

BARBARA ŚLESIAK¹, TOMASZ BOJAROWSKI², JOLANTA ADAMIAK¹, ANTONINA HARŁOZIŃSKA¹

Efekt polowy ekspresji trzech immunologicznie różnych form białka TP53 i antygenu Ki-67 w gruczolakoraku jelita grubego*

Field Effect of the Expression of Three Immunologically Different TP53 Forms and Ki-67 Antigen in Colon Adenocarcinoma

¹ Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej AM we Wrocławiu

² Katedra Onkologii i Klinika Ginekologii Onkologicznej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Wielostopniowy proces nagromadzenia się molekularnych zmian w genach warunkujących proces karcynogenezy w komórkach błony śluzowej jelita grubego może kreować efekt polowy charakteryzujący się obecnością morfologicznie prawidłowych, a genetycznie zmienionych komórek nabłonkowych.

Cel pracy. Ocena efektu polowego ekspresji trzech konformacyjnie różnych form białka TP53 i antygenu Ki-67 w gruczolakorakach jelita grubego z uwzględnieniem konwencjonalnych kliniczno-patologicznych zmiennych oraz w błonie śluzowej otaczającej bezpośrednio zmianę i odległej 1, 5 i 7–10 cm od zmiany złośliwej.

Materiał i metody. Przebadano 165 wycinków pochodzących z ogniska nowotworowego i błony śluzowej 33 przypadków gruczolakoraka jelita grubego. Zastosowano trzy przeciwciała monoklonalne anty-TP53 wykrywające różne konformacyjnie/immunologicznie formy białka TP53: DO7 reagujące zarówno z dziką, jak i zmutowaną formą białka P53; PAb240 rozpoznające zmutowaną formę TP53; PAb1620 reagujące z dzikim typem białka. Wszystkie immunobarwienia wykonano na skrawkach mrożeniowych, stosując polimerowy system detekcji sprzężony z peroksydazą chrzanową (EnVision).

Wyniki. Ekspresja białka TP53 w centrum zmiany złośliwej była wykrywana wszystkimi trzema przeciwciałami w zróżnicowanym odsetku przypadków (DO7 – 70%, PAb240 – 61%, PAb1620 – 27%) i spadała w miarę wzrostu odległości od centrum ogniska nowotworowego. W prawidłowej błonie śluzowej odległej 7–10 cm od zmiany wykryto białko TP53 reagujące z DO7 (15%) i PAb240 (3%) przy braku reaktywności z PAb1620. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji tych przeciwciał w zależności od stopnia zróżnicowania i zaawansowania klinicznego nowotworu. Indeks proliferacyjny (IP) był wysoki w zmianie nowotworowej i tkance bezpośrednio przyległej i spadał w miarę wzrostu odległości od zmiany złośliwej. Zazwyczaj wysokiemu IP towarzyszył wysoki odsetek TP53+ komórek.

Wnioski. Zastosowane różne przeciwciała anty-TP53 określają poziom wykrywalności zmian konformacyjnych TP53 w badaniach immunohistochemicznych. Wykrycie pojedynczych TP53+ przypadków w prawidłowej błonie śluzowej, nawet odległej 7–10 cm od zmiany, może wskazywać na praktyczne uzasadnienie uwzględniania możliwie szerokiego marginesu w przypadku operacyjnego usuwania gruczolakoraka jelita grubego (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 5, 875–882).

Słowa kluczowe: gruczolak jelita grubego, błona śluzowa otaczająca zmianę, efekt polowy, immunohistochemia, konformacyjnie różne formy TP53, antygen Ki-67.

Abstract

Background. Multistep accumulation process of molecular alterations in genes which are a requisite of carcinogenesis in colon mucosa epithelial cells may create field effect characterized by the presence of morphologically normal but already genetically altered cells.

Objectives. The estimation of the field effect of the three conformationally different forms TP53 and Ki-67 antigen expression in colon adenocarcinomas taking into account clinico-pathological variables and in morphologically normal colonic mucosa sampled at increasing distance (adjacent mucosa, 1, 5, 7–10 cm) from tumor.

* Praca wykonana w ramach grantu Akademii Medycznej GU 302 i działalności statutowej Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej.

Materials and Methods. One hundred sixty five samples from neoplastic foci and normal mucosa tissue were evaluated from 33 cases of colon cancer. Three monoclonal antibodies detecting conformationally/immunologically different TP53 forms were applied: DO7 antibody reacting with both wild and mutant TP53 protein; PAb240 antibody – recognizing mutant TP53 form, and PAb1620 reacting with conformationally wild-type TP53. All immunostaining on frozen tissue samples with horseradish peroxidase polymer system detection (EnVision) were performed.

