluznice debelog crijeva 40 pacijenata, kod kojih niti makroskopskim, a potom, niti mikroskopskim pregledom ne bude nađeno oboljenje debelog crijeva. Također, iz rutinskog obdukcionog materijala uzet će se biopsijski uzorci tkiva adenokarcinoma kolona 40 pacijenata, kod kojih se bude radilo o tzv. karcinomu de novo. Biopsijski uzorci normalne sluznice kolona i tkiva adenokarcinoma kolona poslužit će kao kontrola. Svi biopsijski uzorci bit će bojeni standardnom hematoksilin-eozin metodom. Uzorci 250 pacijenata će na osnovu karaktera morfološke lezije biti razvrstani u jednu od dvije kategorije promjena: kategoriju upalno-regenerativnih i kategoriju displastičnih lezija. Za svaki slučaj upalno-regenerirajućih promjena i ED, izvršit će se numerička procijenjena intenziteta lezije (1,2). Svi biopsijski uzorci će potom biti imunihostohemijski bojeni u cilju identifikacije čitavog niza antigena: za epitelne stanice (CK klon 116, CK 7, CK LMW 8, CK HMW 34 E 12, CK 10/13, CK 18, CK 19, CK 20, EMA); za sekrecijske produkte epitelnih stanica (CEA i SC); za neuroendokrine stanice (chromogranin A); za antigene koji su pokazatelji dinamike stvaranja novih (proteini Bcl-2 i Ki-67) i izumiranja starih epitelnih stanica (protein p53); antigene miofibrilarnih perikriptalnih stanica koje su mezenhimalnog porijekla (alfa-aktin glatkih mišićnih stanica, mišićno-specifični aktin, vimentim i dezmin); za kolagen tipa IV, koji je jedna od sastavnih komponenti bazalne membrane žljezdanih kripti; za antigene imunokompetentnih stanica lamine proprie -T limfocite (CD 45 RO), B limfocite (CD 20) i makrofage (CD 68). Za svaki ispitivani antigen, zavisno od njegove vrste, sačinjen je imunohistohemijski status koji je obuhvatio procjenu: brojnosti imunoreaktivnih stanica, koja je određena semikvantitativnom metodom; intenziteta obojenosti antigena;

lokaciju antigena unutar stanica (apsorptivnih, peharastih i nediferenciranih) odnosno unutar kripti; načina prikazivanja kolagena tipa IV oko žljezdanih kripti; tipizacije stanica lokalnog imunološkog odgovora i određivanje njihovog položaja u odnosu na leziju i same epitelne stanice. Pri mikroskopskoj evaluaciji imunohistohemijski bojenih preparata bit će korištena opće prihvaćena semikvantitativna metoda procjene antigen pozitivnih stanica. Za svako primijenjeno antitijelo bit će urađen odgovorajući protokol verifikacije i kvantifikacije nađenih promjena.

Očekivani rezultati

Nakon patohistološke evaluacije prisustva upalno-regenerativnih i displastičnih lezija, kao i procjene njihovog intenziteta, pristupilo bi se analizi istih tih tkivnih uzoraka bojenih imunohistohemijskom metodom sa čitavim nizom različitih antitijela.

U toku nastanka i daljeg razvoja ED u ravnoj mukozi kolona, nastaju promjene u sintezi staničnih proteina, bilo da se radi o onima koji su sastavni dijelovi citoskeletona, stanične membrane ili da su produkti stanične sekrecije (3, 4, 5, 6, 7). Keratinski polipeptidi (citokeratini, CK) se u epitelnim stanicama mukoze kolona zapažaju u vidu difuznog citoplazmatskog bojenja, koje je različitog intenziteta i količine, u ovisnosti od tipa epitelnih stanica i od oblika epitelne lezije. Očekuju se promjene u načinu njihove ekspresije u sklopu displastičnih lezija.

Promjene u načinu prikazivanja bcl-2 proteina (8,9) i proteina p53 (10, 11) u ED ravne mukoze kolona, ukazivat će na to da je došlo do mutacija gena bcl-2 i p53 i da je mutacija uključena u genezu ED.

U procesu razvoja ED, pored niza staničnih poremećaja, dolazi i do pojačane stanične proliferaciie, koja se može pratiti kroz ekspresiju proteina Ki-67 (12).

Bit će ispitivano ponašanje endokrinih stanica mukoze kolona (13), koje se nalaze unutar kripti, ali i u perikriptalnoj zoni.

U toku nastanka i razvoja ED u ravnoj mukozi kolona, očekuje se da promjenama nisu zahvaćene samo epitelne, već i mezenhimalne stanice, kao i neke strukture ECM. Ispitivanja razvoja PKF (14, 15) u svjetlu njihove diferencijacije, proliferacije i genetskih zbivanja, mogu biti od velike pomoći u razumijevanju odnosa između fenotipa i genotipa ovih stanica, što će, nedvojbeno, omogućiti još bolje definisanje rizika od nastanka karcinoma kod pacijenata sa tipom morfoloških lezija koje su u ovoj studiji i istraživane.

