

## Ανοσοϊστοχημική μελέτη της κατανομής της λακτοφερίνης, της σερουλοπλασμίνης και του εκκριτικού παράγοντα σε νεοπλασματικές και μη επεξεργασίες του θυρεοειδούς

Α. Κόνδη - Παφίτη, Ε. Καΐρη - Βασιλάτου, Μ. Φράγκου, Ε. Καρβούνη, Κ. Κοντογιάννη, Δεληγεώργη - Πολίτη Ε.

---

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της κατανομής των ειδικών δεικτών εκκριτικής - αδενικής διαφοροποίησης: Σερουλοπλασμίνης (Cp), Λακτοφερίνης (Lf) και Εκκριτικού Παράγοντα (Sc) σε νεοπλασματικές και μη επεξεργασίες του θυρεοειδούς.

**Υλικό και Μέθοδος:** Μελετήσαμε με τη μέθοδο Βιοτίνης - Στρεπταβιδίνης, σε υλικό μονιμοποιημένο σε φορμόλη, 17 δείγματα μη νεοπλασματικού θυρεοειδούς, 15 θυλακιώδη αδενώματα, 16 δηλώδη καρκινώματα, 5 θυλακιώδη καρκινώματα και 5 μυελοειδή καρκινώματα.

**Αποτελέσματα:** Τα μή νεοπλασματικά θυρεοειδικά δείγματα και τα αδενώματα έδωσαν αρνητική αντίδραση στους δείκτες εν γένει. Τα θυλακιώδη και ιδία τα δηλώδη καρκινώματα έδωσαν θετική αντίδραση στα Cp και Lf και έντονα θετική αντίδραση στον Sc. Παρόμοιες αντιδράσεις έδωσαν μεταστατικά νεοπλάσματα σε λεμφαδένες.

Οξύφιλα και θυλακικά κύτταρα σε ειδικές και μη φλεγμονές του θυρεοειδούς έδωσαν επίσης έντονη αντίδραση στον Sc. Αναλύεται η χαρακτηριστική κυτταρική κατανομή των δεικτών.

**Συμπεράσματα:** Η παρουσία Lf, Cp και Sc σε κακοήθεις επεξεργασίες του θυρεοειδούς υποβοηθά τη διαφορική διάγνωση τούτων από καλοήθεις επεξεργασίες, οι οποίες παρουσιάζουν ενίοτε δυσχέρεια στην αναγνώριση. Η αυξημένη έκφραση του Sc υποδηλοί επί πλέον διέγερση τοπικού ανοσολογικού αμυντικού μηχανισμού.

**Λέξεις κλειδιά:** Σερουλοπλασμίνη, Λακτοφερίνη, Εκκριτικός παράγοντας, θυρεοειδής.

---

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της κατανομής τριών δεικτών εκκριτικής - αδενικής διαφοροποίησης, όπως είναι η σερουλοπλασμίνη, η λακτοφερίνη και ο εκκριτικός παράγοντας, καθώς και οι μεταβολές που παρουσιάζουν οι δείκτες αυτοί σε παθολογικές επεξεργασίες του θυρεοειδούς. Η σερουλοπλασμίνη είναι ένζυμο του ορού, με υφή γλυκοπρωτεΐνης, μοριακού βάρους 160.000, το οποίο δεσμεύει το 96% του συνολικού χαλκού στον ορό του αίματος<sup>1</sup>. Είναι απαραίτητη για τη δέσμευση και μετατροπή του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή μορφή, με την οποία ο σίδηρος αποθηκεύεται σαν φερριτίνη και μεταφέρεται σαν τρανσφερίνη. Το μόριό της περικλείει 8 άτομα χαλκού και 12 τελικές αλύσεις σιαλικού οξέος. Ο καταβολισμός της γίνεται στο ήπαρ, μετά την αφαίρεση των τελικών αλύσεων σιαλικού οξέος από το ένζυμο νευραμινιδάση και μετατροπή της Cp σε ασίαλο μορφή<sup>1,2</sup>.