Results. The expression of the TP53 protein in the centre of malignant lesion detecting by three monoclonal antibodies in different percentage of cases were found (DO7 – 70%, PAb240 – 61%, PAb1620 – 27%) and decreased in normal mucosa in relation to the distance from lesion. In normal colon mucosa tissue at the distance 7–10 cm from tumor the presence of TP53 protein detecting with DO7 (15%) and PAb240 (3%) was found while it was undetectable with PAb1620. No essential differences in the expression of these antibodies in relation to grading and staging were visible. Usually the high level of proliferative activity was accompanied by high percentage of TP53+ cells.

Conclusions. The application of different anti-TP53 antibodies define the level of conformationally TP53 alterations. Detectable TP53 protein in normal colon mucosa located at 7–10 cm from the tumor may indicate of the maintenance necessity of wide resection margin in surgery of colorectal cancer (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 5, 875–882).

Key words: colon adenocarcinoma, surrounding cancer mucosa tissue, field effect, immunohistochemistry, conformationally different TP53 forms, Ki-67 antigen.

Gruzołakorak jelita grubego rozwija się na bazie komórek błony śluzowej, w których może dochodzić do wielostopniowego nagromadzenia się molekularnych zmian w genach warunkujących proces karcynogenezy [1]. Ten wielostopniowy proces może kreować efekt polowy charakteryzujący się obecnością morfologicznie prawidłowych, a genetycznie już zmienionych komórek nabłonkowych [2].

Dotychczas efekt polowy był badany stosunkowo rzadko, chociaż jego występowanie zostało opisane w zmianach nowotworowych wywodzących się z niektórych narządów [3–7]. W badaniach własnych istnienie efektu polowego związanego z występowaniem antygenu karcynoembrionalnego (CEA) i antygenu Ki-67 zostało wykazane w gruczołakorakach jelita grubego [8, 9].

Defekt w genie *TP53* jest najczęściej opisywaną molekularną zmianą w rozwoju ludzkich nowotworów złośliwych związaną z utratą negatywnej kontroli cyklu komórkowego i utrzymaniem integralności genomu [10, 11]. Istnieją jednak pojedyncze doniesienia wskazujące, że wykrywanie ekspresji białka TP53 jest uzależnione od stosowanych przeciwciał wykrywających różne konformacyjnie/immunologicznie formy TP53 [12, 13].

Aktywność proliferacyjną komórek najlepiej określa przeciwciało monoklonalne Ki-67 rozpoznające jądrowy antygen Ki-67 podlegający ekspresji we wszystkich fazach cyklu komórkowego z wyjątkiem fazy G0 [14, 15]. W wielu doniesieniach wykazano, że ocena indeksu proliferacyjnego dostarcza istotnych informacji związanych z biologiczną agresją nowotworu [16–18].

W pracy przebadano nadekspresję białka TP53 i aktywność proliferacyjną w gruczołakorakach jelita grubego z uwzględnieniem efektu polowego, oceniając ekspresję badanych markerów w centrum zmiany złośliwej, tkance bezpośrednio otaczającej i oddalonej 1, 5 i 7–10 cm od ogniska

nowotworowego. Po raz pierwszy zastosowano w tym celu trzy różne przeciwciała anty-TP53 (DO7, PAb 240 i PAb1620) wykrywające odmienne formy konformacyjne tego białka oraz przeciwciało Ki-67. Dodatkowo przebadano relacje między reaktywnością wszystkich przeciwciał i konwencjonalnymi kliniczno-patologicznymi zmiennymi.

Material i metody

Materiałem do badań były tkanki ze zmiany złośliwej jelita grubego uzyskane z zabiegów operacyjnych wykonanych w Katedrze Onkologii. Badaniami objęto 33 przypadki gruczołakoraka jelita grubego. Rozpoznanie histopatologiczne wykonano na podstawie rutynowego barwienia, zgodnie z zaleceniami WHO w Pracowni Histopatologicznej Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu. Spośród przebadanych gruczołakoraków 18 pochodziło od mężczyzn w wieku 41–79 lat (średnia wieku 61 lat) i 15 od kobiet w wieku 49–80 lat (średnia wieku 69 lat).

Z materiału operacyjnego od każdego pacjenta z rozpoznaniem gruczołakorakiem pobierano również błonę śluzową jelita grubego bezpośrednio otaczającą zmianę złośliwą oraz jej fragment z odległości 1, 5 i 7–10 cm od guza.

