

Onkogén-amplifikáció, illetve -deléció és onkoprotein-expresszió immunhisztokémiai vizsgálata papilláris pajzsmirigyrákban

Várkondi Edit¹, Gyóry Ferenc², Nagy András¹, Kiss István³,
Ember István³, Kozma László¹

¹Pathologiai Intézet Debreceni Egyetem OEC Iskola, ²I.sz. Sebészeti Klinika,
³Human Közegészségtani Intézet, Pécsi Egyetem OEC

A vizsgálat célja: C-myc- és Ha-ras-amplifikáció ill. p53-deléció, valamint fokozott ciklin D1-, p53- és p21- (WAF1) expresszió előfordulásának és esetleges prognosztikai jelentőségének felmérése papilláris pajzsmirigyrákban. Anyag és módszerek: 24 beteg műtétilag eltávolított, formalinban fixált, paraffinba ágyazott tumorszövetét vizsgáltuk. Az onkogén-amplifikáció és -deléció vizsgálatát dot-blot DNS-hibridizálással végeztük, a fokozott fehérjeexpresszió kimutatása immunhisztokémiai módszerrel történt. Eredmények: Mintáinkban Ha-ras-amplifikációt és p53-deléciót nem, csekély mértékű c-myc amplifikációra utaló jeleket 4 esetben találtunk. 16 esetben mutattunk ki p53 fehérjét, 6 esetben p21-expresszióval együtt. A klinikai paramétereket jelenlétük nem befolyásolta. 12 esetben találtunk ciklin D1-overexpressziót, gyakran p21-expresszióval együtt, és fordított arányban állt a tumor limfocitás infiltrációjával. Ösztrogénreceptor-expressziót mutattunk ki a 4 legerősebben ciklin D1-pozitív mintában. Következtetések: A vizsgálatainkban kimutatott p53 valószínűleg nem minden esetben mutáns fehérje, mivel jelenléte egyrészt p21-expresszióval társult, másrészt nem jelentett agresszívebb tumorfenotípust. A ciklin D1 overexpressziója és a limfocitás infiltráció közötti összefüggés megerősíti, hogy a ciklin D1 túlprodukcója rosszabb prognózist jelent. Bár a ciklin D1 és a p21 együttes expressziója felveti az eddig tumorszuppresszornak gondolt p21 fehérje moduláns jellegét, valószínűbbnek tartjuk a ciklin D1 CDK-független, ösztrogénreceptor mediálta hatását, melyet emlőrákban már leírtak és az itt kimutatott ciklin D1-ösztrogénreceptor koexpresszió is igazol. *Magyar Onkológia* 45:424-429, 2001

The aim of the study: Assessment of occurrence and possible prognostic significance of c-myc and Ha-ras amplification, p53 deletion and overexpression of cyclin D1, p53 and p21 in papillary thyroid cancer. Materials and methods: Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from 24 patients were investigated. Dot-blot DNA hybridization was used to detect oncogene amplification or deletion. The expression of oncoproteins was determined by immunohistochemical method. Results: In our samples neither Ha-ras amplification nor p53 deletion were found. Low c-myc amplification (mean: 2.55) occurred in 4 cases (17%). p53 protein was detected in 16 samples (66.6%), with p21 expression ($\chi^2=7.02$, $p<0.01$) in 6 cases (25%). The p53 expression did not influence the tumor phenotype. Cyclin D1 overexpression was found in 12 cases (50%), it was often associated with p21 expression ($\chi^2=10.1$, $p<0.001$) and in inverse relation to the tumor lymphocytic infiltration ($\chi^2=5.35$, $p<0.05$). Increased expression of estrogen receptor was shown in 4 cyclin D1 positive samples (17%). Conclusions: The p53 detected in our study is likely not to be mutant protein in all cases because its presence was associated with p21 expression that the mutant protein cannot induce and also it did not mean more aggressive tumor phenotype. The connection of cyclin D1 overexpression with the lymphocytic infiltration of the tumor suggests that the increased expression of cyclin D1 means poor prognosis. The coexpression of cyclin D1 and p21 raises the modulative character of the p21 protein, thought to be a tumor suppressor originally, but we find a CDK-independent, estrogen receptor mediated effect of cyclin D1 more likely, which has been described in breast cancer and is also proved by the coexpression of cyclin D1 and estrogen receptor detected here. *Várkondi E, Gyóry F, Nagy A, Kiss I, Ember I, Kozma L. Investigation of oncogene amplification or deletion, and oncoprotein expression in papillary thyroid cancer. Hungarian Oncology* 45:424-429, 2001

Közlésre érkezett: 2001. január 16.
Elfogadva: 2001. április 20.

