

Paweł Basta^{1,2}, Magdalena Dutsch-Wicherek², Marta Biedka²,
Krzysztof Koper², Paweł Mach³, Krystyna Gałązka⁴, Tomasz Basta²,
Michał Leśniak^{1,2}, Beata Śpiewankiewicz⁵, Łukasz Wicherek²

Received: 23.10.2012

Accepted: 15.11.2012

Published: 31.12.2012

Analiza porównawcza immunoreaktywności metalotioneiny w zaśniedzie groniastym i w doczesnej w zależności od zastosowanego leczenia – wyłącznie operacyjnego albo operacyjnego z uzupełniającą chemioterapią

The immunohistochemical analysis of metallothionein in complete hydatidiform mole and in decidual cells in correlation with the applied therapy of surgery alone or surgery followed by chemotherapy

Сравнительный анализ иммунореактивности металлотионеина при пузырном заносе и в децидуальной оболочке матки в зависимости от примененного лечения – исключительно операционного или операционного в сочетании с дополнительной химиотерапией

¹ Klinika Ginekologii Onkologicznej UJ CM w Krakowie

² Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej, Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka, Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Pielęgniarstwa Ginekologicznego CM UMK w Bydgoszczy

³ Klinika Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Duisburg-Essen, Niemcy

⁴ Katedra Patomorfologii UJ CM w Krakowie

⁵ Klinika Ginekologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Correspondence to: Dr hab. n. med. Łukasz Wicherek, prof. UMK, Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej, Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka, ul. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz, tel.: 52 374 33 99, 52 374 38 74, e-mail: mowicher@cyf-kr.edu.pl

Podziękowania

Pragniemy podziękować Profesorom Jerzemu Stelmachowowi oraz Antoniemu Baście za ich rady, konsultację i przyjazne słowa wsparcia.

Chcemy także wyrazić wdzięczność Dr. Zbigniewowi Pawłowiczowi za stworzenie warunków sprzyjających pracy badawczej oraz Christine Maisto i Dr. Magdalenie Dutsch-Wicherek za ich nieocenioną pomoc.

Niniejsza praca została sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr grantu 5921/B/P01/2010/38

Acknowledgements

We wish to thank Professors Jerzy Stelmachow and Antoni Basta for his advice, helpful discussions, and friendly words of support. We would also like to thank Dr. Zbigniew Pawłowicz for generating the conditions advantageous for research. Moreover, we would like to thank Christine Maisto and Dr. Magdalena Dutsch-Wicherek for their assistance.

This work was funded by the Polish Ministry of Science and Higher Education, grant number 5921/B/P01/2010/38

Streszczenie

Wprowadzenie: Obecność metalotioneiny w *endometrium* i doczesnej, czynnika antyapoptotycznego, jest związana z opornością na apoptozę zarówno komórek *endometrium*, jak i komórek doczesnej zależną od aktywności komórek układu odpornościowego. Celem niniejszego badania była ocena immunoreaktywności metalotioneiny w ogniskach zaśniedu u pacjentek leczonych wyłącznie operacyjnie i u chorych, u których dodatkowo zastosowano chemioterapię. **Metoda:** Analizowano immunoreaktywność metalotioneiny zarówno w komórkach trofoblastu,

jak i w komórkach błony doczesnej uzyskanych w wyniku łyżeczkowania jamy macicy przeprowadzonego z powodu rozpoznania ciąży zaśnadowej całkowitej. Pacjentki podzielono na dwie podgrupy: chorych, które wymagały dodatkowej chemioterapii po zabiegu operacyjnym, oraz chorych, u których takiego leczenia nie zastosowano. **Wyniki:** Stwierdzono statystycznie znamienne niższe poziomy immunoreaktywności metalotioneiny w obrębie komórek trofoblastu pochodzących od pacjentek z zaśnadem groniastym całkowitym leczonych wyłącznie operacyjnie w porównaniu z pacjentkami, u których leczenie operacyjne uzupełniono chemioterapią. **Wniosek:** Oporność na apoptozę może zależeć od wewnątrzkomórkowej obecności metalotioneiny, co prawdopodobnie ma wpływ na przebieg kliniczny zaśniadu groniastego.