Wśród gruczołakoraków wyodrębniono 3 przypadki wysoko zróżnicowane (G1), 26 – średnio zróżnicowanych (G2) i 4 – nisko zróżnicowane (G3). Na podstawie klasyfikacji Dukesa wyróżniono: 2 przypadki – Dukes A, 15 – Dukes B, 12 – Dukes C i 4 przypadki w stadium zaawansowania choroby Dukes D.

W prospektywnych badaniach immunohistochemicznych zastosowano następujące przeciwciała monoklonalne anty-TP53: DO7, PAb 240 (Dako Cytomation, Dania) oraz PAb 1620 (otrzy-

mane w ramach współpracy z Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of the Saarland, Hamburg, Niemcy) oraz przeciwciało Ki-67 (Novocastra, Wielka Brytania). Robocze rozcieńczenia ustalono dla białka TP53 odpowiednio: 1/50, 1/50, 1/20 i antygenu Ki-67 – 1/50. Przeciwciało DO7 reaguje zarówno z dziką, jak i zmutowaną formą białka TP53, rozpoznając epitop zlokalizowany między 21 a 25 aminokwasem [19]. PAb240 rozpoznaje konformacyjnie zależny epitop obecny w większości zmutowanych białek TP53 w pozycji między 213–217 aminokwasem [20]. Przeciwciało PAb1620 reaguje z dzikim konformacyjnie typem białka [20].

Wszystkie immunobarwienia wykonano na skrawkach mrożeniowych utrwalonych acetonem, stosując polimerowy system detekcji sprzężony z peroksydazą chrzanową (EnVision, Dania).

Do każdej serii immunobarwień stosowano pozytywną i negatywną kontrolę.

Za dodatni wynik przyjęto immunobarwienie, w którym co najmniej 5% komórek wykazywało jądrową lokalizację badanego białka w 15–20 oglądanych polach widzenia.

Wyniki

Ekspresję DO7, PAb240, PAb1620 z uwzględnieniem stopnia zróżnicowania nowotworu i klinicznego zaawansowania choroby (klasyfikacja Dukesa) przedstawiono w tabeli 1.

Jak wynika z tabeli, w zależności od zastosowanego przeciwciała istnieją różnice w odsetku dodatnio reaktywnych przypadków. Ekspresja TP53 wykrywana przeciwciałem DO7 była widoczna w najwyższym odsetku badanych przypad-

ków (70%), w nieco niższym (61%) z zastosowaniem PAb240 i najniższym (27%) w przypadku użycia przeciwciała PAb1620. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji trzech przeciwciał w gruczolakorakach w stopniu zróżnicowania G1 ani między DO7 i PAb240 w gruczolakorakach średnio i nisko zróżnicowanych, przeciwciało PAb1620 reagowało natomiast znacznie słabiej.

Jedynie w dwóch przypadkach, sklasyfikowanych jako Dukes A, wykazano, że zmutowana forma białka TP53 może pojawiać się w bardzo wczesnych etapach rozwoju gruczolakoraka jelita grubego. W wyższych stadiach Dukes B–C, które obejmowały bardziej reprezentatywne podgrupy chorych, wykazano wzrost odsetka TP53+ przypadków. Najniższe wartości wykrywalnego białka TP53 uzyskano z przeciwciałem PAb1620 definiującym dziką formę TP53 (tab. 1).

W tkance bezpośrednio przylegającej do zmiany złośliwej (tab. 2) odsetek TP53+ komórek wykrywanych przez DO7 był niższy niż w centrum zmiany, a w przypadku PAb240 i PAb1620 występował na poziomie porównywalnym do ekspresji w zmianie nowotworowej (tab. 1). W błonie śluzowej odległej 1, 5 i 7–10 cm od ogniska nowotworowego odsetek TP53 dodatnich przypadków obniżał się. W tkance najbardziej oddalonej od zmiany złośliwej (7–10 cm) TP53 było niewykrywalne przeciwciałem PAb1620 (tab. 2).

