

Immunocytochemiczna lokalizacja metalotioneiny w chłoniakach złośliwych u psów

JANUSZ A. MADEJ, HALINA MILNEROWICZ*, STANISŁAW DZIMIRA, MARCIN NOWAK

Katedra Anatomii Patologicznej, Fizjopatologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego AM, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

Madej J. A., Milnerowicz H., Dzimira S., Nowak M.

Immunocytochemical location of metallothionein in lymphoma malignum in dogs

Summary

The immunocytochemical procedure using LSAB 2 HRP (DAKO product) was used for locating metallothionein (MT) in malignant transformed lymphocytes (centroblastic lymphoma cells) and in normal lymphocytes. The histological preparations were additionally stained with hematoxylin DAKO (Chem. Mate.).

The study revealed that MT is present not only in epithelial cells, but also in normal, as well as in transformed canine lymphocytes. A higher level of MT was observed in canine centroblastic lymphoma cells than in normal lymphocytes. It would seem that the level of this protein may serve as a malignancy marker of the transformed lymphocytes.

Keywords: metallothionein (MT), Immunocytochemical localisation, lymphoma malignum (centroblasticum), dogs

Metalotioneina (MT) jest niskocząsteczkowym białkiem (6-10 kD) obecnym w jądrze i cytoplazmie komórek nabłonkowych w postaci kompleksów z cynkiem lub cynkiem i miedzią (2). W warunkach fizjologicznych stężenie MT jest niskie i rośnie dopiero w odpowiedzi na obecność pierwiastków metali ciężkich, hormonów (glukagonu, glukokortykoidów), a także cAMP, interleukiny 1 i 6, interferonu oraz TNF (tumor necrosis factor – czynnika martwicy nowotworów – (12). Metalotioneina jest dobrym „odtruwaczem” tkanek, gdyż mając znaczne powinowactwo do kadmu powoduje, że stabilność białka z tym pierwiastkiem jest wysoka. Uwalnianie kadmu związane z degradacją białka powoduje asocjację Cd z nową cząsteczką MT, co utrzymuje kadm, a także inne metale w formie mało toksycznej (6). Zasadniczą rolę w degradacji MT odgrywają lizosomy komórki, przy czym największy udział ma katepsyna B (12).

MT zlokalizowano w różnych niezłośliwych i złośliwych nabłonkowcach u ludzi i zwierząt, głównie w fazie S cyklu komórkowego (1, 3, 5-8). Dlatego też uważa się, że białko to może być wskaźnikiem indeksu proliferacyjnego w nowotworach i świadczyć o ich progresji. Ponadto metalotioneina uczestniczy we wzroście komórek, ich różnicowaniu i regeneracji (4). Ostatnio Majumder i wsp. (9) wykryli u myszy obecność cichego genu dla metalotioneiny I w komórkach chłoniakomęsaka P 1798 poddanych metylacji.

Lokalizacja i rola metalotioneiny w limfocytach chłoniaków złośliwych u psów nie została dotychczas opisana, co było impulsem do wykonania niniejszych badań.

Materiał i metody

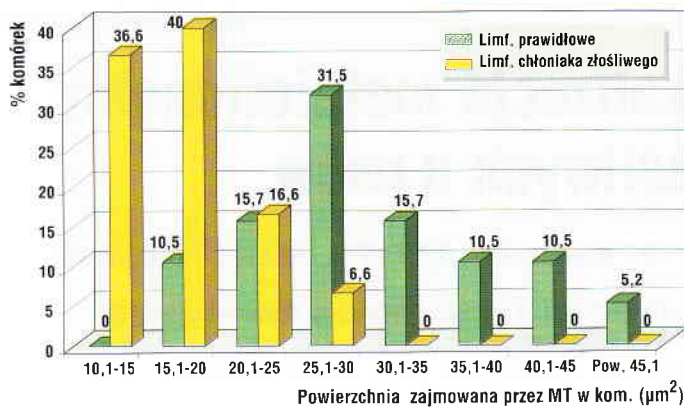
Materiał do badań stanowiły spontaniczne chłoniaki złośliwe, wywodzące się z węzłów chłonnych psów obojga płci, różnych ras w wieku od 8 do 12 lat. Nowotwory weryfikowano histopatologicznie, a następnie w skrawkach parafinowych lokalizowano w nich metalotioneinę (MT) metodą immunocytochemiczną opisaną wcześniej (7, 8).