Levelezési cím: Várkondi Edit, Népegészségügyi Iskola, Megelőző Orvostani Intézet,
Debreceni Egyetem, OEC, 4012. Debrecen, Pf. 9.

Bevezetés

Napjainkban a rosszindulatú daganatok a szív- és érrendszeri megbetegedések mögött a második helyet foglalják el a halálozási statisztikában. Ezek közül a pajzsmirigy-rák nem túl gyakori, azonban Magyarországon 1993-ban így is 181 új pajzsmirigy-rákot diagnosztizáltak (6). Kimutatták, hogy a pajzsmirigy-tumorkban az ionizáló sugárzás karcinogén hatása jelentős, melyet a csernobili katasztrófát (19), vagy Japánban az atombombardobbanást követően a pajzsmirigy-rákok, különösen a papilláris karcinóma megnövekedett gyakorisága is alátámaszt (8).

A pajzsmirigy tumorai az epithelium karcinogenezisének többlépcsős modelljeiként is tekinthetők. Kialakulásukban az onkogének 3 osztálya: a GTP-kötő fehérjét, a nukleáris transzkripció faktorokat és a tirozinkináz receptorokat kódoló gének, ill. a tumorsuppresszor gének játszanak fontos szerepet. A Ha-ras gén mutációi a pajzsmirigy minden típusú tumoros elváltozásában megtalálhatók. Ezek feltételezhetően a rák kialakulásának egyik korai eseményei és önmagukban nem elegendők a malignus transzformációhoz (8, 25). A c-myc gén overexpressziójának és amplifikációjának gyakori előfordulását a malignusabb, kedvezőtlenebb prognózissal jellemezhető pajzsmirigy-rákokban mutatták ki (31). A p53 gén mutációi a differenciálatlan pajzsmirigy-rákok 70–90%-ában fordulnak elő, de megtalálhatók a papilláris és follikuláris karcinómában is. Általában a pajzsmirigy-karcinogenezis késői eseményéhez tartoznak és nagyon agresszív tumorokhoz társulnak (25). A gén overexpresszióját a jól differenciált karcinómák körülbelül 10%-ában mutatták ki (4, 5).

Fontos tényező a pajzsmirigy-karcinogenezisben a pozitív regulátorként szereplő ciklinek overexpressziója is. Közülük a ciklin D1 kulcsszerepet játszik a sejtciklus G1/S átmeneténél. Különböző rákokban a mutagenézis gyakori célpontja, génjének amplifikációja és génátrendeződése egyaránt vezethet a fehérje túlermelődéséhez (18). A fokozott ciklin D1-expresszió lényeges szerepet játszhat a papilláris pajzsmirigy-karcinóma patogenezisében (21). Figyelemre méltó, hogy egér emlőtumorokban kimutatták a ciklin D1 CDK-tól független hatását is (2). Ez a hatás az ösztrogénreceptorokon keresztül valósul meg, mely az ösztrogén hormon mitogén aktivitását közvetíti a sejt felé. A ciklin D1 nemcsak a receptorral, hanem a szteroidreceptor-koaktivátorokkal (SRC) is kölcsönhatásba léphet, és így azokat a receptorhoz „toborozza”. A p21 (WAF1/Cip1) ciklin-dependens kináz-inhibitor szintén regulátor szerepet játszik a sejtciklus G1/S ellenőrző pontjánál. Fokozott expresszióját az ép p53 fehérje indukálja, míg a mutáns nem, ezért a p53 funkcionális állapotáról informálhat (9).

E munka célja az, hogy az onkogének és onkoproteinek közül a fent említett Ha-ras és c-myc amplifikációjának, a p53 deléciójának, ill. a ciklin D1, a p53 és a p21 fokozott expressziójának előfordulását vizsgáljuk, és esetleges prognosztikai

jelentőségüket felmérjük papilláris pajzsmirigy-rákokban. A ciklin D1 CDK-független hatásának kimutatásához az ösztrogénreceptor expresszióját is vizsgáltuk.