Rozpatrując stopień zróżnicowania nowotworu i stadium klinicznego zaawansowania choroby z uwzględnieniem efektu polowego ekspresji białka TP53, wykazano, że w błonie śluzowej nowotworów średnio zróżnicowanych, odległej 1 i 5 cm od zmiany złośliwej białko TP53 było wykrywalne w niewielkim odsetku przypadków (8%, 4%) i nie zależało od zastosowanego przeciwciała. W błonie

Tabela 1. Immunoreaktywność przeciwciał monoklonalnych: DO7, PAb240, PAb1620 w gruczolakoraku jelita grubego

Table 1. Immunoreactivity of monoclonal antibodies: DO7, PAb240, PAB1620 in colon adenocarcinoma

Gruczolakorak jelita grubego (Colon adenocarcinoma)	Przeciwciała monoklonalne – dodatnie/badane (Monoclonal antibodies – positive/studied) (%)		
	DO 7	PAb 240	PAb 1620
Zmiana złośliwa (Malignant lesion)	23/33 (70)	20/33 (61)	9/33 (27)
Stopień zróżnicowania (Grade of differentiation)			
G1	2/3 (67)	2/3 (67)	2/3 (67)
G2	17/26 (65)	14/26 (54)	6/26 (23)
G3	4/4(100)	4/4(100)	1/4 (25)
Klasyfikacja Dukesa (Dukes' classification)			
A	2/2(100)	2/2 (100)	1/2 (50)
B	8/15 (53)	7/15 (47)	3/15 (20)
C	10/12 (83)	9/12 (75)	3/12 (25)
D	3/4 (75)	2/4 (50)	2/4 (50)

Tabela 2. Immunoreaktywność przeciwciał monoklonalnych: DO7, PAb240, PAb1620 w gruczolakoraku jelita grubego z uwzględnieniem miejsca pobrania wycinka**Table 2.** Immunoreactivity of monoclonal antibodies: DO7, PAb 240, PAB 1620 in colon adenocarcinoma considering sampled place

Miejsce pobrania wycinka (Place of sampled tissue)	Przeciwciała monoklonalne – dodatnie/badane (Monoclonal antibodies – positive/studied) (%)		
	DO 7	PAb 240	PAb 1620
Błona śluzowa bezpośrednio przyległa do zmiany (Adjacent mucosa tissue)	17/33 (52)	19/33 (58)	9/33 (27)
Błona śluzowa odległa 1 cm od zmiany (Surrounding mucosa tissue sampled at 1 cm from lesion)	2/33 (6)	3/33 (9)	2/33 (6)
Błona śluzowa odległa 5 cm od zmiany (Surrounding mucosa sampled at 5 cm from lesion)	1/33 (3)	1/33 (3)	1/33 (3)
Błona śluzowa odległa 7–10 cm od zmiany (Surrounding mucosa sampled at 7–10 cm from lesion)	5/33 (15)	1/33 (3)	0/33 (0)

śluzowej nowotworów nisko zróżnicowanych, pobranej z odległości 1, 5, 7–10 cm nie wykazano dodatniej reakcji z żadnym z zastosowanych przeciwciał. W komórkach nabłonkowych błony śluzowej nowotworów wysoko zróżnicowanych z odległości 1 cm od zmiany wykryto znaczny odsetek TP53+ przypadków reagujących tylko z przeciwciałem PAb240 (33%). Przeciwciała PAb1620 nie reagowało z błoną śluzową pochodzącą z dalszych odległości, przeciwciała DO7 wykrywało natomiast TP53 w błonie śluzowej odległej 7–10 cm od centrum zmiany złośliwej.

Tabela 3 przedstawia zależności między ekspresją różnych konformacyjnie form białka TP53 i klasyfikacją Dukesa z uwzględnieniem odległości pobrania wycinka błony śluzowej. Ekspresja odmiennych konformacyjnie form TP53 wykrywanych z użyciem trzech przeciwciał była zróżnicowana. Jedynie w tkance pochodzącej z bezpośredniego marginesu ogniska nowotworowego wykryto obecność różnych konformacyjnie form białka TP53 niezależnie od stadium klinicznego zaawansowania. Mała liczba chorych sklasyfikowanych jako Dukes A i D uniemożliwia jednak ocenę zależności między ekspresją różnych form białka TP53 a tymi stadiami klinicznymi. Interesujące wydaje się stwierdzenie, że białko TP53 było wykrywalne w znacznym odsetku przypadków sklasyfikowanych jako Dukes C, nawet w błonie śluzowej odległej 7–10 cm od zmiany.

Tabela 4 przedstawia aktywność proliferacyjną określaną przeciwciałem Ki-67 z uwzględnieniem centrum zmiany i błony śluzowej otaczającej i odległej od zmiany. Odsetek komórek z jądrową lokalizacją antygenu Ki-67 bez uwzględnienia stopnia zróżnicowania nowotworu i stadium zaawansowania choroby, był znacząco wyższy w zmianie nowotworowej i tkance bezpośrednio przyległej do zmiany i spadał w miarę wzrostu odległości od ogniska nowotworowego.