Σημαντική αύξηση της Cp του ορού παρατηρείται επί κακοήθων νεοπλασμάτων του ανθρώπου, κυρίως δε καρκινωμάτων του πεπτικού και των πνευμόνων<sup>3-5</sup>, κατά τα οποία παρατηρείται παρεμπόδιση του καταβολισμού της Cp και γενικότερη διαταραχή της ισορροπίας και ομοιοστασίας διαφόρων γλυκοπρωτεϊνών του ορού. Η αύξηση αυτή των επιπέδων της Cp στον ορό φαίνεται ότι συνδυάζεται με αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση χαλκού στα νεοπλασματικά κύτταρα. Η μελέτη της γλυκοπρωτεΐνης αυτής με ανοσοϊστοχημική μέθοδο σε ιστούς είναι ακόμη περιορισμένη, υπάρχει ωστόσο αυξανόμενο ενδιαφέρον από το 1985, λόγω της διαφαινόμενης χρησιμότητάς της σαν ειδικού δείκτη κακοήθων επεξεργασιών.

Παρόμοια μοριακή δομή και βιολογική συμπεριφορά παρουσιάζει η λακτοφερίνη (Lf), γλυκοπρωτεΐνη των εκκρίσεων, όπως το γάλα, το έκκριμα των σιελογόνων αδένων κ.ά. Η Lf δεσμεύει το σίδηρο και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σαν ειδικός δείκτης εκκριτικής διαφοροποίησης σε ιστούς, σημαντικά αυξανόμενος σε κακοήθεις επεξεργασίες τούτων<sup>6-9</sup>.

Ο εκκριτικός παράγοντας (Sc) είναι τμήμα της εκκριτικής ανοσοσφαιρίνης - A, η οποία αποτελεί τον κύριο τοπικό ανοσολογικό μηχανισμό βλεννογόνων με εκκριτική δράση, όπως το γαστρεντερικό, αναπνευστικό και γεννητικό σύστημα του δήλου<sup>10-15</sup>. Η παρουσία του υποσημαίνει την ύπαρξη τοπικών ανοσολογικών

συστημάτων και την εκκριτική διαφοροποίηση των ιστών.

Στον θυρεοειδή αδένω η μελέτη των τριών αυτών δεικτών είναι ακόμη εξαιρετικά περιορισμένη, λόγω δε του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν, όπως συνοπτικά αναφέρθηκε ανωτέρω, μελετήσαμε την κατανομή και τις μεταβολές τους σε μη νεοπλασματικές και νεοπλασματικές, καλοήθεις και κακοήθεις επεξεργασίες του θυρεοειδούς.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελετήσαμε συνολικά 60 δείγματα θυρεοειδών αδένων, που χειρουργήθηκαν λόγω:

A) μη νεοπλασματικής επεξεργασίας: 17 (15 λόγω βρογχοκήλης, 2 λόγω λεμφοκυτταρικής θυρεοειδίτιδος).

B) καλοήθους νεοπλασματικής επεξεργασίας: 15 (θυλακίωδη αδενώματα).

Γ) κακοήθους νεοπλασματικής επεξεργασίας: 26 (16 δηλώδη καρκινώματα, 5 θυλακίωδη καρκινώματα, 5 μυελοειδή καρκινώματα).

Επίσης μελετήσαμε λεμφαδένες με μεταστατικό δηλώδες καρκίνωμα από το θυρεοειδή (2 περιπτώσεις) και 2 φυσιολογικά παραθυρεοειδή σωματίδια που συναφαιρέθηκαν.

Όλα τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης, έγιναν τομές παραφίνης και χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης. Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήσαμε μέθοδο Στρεπταβιδίνης - Βιοτίνης και τα πολυκλωνικά αντισώματα, Λακτοφερίνης (DAKO), Σερουλοπλασμίνης (DAKO) και Εκκριτικού παράγοντα (DAKO). Για τη μελέτη της θυρεοσφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα της SIGMA.

Καταγράψαμε την ένταση της αντιδράσεως (- ή +) την έκταση (εστιακή ή διάχυτη), την εντόπιση στα κύτταρα και στο έκκριμα ως και την ενδοκυττάρια κατανομή (διάχυτη, κοκκιώδη, στον πυρήνα) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κ.ά.). Σημειώσαμε επίσης τη χρωστική αντίδραση άλλων ιστών, του διαμέσου υποστρώματος, αγγείων και λεμφικού ιστού όπου υπήρχε.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Δείγματα θυρεοειδούς αδένω χωρίς νεοπλασματική επεξεργασία.