Słowa kluczowe: metalotioneina, zaśniad groniasty całkowity, chemioterapia, *endometrium*, doczesna

Summary

Introduction: The presence of metallothionein in both the endometrium and decidua is associated with the resistance of both endometrial and decidual cells to immune-mediated apoptosis. Consequently, the aim of the present study has been to typify metallothionein immunoreactivity within the molar lesions of both the patients who were treated with surgery alone and those who were also given chemotherapy. **Methods:** We analyzed the immunoreactivity of metallothionein in both the trophoblast and decidual cells derived from patients on whom curettage was performed due to a diagnosis of complete molar pregnancy. These patients were then divided into two subgroups according to whether or not they required chemotherapy following the surgical procedure. **Results:** We observed a statistically significantly lower metallothionein immunoreactivity levels within the trophoblast cells derived from the complete hydatidiform mole patients who had had surgery alone in comparison to the levels found in those patients for whom surgery was followed by chemotherapy. **Conclusion:** Resistance to apoptosis linked with metallothionein intracellular immunoreactivity may influence the clinical course of hydatidiform mole.

Key words: metallothionein, complete hydatidiform mole, chemotherapy, decidua, endometrium

Содержание

Введение: Наличие металлотионеина в эндометрии и в децидуальной оболочке матки, антиапоптотического фактора, связано с резистентностью к апоптозу как клеток эндометрия, так и клеток децидуальной оболочки, зависящей от активности клеток иммунологической системы. Цель настоящего исследования – дать оценку иммунореактивности МТ в очагах пузырного заноса у пациенток, у которых применили исключительно операционное лечение, и тех, которых дополнительно подвергли химиотерапии. **Метод:** Анализировали иммунореактивность металлотионеина в клетках трофобласта, а также в клетках децидуальной оболочки, полученных в результате выскабливания полости матки, проведенного после диагностирования беременности при полном пузырном заносе. Пациенток определили в две подгруппы: больных, которые нуждались в дополнительной химиотерапии после хирургической операции, и больных, у которых такое лечение не применялось. **Результаты:** Констатировали статистически значимый более низкий уровень иммунореактивности металлотионеина в области клеток трофобласта, взятых у пациенток с полным пузырным заносом, у которых применили исключительно операционное лечение в сравнении с пациентками, у которых операционное лечение совместили с химиотерапией. **Вывод:** Резистентность к апоптозу может зависеть от внутриклеточного наличия металлотионеина, что вероятно влияет на клиническое течение пузырного заноса.

Ключевые слова: металлотионеин, полный пузырный занос, химиотерапия, эндометрий, децидуальная оболочка (матки)

WSTĘP

Pacjentki z zaśnadem groniastym całkowitym wymagają ścisłej obserwacji klinicznej przez pełny rok od rozpoznania, ponieważ w niektórych przypadkach konieczna jest uzupełniająca chemioterapia. Skuteczność chemioterapii jest ściśle związana ze stanem międzykomórkowego mikrośrodowiska nowotworu^(1,2). Jedną z istotnych zmian mikrośrodowiska na poziomie molekularnym określającą skuteczność chemioterapii stanowi oporność komórek nowotworowych na apoptozę.

INTRODUCTION

Patients with complete hydatidiform mole require precise clinical observation for a full year following diagnosis because some cases also need an application of chemotherapy. The effectiveness of the chemotherapy is closely linked to the status of the tumor microenvironment^(1,2). One of the important molecular changes in the microenvironment that determines the effectiveness of the chemotherapy is tumor-cell resistance to apoptosis. This phenomenon seems to be linked to the