Indeks proliferacyjny osiągał najwyższe wartości w stopniu zróżnicowania G1 i G2 nowotworu w porównaniu do czterokrotnie niższych wartości w G3. Ta podgrupa chorych zawierała jednak tylko 4 przypadki. Aktywność proliferacyjna utrzymywała się na wysokim poziomie we wszystkich stadiach zaawansowania według Dukesa, osiągając najwyższe wartości w stadium Dukes C i D. Jądrowa ekspresja antygenu Ki-67 dotycząca odsetka dodatnich komórek oraz stopnia intensywności immunobarwienia była zróżnicowana zarówno wewnątrz-, jak i międzyguzowo.

Wyniki wskazują, że zazwyczaj wysokiemu indeksowi proliferacyjnemu towarzyszy wysoki odsetek TP53 dodatnich komórek. Obecność P53 dodatnich komórek w błonie śluzowej nawet w odległości 5, 7–10 cm od zmiany była zwykle związana ze znacznym nasileniem procesu proliferacyjnego, wykrywalnego w 20–30% komórek, chociaż wartości prawidłowe mieszczą się w granicach do 5%.

Omówienie

Gen *TP53* i białko TP53 są centralnym elementem procesów i wzajemnych powiązań w wewnątrzkomórkowej sieci onkoproteinowej [11]. Prawidłowe i patologicznie zmienione szlaki regulacyjne tych procesów są odpowiedzialne za końcowe losy poszczególnych komórek. Pozbawienie mechanizmów kontrolujących homeostazę organizmu może zapoczątkowywać rozrost nowotworowy ze wzrostem aktywności proliferacyjnej komórek, dlatego też określenie indeksu proliferacyjnego przez immunohistochemiczne oznaczanie jądrowej ekspresji antygenu Ki-67 ma istotne znaczenie w procesie powstawania i rozwoju nowotworu [21].

W badaniach własnych w gruczolakorakach nieszluzowych o stopniu zróżnicowania G1 i G2

Tabela 3. Immunoreaktywność przeciwciał monoklonalnych: DO7, PAb240, PAb620 w prawidłowej błonie śluzowej pobranej w różnych odległościach od gruczolakoraka jelita grubego z uwzględnieniem klasyfikacji Dukesa**Table 3.** Immunoreactivity of monoclonal antibodies: DO7, PAb240, PAB1620 of normal colon mucosa sampled at different distance from adenocarcinoma taking into account Dukes' classification

Miejsce pobrania wycinka (Place of sampled tissue)	Przeciwciała monoklonalne – dodatnie/badane (Monoclonal antibodies – positive/studied) (%)		
	DO 7	PAb 240	PAb 1620
Błona śluzowa bezpośrednio przyległa do zmiany (Adjacent mucosa tissue)			
Dukes A	2/2 (100)	1/2 (50)	0/2 (0)
B	6/15 (40)	7/15 (47)	4/15 (27)
C	5/12 (42)	8/12 (66)	3/12 (25)
D	4/4 (100)	3/4 (75)	2/4 (50)
Błona śluzowa odległa 1 cm od zmiany (Surrounding mucosa tissue sampled at 1 cm from lesion)			
Dukes A	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)
B	0/15 (0)	1/15 (7)	0/15 (0)
C	2/12 (17)	2/12 (17)	1/12 (8)
D	0/4 (0)	0/0 (0)	1/4 (25)
Błona śluzowa odległa 5 cm od zmiany (Surrounding mucosa sampled at 5 cm from lesion)			
Dukes A	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)
B	0/15 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)
C	1/12 (8)	1/12 (8)	1/12 (8)
D	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)
Błona śluzowa odległa 7–10 cm od zmiany (Surrounding mucosa sampled at 7–10 cm from lesion)			
Dukes A	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)
B	2/15 (13)	0/15 (0)	0/15 (0)
C	2/12 (17)	1/12 (8)	0/12 (0)

Tabela 4. Immunoreaktywność przeciwciała monoklonalnego Ki67 w gruczolakoraku jelita grubego z uwzględnieniem miejsca pobrania wycinka**Table 4.** Immunoreactivity of Ki-67 monoclonal antibody in colon adenocarcinoma considering sampled place