Anyag és módszerek

1. Vizsgált betegek:

24 papilláris pajzsmirigy-rákból szenvedő beteg műtét során eltávolított, formalinban fixált és paraffinba ágyazott tumorszövetében végeztük a vizsgálatokat. A betegek a DOTE I. Sebészeti Klinika 1983-1996 közötti eseteiből kerültek ki, kór-

1. táblázat.

A vizsgált paraméterek kódolása

Paraméterek	0	1	2	3	4
c-myc-amplifikáció	nincs	van	–	–	–
Ha-ras-amplifikáció	nincs	van	–	–	–
p53-deléció	nincs	van	–	–	–
p53-immunpozitivitás	–	<10%	10–25%	25–50%	50%<
p21-immunpozitivitás	–	<10%	10–25%	25–50%	50%<
Ciklin D1-immunpoz.	–	<10%	10–25%	25–50%	50%<
Ösztrogénreceptor-immunpoz.	–	<10%	10–25%	25–50%	50%<
Nem	–	férfi	nő	–	–
T	–	T1	T2	T3	T4
N	N0	N1	N2	–	–
Fokálitás	–	egygócsú	többgócsú	–	–
Műtési típus	–	pall.	Rs, Lx	TT, NT	–
Recidíva	nem	igen	–	–	–
Linfocitás infiltráció	nincs	enyhe	közepes	diffúz	cent. germ.
Halálozás	él	meghalt	–	–	–
Halálokok	–	pajzsmirigy-rák	egyéb	–	–

2. táblázat. A vizsgált betegek megoszlása a paraméterek kódolásával kialakított csoportokban

Paraméterek	0	1	2	3	4
Nem	–	2	22	–	–
T	–	3	12	3	6
N	15	8	1	–	–
Fokálitás	–	8	16	–	–
Műtési típus	–	2	5	17	–
Recidíva helyi	23	1	–	–	–
Recidíva limfatikus	22	2	–	–	–
L. infiltráció (intratumorális)	9	6	6	3	–
L. infiltráció (peritumorális)	8	2	3	9	2
Halálozás	19	5	–	–	–
Halálokok	19	2	3	–	–

3. táblázat.

A vizsgált genetikai aberrációkkal kapcsolatos eredmények

lefolyasukat 1998 végéig követtük nyomon. A 24 beteg átlagéletkora $53,7 \pm 18,6$ év, a legfiatalabb 20, a legidősebb 84 éves. Közülük mindössze 2 férfi. Kiválasztásuk véletlenszerűen történt, az egyetlen szempont a mintákban a megfelelő tumorszövet technikai szempontból jó elkülöníthetősége az egészséges szöveti részeketől.

Vizsgálatainkban a mintákban kimutatott onkogén-amplifikációt vagy -deléciót ill. fokozott fehérjeexpressziót és a klinikai ill. patológiai para-

métereket vetettük össze. Közülük a nem számszerűen kifejezhető paramétereket a statisztikai kiértékeléshez kódolnunk kellett (1. táblázat).

Az onkoprotein-expresszió vizsgálatánál a kiértékelés szemikvantitativ módon történt (0-3+) a pozitívan festődő magok százalékos arányának megfelelően (28). A közölt adatok párhuzamos vizsgálat eredményei.

A klinikai és patológiai paraméterek közül a betegek korát, nemét, a tumor méretét, a tumor stádiumát TNM rendszer szerint (26), a tumor fokalitását, a műtétek típusát, a recidívát, a tumor limfocitász infiltrációját és a túlélést vettük figyelembe.

A tumorméret 0,5 és 7,0 cm között változott, az átlagos méret 3,52 cm volt. A betegek kórtörténetét 1998-ig követtük, eddig mindössze 5-en haltak meg. A leghosszabb túléléssel bejegyzett beteg 182 hónappal élte túl a műtétet, míg a legrövidebb idejű túlélés 4 hónap volt. A klinikai és patológiai adatokat a 2. táblázat mutatja.

2. Mikrodisszekció:

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott tumorszöveti mintákban a megfelelő – az esetleges nekrozistól és ép szövetetől mentes – tumoros részeket mikrodisszekcióval különítettük el.