Wydaje się, iż zjawisko to jest związane z obecnością metalotioneiny (MT) w cytoplazmie zarówno komórek nowotworowych, jak i komórek zrębu⁽³⁾, jako że ekspresję MT stwierdzono w obu rodzajach komórek⁽⁴⁻⁹⁾. Ponadto wiadomo, że silna ekspresja MT w komórkach raka jajnika wiąże się z opornością na chemioterapię na bazie pochodnych platyny⁽¹⁰⁾. To zjawisko oporności na apoptozę jest szczególnie ważne dla zachowania homeostazy w obrębie błony śluzowej macicy, gdzie komórki trofoblastu penetrują do błony doczesnej, ponieważ mikrośrodowisko *endometrium* jest zdominowane przez migrujące komórki układu odpornościowego. Właściwa równowaga między komórkami trofoblastu, doczesnej i komórkami odpornościowymi jest utrzymywana dzięki oporności komórek doczesnej i trofoblastu na apoptozę⁽¹¹⁻¹³⁾.

W poprzednim badaniu wykazaliśmy, że zarówno *endometrium*, jak i doczesna charakteryzują się ekspresją MT i że intensywność immunoreaktywności MT waha się zależnie od fazy cyklu miesięczkowego albo stadium rozwoju ciąży^(13,14). Dodatkowo ekspresję MT stwierdzono w komórkach trofoblastu^(11,12). Ie-Ming Shih zasugerował, że choć zaśniad groniasty może naciekać miejscowo i dawać przerzuty, to pod względem biologicznym stanowi jedynie nieprawidłowo rozwiniętą tkankę łożyskową, a nie nowotwór *sensu stricto*⁽¹⁵⁾. Niemniej jednak zasadniczy proces złośliwy obejmuje zarówno naciekanie podścieliska, jak i tworzenie przerzutów odległych, co oznacza, że niektóre pacjentki z zaśniadem groniastym całkowitym będą wymagały chemioterapii. Co więcej, rozwój zaśniadu groniastego wiąże się z aberracją chromosomalną w komórkach trofoblastu, jaka nie występuje w tych komórkach podczas ciąży prawidłowej⁽¹⁵⁾. Kim i wsp. stwierdzili, że ekspresja 213 różnych genów w komórkach trofoblastu u kobiet z zaśniadem jest odmienna od ekspresji tych samych genów w komórkach trofoblastu pobranych od kobiet z ciążą prawidłową⁽¹⁶⁾. Dla celów obecnego badania postanowiono przeanalizować interakcję między komórkami trofoblastu i komórkami układu odpornościowego, zależnie od rodzaju leczenia zastosowanego w danym przypadku – wyłącznie operacyjnego albo operacyjnego z uzupełniającą chemioterapią.

Celem obecnego badania było określenie immunoreaktywności zmian zaśniadowych u pacjentek leczonych wyłącznie operacyjnie oraz u chorych, u których dodatkowo zastosowano chemioterapię.

MATERIAŁ I METODA

PACJENTKI

Oceniane próbki tkanek uzyskano od 22 pacjentek, u których przeprowadzono lyżeczkowanie jamy macicy po rozpoznaniu całkowitego zaśniadu groniastego. Diagnozę postawiono na podstawie przezpochwowej ultrasonografii i poziomu β -HCG w osoczu ocenianego w pierwszym trymestrze ciąży [średnia wartość: 16 073 (\pm 16 515)],