Miejsce pobrania wycinka (Place of sampled tissue)	Przeciwciała Ki-67 % dodatnich komórek – zakres (średnia wartość) (Ki-67 monoclonal antibody (% of positive cells – range) (mean value)
Centrum zmiany złośliwej (Middle of malignant lesion)	20–80 (60)
Błona śluzowa bezpośrednio przyległa do zmiany (Adjacent mucosa tissue)	20–90 (70)
Błona śluzowa odległa 1 cm od zmiany (Surrounding mucosa tissue sampled at 1 cm from lesion)	10–50 (20)
Błona śluzowa odległa 5 cm od zmiany (Surrounding mucosa sampled at 5 cm from lesion)	5–20 (5)
Błona śluzowa odległa 7–10 cm od zmiany (Surrounding mucosa sampled at 7–10 cm from lesion)	5–30 (5)

indeks proliferacyjny osiągał najwyższe wartości. Podobne obserwacje przedstawił w swej pracy Lanza et al. [22]. Najwyższe wartości indeksu proliferacyjnego wykryte w gruczolakorakach: Dukes C i D pozostają również w zgodzie z wynikami Kyzera i Gordona [17]. Wykazana wewnątrz- i międzyguzowa heterogenność aktywno-

ści proliferacyjnej pośrednio świadczy o indywidualnie zróżnicowanym działaniu i zaburzeniach w genach kontrolujących cykl komórkowy [11, 23]. Na podstawie dotychczasowych badań i obserwacji własnych można stwierdzić, że indeks proliferacyjny jest wartościowym markerem, który może służyć do określania grup pacjentów o podwyż-

szonym ryzyku wystąpienia miejscowej wznowy lub odległych przerzutów [17, 21]. Z wielu badań wynika również, że określenie aktywności proliferacyjnej może być pomocne w planowaniu odpowiedniej terapii adiuwantowej, nawet w mniej zaawansowanych stadiach choroby [17, 21, 23].

Ocena defektu funkcji genu i białka TP53 stanowi ważny element badań podstawowych z możliwą implikacją diagnostyczno-kliniczną, zwłaszcza w ocenie klinicznego przebiegu choroby [11]. Obecnie wiadomo, że zaburzenia w genie *TP53* wiążą się z gorszym rokowaniem i często są odpowiedzialne za niepowodzenia terapeutyczne, a jak wiadomo końcowy efekt leczenia w dużej mierze zależy od sprawnie działających mechanizmów regulacyjnych cyklu komórkowego i indukcji apoptozy przez *TP53* [11, 24].

Defekt w genie *TP53* występuje stosunkowo często w rozwoju raka jelita grubego i dotyczy ponad 50% przypadków. Nieliczne doniesienia [25, 26] wskazują, że ekspresja TP53 może być istotnym markerem efektu polowego. W niniejszej pracy zastosowano trzy różne przeciwciała monoklonalne DO7, PAb240, PAb1620 rozpoznające różne sekwencje epitopowe białka TP53 i po raz pierwszy użyto tych przeciwciał dla określenia efektu polowego w gruczolakoraku jelita grubego. Wyniki wskazują, że obraz ekspresji białka TP53 zależy od zastosowanego przeciwciała monoklonalnego. W zmianie złośliwej przeciwciała DO7, PAb240 wykrywały białko TP53 w zbliżonym odsetku przypadków (odpowiednio 70% i 61%), natomiast przeciwciała PAb1620 wykrywało białko TP53 w 27% przypadków. W obecnych badaniach z użyciem PAb1620 obserwowano dość często, oprócz lokalizacji jądrowej słaby dyfuzyjny odczyn cytoplazmatyczny. Epitop wykrywany przez przeciwciała PAb1620 nie jest dobrze zdefiniowany i zarówno mutacje, jak i niezależne od mutacji procesy częściowej denaturacji białka TP53 mogą niszczyć epitop wykrywany przez to przeciwciała. Dlatego też przeciwciała PAb1620 w badaniach immunohistochemicznych niezbyt precyzyjnie określa status TP53 w nowotworach człowieka [13].

Wyniki otrzymane w naszych badaniach dla przeciwciała DO7 mieszczą się w podawanych granicach opisywanych dla gruczolakoraków jelita grubego z wykazaną jądrową akumulacją i mutacją TP53 [27]. Przeciwciała DO7 wykrywało nieco większy odsetek przypadków niż PAb240, ale wszystkie dodatnio reagujące z przeciwciałem PAb240 przypadki dawały również wyniki dodatnie z przeciwciałem DO7.