Γενικά σημειώθηκε αρνητική αντίδραση των θυλακικών κυττάρων και στους τρεις ελεγχό-

μενους δείκτες. Σε σπάνιες δέσεις, το κολλοειδές έδωσε ασθενώς θετική αντίδραση σε Cr και Sc. Στις περιπτώσεις θυρεοειδίτιδος, μη ειδικής και ειδικής παρατηρήθηκε θετική αντίδραση για Sc τόσο στα θυλακικά κύτταρα, όπου είχε διάχυτη εντόπιση, όσο και στο κολλοειδές.

Τα οξύφιλα κύτταρα της ειδικής θυρεοειδίτιδος έδωσαν έντονα θετική αντίδραση για Sc, με κοκκιώδη μορφολογία. Τα δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση στη θυρεοσφαιρίνη με ένταση κυμαινόμενη.

**2, Θυλακιώδη αδενώματα.** Γενικά η αντίδραση και στους τρεις δείκτες ήταν αρνητική. Θετική αντίδραση στην Σερουλοπλασμίνη παρατηρήθηκε σε μία περίπτωση θυλακιώδους αδενώματος, εντοπιζόμενη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στο κολλοειδές.

Η αντίδραση της θυρεοσφαιρίνης ήταν θετική τόσο στα θυλακικά κύτταρα όσο και στο

κολλοειδές.

**3. Κακοήδη νεοπλάσματα.** Παρατηρήθηκε θετική αντίδραση και στους 3 δείκτες, τόσο στα θυλακιώδη όσο και στα δηλώδη καρκινώματα (Εικ. 1-2). Η χρωστική αντίδραση εντοπιζόταν κυρίως στα κύτταρα και σπανίως στο έκκριμα. Η αντίδραση ήταν εντονότερη και πλέον διάχυτη στα δηλώδη καρκινώματα ακόμη και αν παρουσίαζαν θυλακιώδη μορφολογία (Εικ. 3).

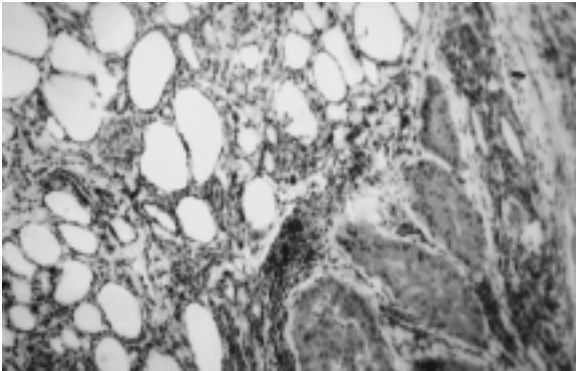
Ο Sc εντοπίστηκε κυρίως στα κυτταροπλασματικά όρια των νεοπλασματικών κυττάρων στα τοιχώματα αγγείων και στα μεταστατικά σε λεμφαδένες επιδηλιακά στοιχεία. Θετική αντίδραση στη θυρεοσφαιρίνη έδωσαν τα θυλακιώδη καρκινώματα ενώ στα δηλώδη καρκινώματα παρατηρήθηκε ασθενής αντίδραση. Τα μυελοειδή καρκινώματα αντέδρασαν στους δείκτες αρνητικά.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η θυρεοσφαιρίνη θεωρείται ο πλέον ειδικός δείκτης θυλακιώδους διαφοροποίησης και χρησιμοποιείται για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ θυλακιώδους και άλλων τύπων νεοπλασμάτων του θυρεοειδούς ως και για την ταυτοποίηση της θυρεοειδικής προελεύσεως μεταστατικής νόσου.

Ο δείκτης αυτός όμως δεν προσφέρεται για το διαχωρισμό των θυλακιδίων αδενωμάτων από τα αντίστοιχα καρκινώματα διότι παρουσιάζει παρόμοια αντίδραση και κατανομή<sup>16,17</sup>.