3. DNS-hibridizálás:

A DNS-izolálásnál Goelz et al. (10) leírását követtük. A hisztológiai laboratóriumok rutinszerűen, xilol, acetone és alkohol segítségével deparaffináltuk a mintákat, majd 0,5 mg/ml koncentrációban pronáz enzimet tartalmazó extrakciós pufferben (10 mM Tris-HCl, 0,05 M EDTA, 0,5% SDS, pH=9,0) 37°C-on, 1 éjszakán át inkubáltuk. A DNS-t fenol-kloroform eleggyel vontuk ki (50 ml fenol, 50 ml kloroform és 1 ml izoamilalkohol). 15 perces inkubálás után 5000 g-n 3 percen át centrifugáltuk. A felülúszóhoz 1/10 térfogatnyi 4 M-os Na-acetátot (pH=4,0) adtunk, majd 3:7 arányban absz. alkoholt. Egy éjszakán át -20°C-on állni hagytuk és 14000 g-n 45 percig centrifugáltuk. A csapadékot 50 ml Tris-EDTA pufferben (pH=7,5-7,7) feloldottuk és dot-blotter segítségével a DNS-t Hybon N+ nylon filterre felvittük.

A DNS-hibridizációt az Amersham cég ECL (Enhanced Chemiluminescence) közvetlen nukleinsavjelző és -detektáló rendszerével végeztük, majd HPScanJet IIC denzitométerrel mértük a jelintenzitást és határoztuk meg a génamplifikáció mértékét. Próba DNS-ként humán cDNS pBR322 insertet (American Tissue Culture Collection, Dr. Szeberényi J. professzor (Biológiai Intézet, Pécsi Egyetem) ajándéka a Humán Közegészségtani Intézetnek) alkalmaztunk (22), melyet glutaraldehyd jelenlétében torma-peroxidáz enzimrel jelöltünk. A hibridizációt egy éjszakán át 42°C-on végeztük. Mosás és szárítás után a membránra H₂O₂-t és luminolt tartalmazó reagenseket mértünk és 1 perces inkubálás után kék fényre érzékeny filmmel detektáltuk a fénykibocsátást. A génamplifikáció kvantitatív meghatáro-

Lelet-szám	c-myc-ampl.	Ha-ras-ampl.	p53-deléció	p53-overexp.	p21-overexp.	Ciklin D1-overexp.	Ösztrogénreceptor overexp
1	1	1	1	-	-	-	-
2	2,1	1	1	++	++	+++	+
3	1,5	1	1	++	-	-	-
4	1	1	1	+	-	-	-
5	1	1	1	+	-	-	-
6	4,6	1	1	-	-	-	-
7	1	1	1	++	-	-	-
8	1	1	1	++	++	++	-
9	1	1	1	-	-	-	-
10	1	1	1	+	+	+	-
11	2,0	1	1	-	-	-	-
12	1	1	1	+	-	-	-
13	1	1	1	+	+	++	-
14	1	1	1	-	-	++	-
15	1	1	1	++	+	+	-
16	1	1	1	+	-	+	-
17	1	1	1	+	+	++	+
18	1	1	1	+	-	++	+
19	1	1	1	+	-	-	-
20	1	1	1	-	-	-	-
21	1	1	1	+	-	++	+
22	1	1	1	+	-	+	-
23	1	1	1	-	-	+	-
24	1	1	1	-	-	-	-

4. táblázat. A betegek megoszlása a vizsgált genetikai aberrációk csoportjaiban

Paraméterek	0	1	2	3	4
c-myc-amplifikáció	20	4	-	-	-
Ha-ras-amplifikáció	0	0	-	-	-
p53-deléció	0	0	-	-	-
p53-immunpozitivitás	8	11	5	-	-
p21-immunpozitivitás	18	4	2	-	-
Ciklin D1-immunpozitivitás	12	5	6	1	-
Ösztrogénreceptor-immunpozitivitás	-	4	-	-	-

zását denzitométerrel végeztük β -aktinra vonatkoztatva.

4. Immunhisztokémiai vizsgálat:

A vizsgálathoz a hisztológiai laboratóriumokban rutinszerűen használt metodikát alkalmaztuk. Az antigén feltárása magas hőmérsékleten és nyomáson, citrátbufferben történt (pH = 6,0). Primer antitestként 1:100 hígításban anti-ciklin D1 (NCL-CYCLIND1-GM), anti-p53 (NCL-p53-D01), anti-p21 (NCL-WAF-1) és anti-ER (NCL-ER-6F11) egér monoklonális antitesteket (Novocastra), szekunder antitestként 1:50 hígításban biotinált anti-egér IgG-t használtunk. Az előhívás ABC peroxidáz módszerrel (DAKO LSAB PO kit) és VIP szubsztráttal (Vector, SK-4600) történt.