Równoczesne występowanie białka TP53 wykrywanego przez trzy przeciwciała w obecnej pracy wykazano w 27% przypadków. Zróżnicowana reaktywność w pozostałych przypadkach wskazu-

je, że przeciwciała any-TP53 wbudowują się do różnych epitopów na cząsteczce białka TP53 określając poziom wykrywalności zmian konformacyjnych i udowadniając, że immunohistochemiczna analiza zależy od użytego przeciwciała monoklonalnego. W prawidłowym histologicznie nabłonku odsetek dodatnich wyników wykrywanych zarówno przeciwciałem DO7, jak i PAb240 znacząco spadał w porównaniu do zmiany złośliwej, potwierdzając występowanie efektu polowego zależnego od stopnia ekspresji białka TP53. Wyniki naszych badań mogą również potwierdzać, że większość mutacji w genie *TP53* jest bezpośrednio lub pośrednio włączona w transmisję sygnałów promujących rozwój raka z form nieinwazyjnych (rak *in situ*) do inwazyjnych tworzących bliższe i dalsze przerzuty [24]. Występowanie białka TP53 wykrywanego szczególnie przeciwciałem DO7 i PAb240 stwierdzono zarówno w centrum zmiany, jak i błonie śluzowej przyległej i odległej od ogniska nowotworowego w stadium klinicznego zaawansowania Dukes C. Wykrycie pojedynczych przypadków obecności zmutowanej formy białka TP53 w komórkach nabłonkowych błony śluzowej odległej 7–10 cm od zmiany złośliwej może wskazywać na praktyczne uzasadnienie pozostawiania i zachowywania możliwie szerokiego marginesu w przypadku operacyjnego usuwania gruczolakoraka jelita grubego.

Homann et al. [26] podkreślają, że wykrywanie nadekspresji TP53 w nabłonku odległym od guza w rakach głowy i szyi może z powodzeniem służyć do identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem rozwoju drugiego pierwotnego nowotworu.

Stosowane ostatnio nowoczesne techniki z użyciem mikromacierzy DNA potwierdzają istnienie efektu polowego, np. w raku prostaty [29], umożliwiając równoczesne znalezienie zmian w setkach genów. Niemniej wielu autorów [25, 26, 28] uważa, że zastosowanie nawet jednego lub kilku biomarkerów w definiowaniu efektu polowego pozwala na szybką i wiarygodną informację określającą zarówno margines bezpieczeństwa w przebiegu operacji, jak i możliwość ryzyka nawrotu choroby.

Wykrywanie konformacyjnych zmian w białku TP53 przez użycie różnych przeciwciał monoklonalnych z określeniem efektu polowego może być również pomocne w zrozumieniu funkcjonalnej roli TP53 definiującej biologiczne zachowanie guza oraz wyjaśnieniu wczesnych zaburzeń w sieci onkoproteinowej jako wskaźnika klinicznego przebiegu i możliwej odpowiedzi na stosowaną terapię u pacjentów z gruczolakorakami jelita grubego. Stwierdzony w naszych badaniach znaczący wzrost indeksu proliferacyjnego z towarzyszącą ekspresją białka TP53 w błonie śluzowej jelita grubego wskazuje na możliwość rozwoju nowotworów wtórnych lub wzrost ryzyka wznowy.

Podziękowania

Autorzy dziękują Pani mgr Monice Poprawskiej za pomoc techniczną w czasie wykonywania pracy.