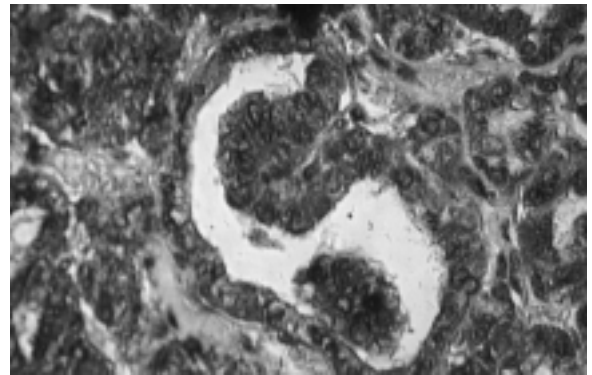
Η μελέτη αυτή καταδεικνύει ότι η παρουσία λακτοφερίνης και σερουλοπλασμίνης συνηγορεί υπέρ κακοήδους νεοπλάσματος, δηλώδους ή θυλακιώδους του θυρεοειδούς και



**Εικόνα 1.** Κατανομή Σερουλοπλασμίνης σε δηλώδες Ca(+) και θυλάκια (-).



**Εικόνα 2.** Κατανομή Λακτοφερίνης σε δηλώδες Ca(+) και θυλάκια (-).



**Εικόνα 3.** Κατανομή εκκριτικού παράγοντα σε δηλώδες Ca (+).

αναδεικνύει την ιδιαίτερη διαγνωστική αξία των δεικτών αυτών.

Η παρόμοια ανοσοϊστοχημική συμπεριφορά μεταξύ λακτοφερίνης και σερουλοπλασμίνης εξηγείται από ομοιότητες στη μοριακή δομή αυτών των δυο γλυκοπρωτεϊνών μεταξύ των οποίων μια περιοχή 133 αμινοξέων παρουσιάζει 53 παρόμοια μόρια<sup>8,18</sup>. Η παρουσία σερουλοπλασμίνης σε θυλακιώδη και δηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς, όπως σημειώνεται και σε άλλες εργασίες, υποσημαίνει την αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση χαλκού σε νεοπλασματικά θυλακικά κύτταρα. Η συγκέντρωση αυτή φαίνεται ότι δρα υποβοηθητικά στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, παραγόντων οι οποίοι δρουν στα πυρηνικά οξέα και ενοχοποιούνται στην κακοήδη κυτταρική εξαλλαγή. Η ακριβής αλληλουχία βιοχημικών γεγονότων που συμμετέχουν στο φαινόμενο αυτό δεν είναι ακόμη γνωστή, υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι πρόκειται για ορμονοεξαρτώμενους μηχανισμούς<sup>17,18</sup>. Παρόμοια δράση φαίνεται ότι έχει και η λακτοφερίνη, ο ρόλος

της όμως στην καρκινογένεση είναι ακόμη ασαφής. Η αυξημένη παρουσία εκκριτικού παράγοντα σε θυρεοειδίτιδα, ειδική και μη, συνηγορεί υπέρ υπάρξεως τοπικού ανοσολογικού αμυντικού μηχανισμού στον θυρεοειδή αδένα. Η παρουσία του σε διαφοροποιημένα καρκινώματα ενισχύει την αξία του σαν δείκτη αδενικής διαφοροποιήσεως.

Συμπερασματικά η Σερουλοπλασμίνη, η Λακτοφερίνη και ο Εκκριτικός Παράγων επιβεβαιώνουν την αξία τους σαν δείκτες αδενικής διαφοροποιήσεως και παρουσιάζουν ιδιαίτερη χρησιμότητα στη διαφορική διάγνωση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων νεοπλασματικών επεξεργασιών του θυρεοειδούς καθώς και μεταξύ διαφοροποιημένου και αμετάπλαστου ή μυελοειδούς καρκινώματος.

Η δυνατότητα ανίχνευσης σερουλοπλασμίνης και λακτοφερίνης στον ορό των ασθενών προσφέρει τη δυνατότητα παρακολούθησης αυτών κατ' αναλογία προς άλλους βιολογικούς δείκτες.

## SUMMARY

### *Immunohistochemical study of the Lactoferrin, Ceruloplasmin and Secretory Component Expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid gland diseases.*

*Kondis-Paphitis A., Kairi-Vassilatou E., Carvounis H., Frangou-Plemmenou Matrona, Kontoyanni K., Deligeorgi-Politi H.*

*Pathology Department, Areteion University Hospital Athens Greece*

*The aim of this study is to investigate the expression of Lactoferrin (LF), Ceruloplasmin (CP), and Secretory Component (SC) in various thyroid gland diseases.*