5. Statisztikai kiértékelés:

A Kaplan-Meier-analízist és a különböző kategória-változók összefüggésének vizsgálatát χ^2 -tesztel az SPSSPC szoftver segítségével végeztük el.

Eredmények

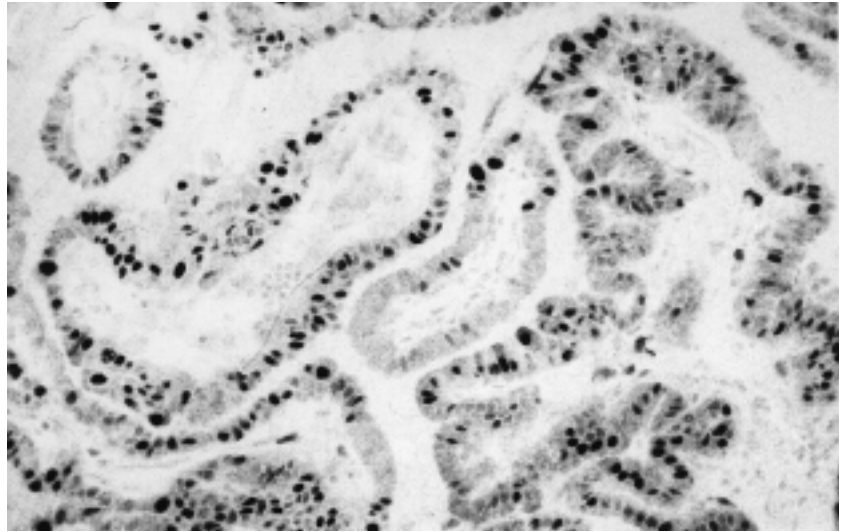
A vizsgált tumorokban sem Ha-ras-amplifikációt, sem p53-deléciókat nem találtunk. Négy esetben (17%) mutattunk ki csekély mértékű c-myc-amplifikációt (1,5-4,6), melynek átlaga 2,55 volt. 16 esetben (66,6%) találtunk p53-pozitivitást, hat esetben (25%) pedig p21-produkciót. Ciklin D1-overexpressziót szintén nagy számban (12 eset, 50%) találtunk, négy mintában pedig fokozott ösztrogénreceptor-expressziót mutattunk ki (3., 4. táblázatok). A ciklin D1- és ösztrogénreceptor-immunreaktivitást az 1. és a 2. ábra mutatja.

A c-myc-amplifikáció a klinikai és patológiai paraméterek közül a betegek túlélésével mutatott t-tesztben összefüggést. Eszerint a betegek túlélése rövidebbnek mutatkozott c-myc-amplifikáció jelenlétében, mint hiányában. Ezt a megfigyelést azonban több ok miatt is kritikusan kell értékelnünk. A c-myc-amplifikáció igen kis mértékű volt, mindössze egy esetben érte el a jelintenzitás a kritikus 4-szeres értéket. Ezen kívül a fent említett összefüggés Kaplan-Meier-módszerrel nem volt igazolható, és a betegek kórtörténetét 1998-ig nyomon követve nagy részük a vizsgálat befejeztéig még élt.

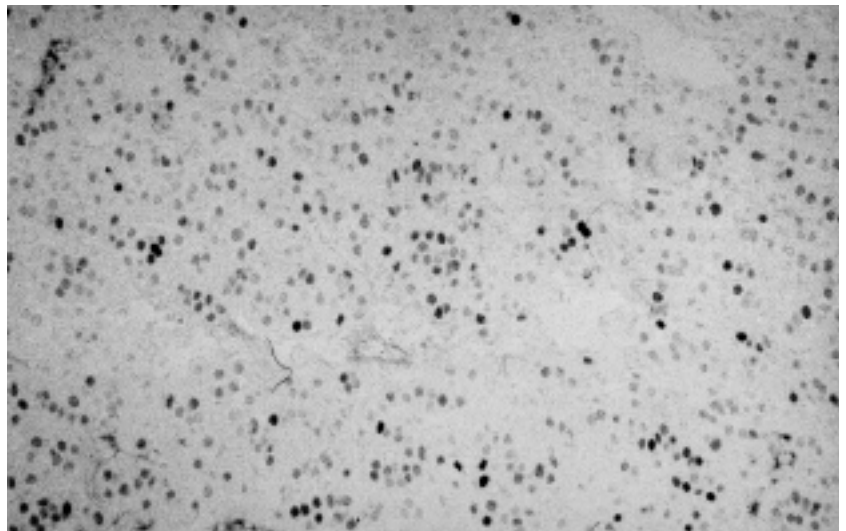
A tumor limfociták infiltrációja és a fokozott ciklin D1-expresszió között szignifikáns összefüggést találtunk. A jó prognózist jelentő limfociták infiltráció a ciklin D1-pozitivitás hiányában jelentkezett gyakrabban (5. táblázat).