Piśmiennictwo

- [1] **Harłodzińska-Szmyrka A:** Nowotwory jako choroba genów. *Post Bioch* 1995, 41, 7–15.
- [2] **Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer A, Leemans CR, Brakenhoff RH:** A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003, 63, 1727–1730.
- [3] **Frankin AA, Gazdar AF, Haney J, Wistuba II, La Rosa FG, Kennedy T, Ritchey DM, Miller YE:** Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 1997, 100, 2133–2137.
- [4] **Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ:** P53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1999, 59, 4784–4787.
- [5] **Chu TY, Shen CY, Lee HS, Liu HS:** Monoclonality and surface lesion-specific microsatellite alternations in premalignant and malignant neoplasia of uterine cervix: a local field effect of genomic instability and clonal evolution. *Genes Chromosomes Cancer* 1999, 24, 127–134.
- [6] **Forsti A, Louhelainen J, Soderberg M, Wijkstrom H, Hemminki K:** Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer. *Eur J Cancer* 2001, 37, 1372–1380.
- [7] **Stern RS, Bolshakov S, Nataraj AJ, Ananthaswamy HN:** P53 mutation in nonmelanoma skin cancers occurring in psoralen ultraviolet a-treated patients: evidence for heterogeneity and field cancerization. *J Invest Dermatol* 2002, 119, 522–526.
- [8] **Jothy S, Slesak B, Harłodzińska A, Lapinska J, Adamiak J, Rabczynski J:** Field effect of human colon carcinoma on normal mucosa: relevance of carcinoembryonic antigen expression. *Tumor Biol* 1996, 17, 58–64.
- [9] **Slesak B, Harłodzińska A, Adamiak J:** Field effect of CEA, Ki-67 and evaluation of local immune response in colon cancer. *Anal Cell Pathol* 1994, 6, 286–287.
- [10] **Webley KM, Shorthouse AJ, Royds JA:** Effect of mutation and conformation on the function of p53 in colorectal cancer. *J Pathol* 2000, 191, 361–367.
- [11] **Bartkowiak J, Rieske P:** Porównanie wyników badań immunohistochemicznych i molekularnych w ustalaniu stanu strukturalnego i aktywności białka P53. *Nowotwory* 1999, 9, 439–444.
- [12] **Würl P, Taubert H, Meye A, Berger D, Lautenschläger Ch, Holzhausen H-J, Schmidt H, Kalthoff H, Rath F-W, Dralle H:** Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft-tissue sarcomas: a multivariate analysis of five antibodies. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997, 123, 502–508.
- [13] **Harłodzińska A, Bar JK, Montemar M, Kartarius S:** Relations between immunologically different p53 forms, p21WAF1 and PCNA expression in ovarian carcinomas. *Oncol Rep* 2002, 9, 1173–1179.
- [14] **Gerdes I, Lemke H, Baisk H, Wocker HH, Schwab W, Stein H:** Cell cycle analysis of the cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133, 1710–1715.
- [15] **Gerdes I, Schwab W, Lemke H, Stein H:** Production of mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with all proliferation. *Int J Cancer* 1983, 31, 13–20.
- [16] **Kristt D, Winston GJ, Mellov MM, Veltman V, Koren R:** Patterns of proliferative changes in crypts bordering colonic tumors: zonal histology and cell cycle marker expression. *Path Oncol Res* 1999, 5, 297–303.
- [17] **Kyzer S, Gordon PH:** Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki-67. *Dis Colon Rectum* 1997, 40, 322–325.
- [18] **Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M:** Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1992, 15, 317–320.
- [19] **Vojtesek B, Bartek J, Midgely CA, Lane DP:** An immunohistochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992, 151, 237–244.
- [20] **Legros Y, Meyer A, Ory K, Soussi T:** Mutations in p53 produce a common conformational effect that can be detected with a panel of monoclonal antibodies directed toward the central part of the p53 protein. *Oncogene* 1994, 9, 3689–3694.
- [21] **Van Diest PJ, Brutal G, Baak JP:** Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998, 51, 716–724.
- [22] **Lanza G, Carazzini L, Borghi L, Ferretti S, Buccoliero F, Rubbini M:** Immunohistochemical assessment of growth fractions in colorectal adenocarcinomas with monoclonal antibody Ki-67. *Path Res Pract* 1990, 86, 608–618.
- [23] **Wong WM, Wright NA:** Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol* 1999, 52, 321–333.
- [24] **Liang SH, Clarke M:** Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001, 268, 2779–2783.
- [25] **Ogden GR, Hall PA:** Field change, clonality, and early epithelial cancer: possible lessons from p53. *J Pathol* 1997, 181, 127–129.
- [26] **Homann N, Nees M, Conradt Ch, Dietz A, Weidauer H, Maier H, Bosch FX:** Overexpression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001, 7, 290–296.
- [27] **Porębska J, Slesak B, Bojarowski T, Łapińska J, Wojnar A:** Ekspresja onkoprotein P53 i ERBB2 w gruczolakorakach oraz gruczolakach jelita grubego. *Gastroenterol Pol* 1998, 5, 453–459.

- [28] **Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenhoff RH:** Using tissue adjacent to carcinoma as a normal control: an obvious but questionable practice. *J Pathol* 2004, 203, 620–621.
- [29] **Yu YP, Landsittel D, Jing L, Nelson J, Ren B, Liu L, McDonald C, Thomas R, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M, Luo J-H:** Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol* 2004, 22, 2790–2798.

Adres do korespondencji:

Barbara Ślesak
Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej AM
ul. Mikulicza-Radeckiego 7
50-368 Wrocław
e-mail: slesak@immuno.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 30.12.2004 r.
Po recenzji: 25.02.2005 r.
Zaakceptowano do druku: 15.04.2005 r.

Received: 30.12.2004
Revised: 25.02.2005
Accepted: 15.04.2005