Pomiar liczby limfocytów zawierających MT dokonano przy pomocy skonfigurowanego w Katedrze Anatomii Patologicznej, Fizjopatologii i Weterynarii Sądowej AR we Wrocławiu systemu pomiarowego Multi-Scan Base V.8, pracującego w środowisku Windows, sprzężonego z mikroskopem f-my Zeiss Jena (Photomikroscop – Axiophot) w tzw. polu pomiarowym (PP) o wymiarach $235 \times 313 \mu\text{m}$, a więc o powierzchni $73555 \mu\text{m}^2$. Procentowy rozkład liczby limfocytów prawidłowych oraz limfocytów chłoniaka złośliwego, w których MT (średnia) zajmuje określoną powierzchnię zilustrowano na ryc. 1.

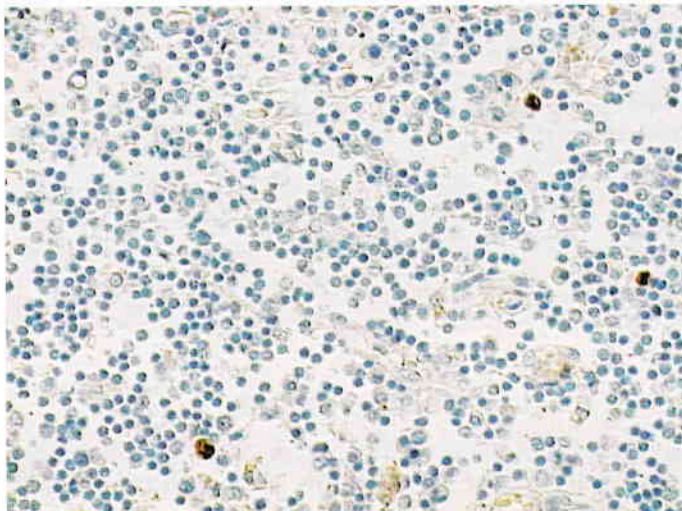
Cytoimmunologiczną lokalizację MT w węzłach chłonnych prawidłowych i nowotworowych przedstawiono na ryc. 2-5.

Wyniki i omówienie

Średnia liczba limfocytów prawidłowych (minimum 0, maksimum 55), zawierających MT w polu pomiarowym (PP) wynosiła 3, natomiast limfocytów chłoniaka złośliwego centroblastycznego 106 (minimum 31, maksimum 201), a więc przeszło 36 razy więcej. Z kolei średnia powierzchnia zajmowana przez metalotioneinę w limfocytach prawidłowych wynosiła $30,69 \mu\text{m}^2$, natomiast w przeliczeniu na PP wartość ta wynosiła $92,7 \mu\text{m}^2$ (ryc. 1). W limfocytach nowotworowych wartości te stanowiły odpowiednio: $17,6 \mu\text{m}^2$,



Ryc. 1. Procentowy rozkład liczby limfocytów, w których metalotioneina – MT (średnia) zajmuje określoną powierzchnię



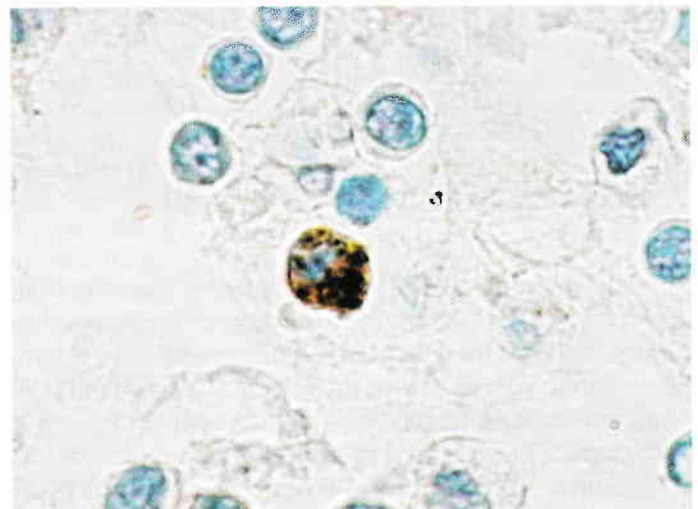
Ryc. 2. Immunocytochemiczna lokalizacja MT w limfocytach prawidłowych węzła chłonnego. Pow. 200 \times

czyli 1,7 razy mniej niż w kontroli i $1865,6 \mu\text{m}^2$, a więc ponad 20 razy więcej niż w limfocytach prawidłowych. Z przytoczonych obliczeń, a także z rycin immunocytochemicznych (ryc. 2-5) wynika, że sama ocena mikroskopowa zawartości metalotioneiny jest niewystarczająca i może prowadzić do nieprawidłowej jej oceny. Zawartość tego białka w limfocytach prawidłowych, aczkolwiek pojedynczych jest większa niż w limfocytach nowotworowych. Liczba tych ostatnich natomiast jest zdecydowanie większa w polu obliczeniowym i dlatego suma MT jest większa.