A p53 és a p21 expresszióját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a p53 fokozott produkciója p21/WAF1-expressziót indukált. A 16 p53-pozitív esetből 6-nál tapasztaltunk p21-pozitivitást, viszont a p53-negatív esetek közül egy sem mutatott p21-produkciót, ami utal a p53 és a p21 sejten belüli kapcsolatára (6. táblázat). A p53-pozitív esetekben sem a p21-produkció jelenlétében, sem annak hiányában nem találtunk összefüggést a vizsgált klinikai és patológiai paraméterek-

1. ábra. Fokozott ciklin D1-produkció kimutatása papilláris pajzsmirigy-karcinómában. Az erős, magra lokalizált immunreaktivitás jól látható (ABC peroxidáz technika) (x200).



2. ábra. Ösztrogénreceptor kimutatása papilláris pajzsmirigy-karcinómában. A gyenge, de határozott immunfestés nem összevethető az emlőben tapasztalt reakció erősségével, és csak intenzív ciklin D1-produkció esetén tapasztaltuk (ABC peroxidáz technika) (x200).



5. táblázat. A tumor limfociták infiltrációja és a ciklin D1-overexpresszió kapcsolata

Ciklin D1-overexpresszió	Esetszám	L. inf.		Szignif.
		van	nincs	
Pozitív	12	5	7	$\chi^2=5,35$
Negatív	12	10	2	p<0,05

6. táblázat. A p53- ill. a cyclin D1-overexpresszió és a p21-produkció kapcsolata

Overexpresszió	Esetszám	p21		Szignif.
		+	-	
p53-pozitív	16	6	10	$\chi^2=7,02$
p53-negatív	8	0	8	p<0,01
Ciklin D1-pozitív	12	6	6	$\chi^2=10,06$
Ciklin D1-negatív	12	0	12	p<0,001

kel. Szignifikáns különbség nem volt egyik paraméternél sem, ami azt mutatja, hogy a p53 az általunk vizsgált esetekben nem befolyásolta lényegesen a tumor viselkedését.

Szignifikáns összefüggést találtunk a ciklin D1 és a p21 expressziója között is. A ciklin-dependens kináz-inhibitor p21/WAF1 expressziója gyakran társult ciklin D1-pozitivitással (6. táblázat).

Megbeszélés

Papilláris pajzsmirigyrákban vizsgáltuk bizonyos genetikai aberrációk jelenlétét, és megpróbáltuk felmérni ezek prognosztikai jelentőségét.

Génamplifikációt csak csekély mértékben, vagy egyáltalán nem tudtunk kimutatni. Általánosságban elmondható, hogy a pajzsmirigyrákok közül – és ez rendszerint a legtöbb tumorra érvényes – a DNS kópiaszám-változása, amely a genom stabilitásának elvesztését jelezheti, a kevésbé differenciált, agresszívebb tumorokban fordul elő gyakrabban. Pajzsmirigyrákokban ilyen kópiaszám-változást nagyobb mértékben follikuláris, medulláris és anaplasztikus karcinómákban mutattak ki, ez utóbbiban olyan kromoszómáregiókat érintve, melyek a c-myc gént is tartalmazzák (11). Itt csupán 4 esetben mutattunk ki kis mértékű c-myc-amplifikációt, ami kevés a c-myc specifikus szerepének megfogalmazásához. Valószínű, hogy ez az eredmény inkább a tumorprogresszió során kialakuló genetikai instabilitás következménye.