*LF is an iron-binding glycoprotein overexpressed in certain human adenocarcinomas. CP is implicated in carcinogenesis and SC is part of the local immunological defense system. Their expression in thyroid neoplasms is not yet widely investigated as well as the possibility that they may be a useful aid in the differential diagnosis between benign and malignant thyroid diseases.*

*Sections of 15 follicular adenomas, 5 follicular carcinomas, 16 papillary carcinomas, 15 goitres and 2 cases of lymphocytic thyroiditis were reexamined and were immunohistologically investigated by a streptavidinbiotin method for LF, CP, SC and thyroglobulin.*

*All follicular and papillary thyroid carcinomas were positive for LF, CP and strongly positive for SC. Hurthle cells in thyroiditis were positive for SC. Non-neoplastic diseases gave negative reaction.*

*In conclusion, the expression of LF, CP and SC are a valuable diagnostic aid in the d.d. between benign and malignant thyroid tumors. The expression of SC shows the presence of a local immunological defence system.*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tuccan G, Baffesi G: Immunological demonstration of ceruloplasmin in follicular adenomas and thyroid carcinomas *Histopathology* 11: 723-731, 1987.
2. Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M: Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* 52: 868-872, 1983.
3. Linder MC, Moor JR, Wright K: Ceruloplasmin assays in diagnosis and treatment of human lung breast and gastrointestinal cancers. *J. Natl Cancer Inst* 67: 263-275, 1981.
4. Scanni A, Licciardello L, Trovanto M, Tomiroto M, Biraghi M: Serum copper and ceruloplasmin levels in patients with neoplasias localized in the stomach, large intestine or lung. *Tumor* 63:175-180, 1977.
5. Ungar - Waron H, Gluckman A, Spira E, Waron M, Trainin Z: Ceruloplasmin as a marker of neoplastic activity in rabbits bearing the VX-2 carcinoma. *Cancer Res* 38:1296-1299, 1978.
6. Tuccari G, Barresi G: Immunohistochemical demonstration of lactoferrin in follicular adenomas and thyroid carcinomas. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 406: 67-741, 1985a.
7. Tuccari G, Barresi G: Diagnostic value of lactoferrin in follicular adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Pathol Res Pract* 180: 318, 1985b.
8. Masson PL, Hermas JF: Studies on lactoferrin, the ironbinding proteins of Secretions. *Clin Clim Acta* 14: 115-124, 1966.
9. Moro I, Umemura S, Crago SS, Mestecky J: Immunohistochemical distribution of immunoglobulins, lactoferrin and lysozyme in human minor salivary glands. *J Oral Pathol* 13: 97-104, 1984.
10. Nagura H, Smith PD, Nakane PK, Brown WR: IgA in human bile and liver. *J Immunol* 126:587-595, 1981.
11. Tourville DR, Adler RH, Bienenstock J, Tomasi TB Jr: The human secretory immunoglobulin system: Immunohistological of  $\gamma$ A, secretory "piece" and lactoferrin in normal human tissues. *J Exp Med* 129:411-429, 1969.
12. Watanabe T, Nagura H, Watanabe K, Brown WR: The binding of human milk lactoferrin to immunoglobulin A. *FEBS Letters* 168: 203-207, 1984.
13. Nakamura T, Nagura H, Watanabe K, Komatsu N, Uchikoshi N, Kobayashi K, Nabeshima J: Immunocytochemical localization of secretory immunoglobulins in human parotid and submandibular glands. *J Electron Microsc* 31:151 -161, 1982.
14. Nagura H, Nakane PK, Brown WR: Translocation of dimeric IgA through neoplastic colon cells in vitro. *J Immunol* 123:2359-2368, 1979.
15. Korsrud FR, Brandtzaeg P. Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers: localization of amylase, lactoferrin, lysozyme, secretory component and secretory immunoglobulins by paired immunofluorescence staining. *J. Histochem Cytochem* 30:657-666, 1982.
16. Kawaoi A, Okano T, Nememoto N, Shiina Y, Shikata T. Simultaneous detection of thyroglobulin (Tg), thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ) in nontoxic thyroid tumours by immunoperoxidase method. *Am J Pathol* 108:39-49, 1982.
17. Logmans SC, Josis AC: Thyroid-associated antigens in routinely embedded carcinomas. *Cancer* 54:274-279, 1984.
18. Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Spik G, Montreuil J, Jolles P. Structural relatedness between latonsferrin and human ceruloplasmin. *FEBS Lett* 132:239-242, 1981.