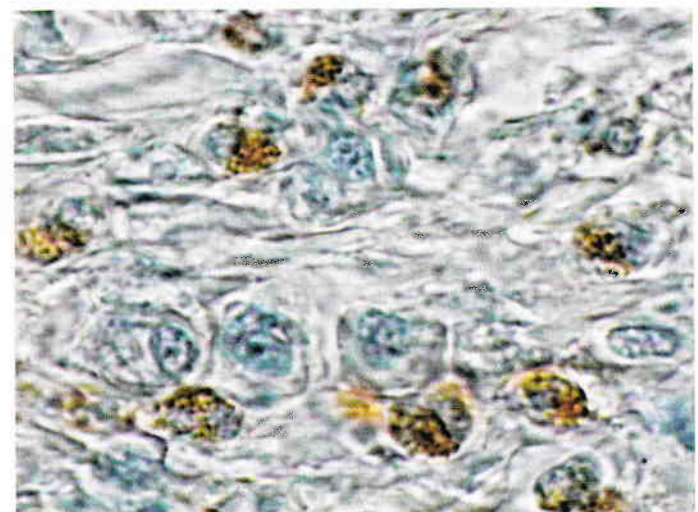
Uważa się, że MT jest białkiem charakterystycznym tylko dla komórek nabłonkowych, chociaż niespecyficzną reakcją na to białko opisano w komórkach śródbłonna naczyniowego, komórkach *mesangium* nerek, komórkach dendrytycznych, a ostatnio Dziegiel i wsp. (3) wykazali jej obecność w komórkach mięsaka, wydającego się z maziówki stawów (synowocytach). Wcześniejsze badania własne pozwoliły na stwierdzenie, że metalotioneina lokalizuje się także w limfocytach białaczkowych *in vitro* u bydła, zwłaszcza w ich cytoplazmie i błonie komórkowej (8). Obserwacje te potwierdzają obecne wyniki nad zawartością MT w limfocytach transformowanych nowotworowo, a także w limfocytach prawidłowych. Białko to umiejscowione jest głównie w cytoplazmie tych komórek, a tak-



Ryc. 3. Immunochemiczna lokalizacja MT w limfocytach chłoniaka złośliwego węzła chłonnego. Pow. 200 \times



Ryc. 4. Jak na ryc. 2. Pow. 1000 \times



Ryc. 5. Jak na ryc. 3. Pow. 1000 \times

że w ich jądrze. Ekspresja MT jest większa w limfocytach nowotworowych niż w prawidłowych, co świadczy o progresji, czyli złośliwieniu nowotworu. Jest to zrozumiałe, gdyż wysoką ekspresją metalotioneiny charakteryzują się tkanki płodowe, zwłaszcza wątroba, co manifestuje się licznymi mitozami komórko-

wymi oraz magazynowaniem miedzi i cynku w ontogenezie tego narządu (6).

Na możliwość syntezy MT indukowanej kadmem w ludzkich limfocytach i monocytach zwracają uwagę Sone i wsp. (10). Z kolei Jayasurya i wsp. (4) wykazali wyraźną ekspresję MT w limfocytach naciekających raka nosogardzieli u ludzi, a także w tkance limfoidalnej ulegającej hiperplazji w otoczeniu tego nowotworu.

Udział pierwiastków metali ciężkich i wolnych rodników (WR) w powstawaniu nowotworów oraz rola MT jako przypuszczalnego reduktora ich działania jest zjawiskiem bardzo ciekawym i nie do końca poznanym. Metalotioneina może zmiatać WR hydroksylowe i rodniki nadtlenkowe wytworzone w reakcji oksydazy ksantynowej *in vitro* (12). Jest ona ok. 800 razy wydajniejsza niż glutation (GSH) w zapobieganiu degradacji DNA przez rodnik hydroksylowy. Przyjmuje się, że tiolowe grupy białka są odpowiedzialne za wiązanie w/w rodników. Utlenianie MT ma bowiem za cel zahamować peroksydację lipidów błonowych komórki. Inni uważają, że głównym czynnikiem obronnym w działaniu metalotioneiny jest uwalnianie cynku i jego przechwytywanie przez błony biologiczne, co obniża peroksydację lipidów, a tym samym stabilizuje błony (6).

Wzrost stężenia metalotioneiny w limfocytach chłoniaków złośliwych u psów może być związany z hamowaniem indukcji WR i wychwytem wspomnianych pierwiastków metali ciężkich, co wskazywałoby na korzystne działanie MT w onkogenezie. Niestety białko to ma także właściwości hamowania procesu apoptozy tych komórek i tym samym może sprzyjać ich nowotworowej proliferacji. Zjawisko takie opisali Tekura oraz Ho (11) w raku prostaty i raku jajnika u ludzi.