A karcinogenezisben a sejtproliferációt szabályozó gének és fehérjék fokozott expressziója is szerepet játszhat. A ciklin D1 fokozott produkcióját az irodalmi adatokkal összhangban nagy számban (12 eset) mutattuk ki (18, 28), és a kedvezőbb prognózist jelentő limfociták infiltrációjával (20, 23) mutatott fordított arányú szignifikáns összefüggést. Az overexpresszió esetében a limfociták infiltráció ritkábban fordult elő, mely szerint a ciklin D1-overexpresszió rosszabb prognózisra utalhat (21), azonban más klinikai paraméterekkel ezt közvetlenül igazolni nem tudtuk. Ennek ellenkezőjét mutatták ki Basolo és mtsai (1), ők többféle pajzsmirigyrákot vizsgáltak együtt.

A ciklin D1-pozitív esetek nagy százalékában (50%) p21-produkciót is kimutattunk. Mivel a p21 ciklin-dependens kináz- (CDK) inhibitor (9), így a fenti összefüggés megkérdőjelezi a p21 fehérje inhibitor szerepét, és annak inkább modulátor jellegét veti fel. A p21 dóziszfüggő ellentétes hatásait leírták egér emlőtumorban is (16). Másrészt az eredményeink alapján lehetséges, hogy ebben a tumorban a ciklin D1 CDK-független, ösztrogénreceptorokon keresztül kifejtett mitogén hatásával kell számolni. Az általunk vizsgált mind a 4 erősen ciklin D1-pozitív mintában ki tudtuk mutatni az ösztrogénreceptor expresszióját is. E receptor jelenlétét pajzsmirigyrákokban korábbi vizsgálatok is alátámasztják (27). Feltételezzük, hogy a ciklin D1-nek a mi esetünkben ez a hatása érvényesül, ami a betegség női dominanciájával is összefüggésben lehet (14, 12).

A vizsgált minták nagy százaléka mutatott fokozott p53-expressziót (16 eset, 66,6%). Bizonyos irodalmi adatok kisebb arányban, és elsősorban a mutáns p53 overexpressziójáról számolnak be (4, 13), de vannak ezzel ellentétes adatok is, melyek szerint a jól differenciált pajzsmirigyrákokban elsősorban vad típusú p53 fehérje mutatható ki, a mutáns forma általában gyengén differenciált, vagy differenciálatlan tumorokra jellemző (6, 30). A mi vizsgálataink során kimutatott p53 fehérje valószínűleg nem minden esetben mutáns. Egyrészt a p53-deléció egy esetben sem találtunk, másrészt a p53-pozitivitás a minták nagy számában p21-produkcióval társult (6 eset, 37,5%), amit a mutáns p53 fehérje nem tud indukálni. Megvizsgálva a p53/p21-expresszió és a klinikai, valamint patológiai paraméterek kapcsolatát, nem találtunk szignifikáns összefüggést a p53-pozitivitás – akár a p21 + akár a p21- eseteket vizsgáltuk – és a tumorra jellemző paraméterek között, azaz a p53 overexpressziója a vizsgált csoportok egyikében sem jelentett agresszívebb tumorfenotípust.

Az irodalmi adatok szerint a p21-expresszió és a klinikai paraméterek között korrelációt eddig még nem mutattak ki, amit a mi eredményeink is alátámasztanak. Viszont egyértelműen rámutattak a p21 p53-tól független produkciójára, ami – mivel a mi esetünkben sem zárhatjuk ki teljesen a p53 mutációját – a p21 ezen útvonalon történő expressziójának lehetőségét is felveti (15).

Összességében elmondhatjuk, hogy a vizsgált genetikai aberrációk és a klinikai ill. patológiai paraméterek között erősebb asszociációt nem találtunk, ami a papilláris pajzsmirigyrák magasabb fokú differenciáltságával és kisebb agresszivitásával magyarázható. A ciklin D1 CDK-független, ösztrogénreceptor mediálta hatásának igazolása további vizsgálatokat igényel.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Virágh Judit, Bessenyei Mária és Kósáné Csonka Terézia hisztokémiai szakasszisztenseknek, és Kovácsné Egri Ilona fényképésznek a munka elvégzéséhez nyújtott technikai segítségért.