Kolagen tipa IV, kao sastavna komponenta BM, u displastično izmijenjenoj ravnoj mukozi kolona vierovatno će u načinu prikazivanja pokazivati stanovit stepen anomalija, čiji će obim i način korelacije sa jačinom ED biti istražen. Modifikacija u prikazivanju BM uvijek je ekspresija poremećene interakcije na relaciji stanica-BM, koja mora da je uključena u proces razvoja ED (16).

Pokušat će se odrediti uloga celularnog imunološkog odgovora unutar premaligne lezije, te utvrditi da li se na osnovu karaktera stromalne mononuklearne stanične reakcije može napraviti razlika između lezije koja ima bolju, odnosno goru prognozu, tj. koja progredira u karcinom.

Zaključak

A propos promjena na molekularnom nivou, sumiranjem svih dobijenih rezultata, pokušat će se odrediti inicijalna tačka maligne transformacije u višestepenom procesu maligne preobrazbe epitela sluznice kolona. Spoznajom promjena na metaboličkom nivou, dobit će se precizniji podaci o kvantumu malignog potencijala pojedinih stepena ED. Kako promjene na morfološkom nivou zaostaju za promjenama na molekularnom nivou, a koje se daleko ranije pojavljuju, imunohistohemijska metoda je veoma pogodna za ovu vrstu istraživanja. Istraživanje je od praktičnog značaja i važnosti i za kliničare gastroenterologe, jer bolje poznavanje prirode ED ima uticaja na terapeutski tretman, koji nije jednak za sve stepene ED.

Literatura

1. **Nikulin A, Radović S.:** *Razrada morfoloških kriterija za dijagnosticiranje displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva (Analysis of morphological criteria for the diagnosis of dysplastic changes in the colon mucosa).* Radovi ANUBiH, Odjeljenje medicinskih nauka 1991; 25: 33-43.
2. **Radović S.:** *Definicija morfoloških kriterija za dijagnosticiranje displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva.* Magistarski rad 1989; Sarajevo.
3. **Heatley MK.:** *Cytokeratins and cytokeratin staining in diagnostic histopathology.* Histopathology 1996; 28: 479-483.
4. **Sloane JP, Ormerod MG.:** *Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology.* Cancerl981; 47: 1789-1793.
5. **Haynes WDG, Shertock KL, Skinner JM, Whitehead R.:** *The ultrastructural immunohistochemistry of oncofetal antigens in large bowel carcinomas.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopath 1985; 405: 263-275.
6. **Vogel CA, Galmiche MC, Westermann P, Sun LQ, Plegrin A, Folli S. et al.:** *Carcinoembryonic antigen expression, antibody localization and immunophotodetection of human colon cancer liver metastases in nude miče: a model for radioimmunotherapy.* Int J Cancer 1996; 67: 294-302.
7. **Weisz-Carrington P, Poger ME, Lamm PE.:** *Secretory immunoglobulins in colonic neoplasm.* Am J Pathol 1976; 85: 303-316.

8. **Bronner PM, Culin C, Reed JC, Furth EE.:** *The bcl-2 roto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model.* Am J Pathol 1995; 146; 20-26.
9. **Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S.:** *Bcl-2 protein expression and long term survival in breast cancer.* Am J Pathol 1994; 145: 1191-1198.
10. **Friedrich K, Dimmer V, Haroske G, Meyer W, Theissig F, Thieme B, Kunze KD.:** *Morphological heterogeneitv of p53 positive and p53 negative nuclei in breast cancers stratified by clinicopathological variables.* Analytical Cellular Pathology 1997; 14: 111-123.
11. **Leonardi E, Cristofori A, Caffo O, Dalla Palma P.:** *Cytometric DNA analysis and prognostic bioniarkers in breast carcinoma, Expression of p53 product in the different ploidv classes.* Analytical Cellular Pathology 1997; 15: 31-45.
12. **Linden MD, Ma CK, Kubus J, Brown RD, Zarbo RJ.:** *Ki-67 and proliferating celi nuclear antigen tumor proliferative indices in DNA diploid colorectal adenocarcinomas.* Am J Clin Pathol 1993; 100: 206-212.
13. **Van den Ingh H, Van den Broek L, Verthofstad A.:** *Neuroendocrine cells in colorectal adenomas.* J Pathol 1986; 148: 231-237.
14. **Yao T, Tada S, Tsuneyoshi M.:** *Colorectal counterpart of gastric depressed adenoma with special reference to the development of pericriptal fibroblasts.* Am J Surg Pathol 1994; 18: 559-568.
15. **Yao T, Talbot IC.:** *The demonstration of pericriptal fibroblasts in background mucosa and dysplasia complicating ulcerative colitis.* Histopathology 1996; 28: 325-3.
16. **Visser R, Van der Beek JMH, Havenith MG, Cleutjens J, M Bosman FT.:** *Immunocytochemical detection of basement membrane antigens in the histopathological evaluation of laryngeal dysplasia and neoplasia.* Histopathology 1986; 10: 171-180.