Wnioski

1. Zawartość metalotioneiny (MT) rośnie w limfocytach transformowanych nowotworowo (chłoniak

centroblastyczny) w porównaniu z limfocytami prawidłowymi u psów, a więc białko to może być markerem narastającej ich złośliwości.

2. Metalotioneina jest obecna nie tylko w komórkach nabłonkowych, ale także w limfocytach prawidłowych i stransformowanych nowotworowo *in vivo*.

Piśmiennictwo

1. Chan W. C., Zaatori G.: Lymph node interdigitating reticulum cell sarcoma. *Am. J. Clin. Path.* 1986, 85, 739-745.
2. Cherian G. M.: Nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver during development and in tumor cells. *Metalloth.* 1993, 3, 175-187.
3. Dziegiel P., Surowiak P., Zabel M.: Expression of metallothionein in synovial sarcoma cells. *Abst. 37 symp. Pol. Histoch. Cytochem. Kraków 2001*, s. 25.
4. Jayasurya A., Bay B. H., Yap W. M., Tan N. G.: Infiltrating lymphocytes in undifferentiated nasopharyngeal cancer lack metallothionein expression. *Cancer Lett.* 2000, 1, 99-104.
5. Jin R., Chow V. T., Tan P. H., Dheen S. T., Bay B. H.: Metallothionein 2 A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002, 23, 81-86.
6. Lazo J. S., Yang Y. Y., Woo E., Shiu-Ming K., Saijo N.: Regulation of metallothionein expression and cellular resistance to electrophilic antineoplastic agents. *Metalloth.* 1993, 3, 294-302.
7. Madej J. A., Milnerowicz H., Dzimira S.: Immunohistochemiczna lokalizacja metalotioneiny (MT) w nowotworach nabłonkowych u zwierząt. *Medycyna Wet.* 1991, 55, 806-808.
8. Madej J. A., Milnerowicz H., Kuryszko J., Dzimira S., Kapuśniak V.: Immunohistochemical localization of metallothionein in leukemic lymphocytes in BLV-infected cattle. *Pol. J. Vet. Sci.* 2000, 4, 227-230.
9. Majumder S., Choshal K., Li Z., Bo Y., Jacob S. T.: Silencing of metallothionein - I gene in mouse lymphosarcoma by methylation. *Oncogene* 1999, 18, 6287-6295.
10. Sone T., Koizumi S., Kimura M.: Cadmium-induced synthesis of metallothioneins in human lymphocytes and monocytes. *Chem. Biol. Interact.* 1988, 66, 61-70.
11. Tekur S., Ho S. M.: Ribozyme-mediated downregulation of human metallothionein II (a) induces apoptosis in human prostate and ovarian cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 2002, 33, 44-45.
12. Tohyama C., Ghaffar A., Nishimura H., Nishimura M. N.: Metallothionein in biology and medicine. CRC Press, Boca Raton, Florida 1991, s. 271.

Adres autora: prof. zw. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. Praca zbiorowa pod redakcją M. Kurpisza. Wydawnictwo Medyczne Termedia, Poznań 2002 str. 380, cena 100 zł. ISBN 83-908325-9-3.

Intensywny rozwój badań i szereg odkryć, jakie nastąpiły w ostatnim dwudziestolecu coraz bardziej wskazują na zacieranie się różnic pomiędzy naukami podstawowymi i stosowanymi w medycynie i weterynarii. Dlatego z wielkim uznaniem należy się odnieść do wydania książki dotyczącej problematyki rozrodu ludzi i zwierząt. Jest to pierwsze opracowanie tego typu w języku polskim. Książka jest dziełem 45 polskich autorów, głównie profesorów biologii, medycyny, a także weterynarii. Jej treść podzielono na 4 części, o następujących tytułach:

I. Podstawy biologii komórkowej i molekularnej,

II. Zasady funkcjonowania narządów i komórek rozrodczych,

III. Wybrane aspekty patofizjologii układu rozrodczego, IV. Zagrożenia i nowe perspektywy dla rozrodu ssaków.

W poszczególnych częściach zawarto ogółem 24 rozdziały, które przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat molekularnych aspektów rozrodczości i biotechnologii rozrodu. Niewątpliwym sukcesem redakcyjnym jest połączenie treści tych różnorodnych problemów w jedną całość. Na podkreślenie zasługują również odpowiednio dobrane ryciny i oryginalne fotografie zamieszczone w większości rozdziałów. Niestety brakuje takiej dokumentacji w rozdziale „Plemniki” - gamety bardzo „fotogeniczne”, co znacznie utrudnia lekturę tej części książki. Niezależnie od tego uchybienia na wyróżnienie zasługują walory naukowe dzieła, które z powodzeniem może być wykorzystane zarówno przez studentów oraz lekarzy, a także osoby innych specjalności przyrodniczych np. biologii, biotechnologii i hodowli zwierząt.

Marian Tischner