Irodalom

1. Basolo F, Caligo MA, Pinchera A, et al. Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinicopathological parameters, retinoblastoma gene product, and Ki67 labeling index. *Thyroid* 10:741-746, 2000
2. Bernards R. CDK-independent activities of D type cyclins. *Biochim Biophys Acta* 1424: M17-M22, 1999
3. Brison O. Gene amplification and tumour progression. *Biochim Biophys Acta* 1155:25-41, 1993
4. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, et al. Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 17:375-381, 1993
5. Dobashi Y, Sugimura H, Sakamoto A, et al. Stepwise participation of p53 gene mutation during differentiation of human thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 3:9-14, 1994
6. Ésik O, Szentirmai Z, Tusnády G, et al. Malignus pajzsmirigy tumorok Magyarországon: morbiditás és mortalitás. *Orv Hetil* 137:905-911, 1996
7. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, et al. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91:179-184, 1993

8. Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocrine Rev* 15:202-232, 1994
9. Gao X, Honn KV. Recessive oncogenes: current status. *Pathol Oncol Res* 1:7-22, 1995
10. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130:118-126, 1985
11. Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, et al. DNA copy number changes in thyroid carcinoma. *Am J Path* 154:1539-1547, 1999
12. Hiasa Y, Nishioka H, Kitahori Y, et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in 313 paraffin section cases of human thyroid tissue. *Oncol* 50:132-136, 1993
13. Ho YS, Tseng SC, Chin TY, et al. p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 103:57-63, 1996
14. Inoue H, Oshimo K, Miki H, et al. Immunohistochemical study of estrogen receptors and the responsiveness to estrogen in papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 72:1364-1368, 1993
15. Ito Y, Kobayashi T, Takeda T, et al. Expression of p21 (WAF1/CIP1) protein in clinical thyroid tissues. *Br J Cancer* 74:1269-1274, 1996
16. Jones JM, Cui XS, Medina D, et al. Heterozygosity of p21 WAF1/CIP1 enhances tumor cell proliferation and cyclin D1-associated kinase activity in a murine mammary cancer model. *Cell Growth Differ* 10:213-222, 1999
17. Lazzereschi D, Mincione G, Coppa A, et al. Oncogenes and antioncogenes involved in human thyroid carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 16:325-332, 1997
18. Lazzereschi D, Sambuco L, Carnovale SC, et al. Cyclin D1 and cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 76:806-811, 1998
19. Lukács GL, Szakáll Sz, Kozma I, et al. Veränderungen der epidemiologischen Parameter von SD-Erkrankungen in Ostungarn zehn Jahre nach Tschernobyl in Langenbecks. *Arch Chir Suppl* II 1997, pp 375-377
20. Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y, et al. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. *J Clin Endocrin Metab* 80:3421-3424, 1995
21. Muro CCA, Holt T, Klotch D, et al. Cyclin D1 expression as a prognostic parameter in papillary carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Head Neck Surg* 120:200-207, 1999
22. Nishikura K, Ar-Rushdi A, Erikson J, et al. Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc Natl Acad Sci* 80:4822-4826, 1983
23. Ozaki O, Ito K, Mimura T, et al. Papillary carcinoma of the thyroid. Tall-cell variant with extensive lymphocyte infiltration. *Am J Surg Pathol* 20:695-698, 1996
24. Schlumberger M, Cailleux AF, Suarez HG, et al. Irradiation and second Cancer. The thyroid as a case in point. *C R Acad Sci III*. 322:205-213, 1999
25. Soares P, Sobrinho-Simoes M. Recent advances in cytometry, cytogenetics and molecular genetics of thyroid tumours and tumour-like lesions. *Path Res Pract* 191:304-317, 1995
26. Spiessel, Beahrs, Hermanek, et al. Pajzsmirigy. In: TNM-atlasz (fordította: Dr. Farkas Elek), Ed. Springerler Hungarica Kiadó Kft., Budapest 1992, pp 78-83
27. van Holven KH, Menendez-Botet CJ, Strong EW, Huvos AG. Estrogen and progesterone receptor content in human thyroid disease. *Am J Clin Pathol* 99:175-181, 1993
28. Wang S, Wu J, Savas L, et al. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol* 29:1304-1309, 1998
29. Williams ED. Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. *Mutat Res* 333:123-129, 1995
30. Wyllie FS, Haughton MF, Rowson JM, et al. Human thyroid cancer as a source of iso-genic, iso-phenotypic cell lines with or without functional p53. *Br J Cancer* 79:1111-1120, 1999
31. Yang Y. Expression, Amplification and rearrangement of c-myc gene in human Thyroid carcinoma. *Chung Hua I Hsueh Tsai Chih Taipei* 71:304-306, 1991