presence of metallothionein (MT) within the cytoplasm of both the tumor and stoma cells⁽³⁾; indeed, MT expression has been found in both types of cells⁽⁴⁻⁹⁾. Moreover, it is well known that the strong expression of MT in ovarian cancer cells is associated with resistance to a platinum-based chemotherapy regime⁽¹⁰⁾. The phenomenon of resistance to apoptosis is especially important for homeostasis within the endometrium (where the trophoblast cells infiltrate the decidua since the endometrium microenvironment is dominated by infiltrating immune cells) – the proper balance between trophoblast, decidual, and immune cells is maintained by the resistance of decidual and trophoblast cells to apoptosis⁽¹¹⁻¹³⁾. In our previous study we demonstrated that both the endometrium and decidua are typified by the expression of metallothionein and that the intensity of MT immunoreactivity fluctuates according to the particular phase in the menstrual cycle or stage in the development of the pregnancy^(13,14). Additionally, MT expression has been found in trophoblast cells^(11,12). Ie-Ming Shih has posited that while hydatidiform moles may locally invade and metastasize, biologically they merely represent abnormally formed placental tissue and not true neoplasia⁽¹⁵⁾. In contrast, the fundamental malignant process comprises both the infiltration of the stroma and the formation of distinct metastases, and this means that some cases of complete hydatidiform mole will require chemotherapy. Furthermore, the development of hydatidiform mole is linked to a chromosomal aberration within trophoblast cells not present in these same cells during normal pregnancy⁽¹⁵⁾. Kim et al. have revealed that the gene expression for 213 different genes in the trophoblast cells of women with complete hydatidiform mole (CM) is quite different when compared with the same gene expression in the trophoblasts taken from women with normal pregnancies⁽¹⁶⁾. For the purposes of this study, then, we have decided to look at the interaction between immune and trophoblast cells, taking into account the type of therapy applied in each case: surgery alone or surgery followed by chemotherapy.

Consequently, the aim of the present study has been to typify the MT immunoreactivity within molar lesions in both the patients treated with surgery alone and those also given chemotherapy.

MATERIAL AND METHODS

PATIENTS

The tissue samples evaluated in our study were obtained from 22 patients on whom curettage was performed following a diagnosis of complete molar pregnancy. The diagnosis was established based on transvaginal ultrasonography and on the levels of beta HCG serum observed during the first trimester of pregnancy [mean 16 073 (\pm 16 515)] and was confirmed through histopathological verification. The tissue samples were collected during

a dodatkowo potwierdzono w badaniu histopatologicznym. Próbkę tkanek pobierano podczas zabiegów operacyjnych przeprowadzanych w Klinice Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie między listopadem 2006 a grudniem 2009 roku. Pacjenci dodatkowo podzielono na dwie podgrupy: chorych, które wymagały dodatkowej chemioterapii po zabiegu operacyjnym, oraz chorych, u których takiego leczenia nie zastosowano. U pacjentek wymagających uzupełniającej chemioterapii obserwowano wzrost poziomu β -HCG w osoczu po zabiegu. W ramach chemioterapii podawano metotreksat. W każdym przypadku uzyskano świadomą zgodę pacjentki, a przed samym badaniem także akceptację Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (DK/KB/CM/0031/447/2010).

IMMUNOHISTOCHEMIA

Analiza immunohistochemiczna została przeprowadzona w Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Po zbadaniu całego materiału tkankowego uzyskanego od wszystkich pacjentek przez wyłuszczenie (preparaty barwione hematoksyliną-eozyną przygotowane z materiału utrwalonego w sposób standardowy w roztworze formaliny i zatopionego w bloczkach parafinowych) wybierano reprezentatywny jeden bloczek parafinowy do dalszych badań immunohistochemicznych. W każdym przypadku skrawki o grubości 4 μ m obejmujące kosmki błony doczesnej i kosmki zaśniadu barwiono w celu uwidocznienia ekspresji MT. Wykorzystano mysie przeciwciała monoklonalne przeciw metalotioneinie [UC1MT] (ab 12228) (Abcam plc, 330, Cambridge Science Park, Cambridge, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:25, z zastosowaniem inkubacji próbek w temperaturze +4°C przez całą noc w komorze wilgotnej i pominięciem procedury ujawnienia antygenu (*unmasking*) zgodnie z instrukcją producenta. Analiza immunohistochemiczna była przeprowadzona ręcznie przy użyciu systemu wykrywania UltraVision LPValue (Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). W celu uwidocznienia produktów reakcji wykorzystano AEC (3-amino-9-etylo-karbazol) jako chromogen (AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use, DAKO, Dania) (zabarwienie produktu finalnego na kolor pomarańczowo-czerwony) albo DAB+chromogen (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (zabarwienie złoto-brązowe produktu finalnego), używając przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie stosowano barwienie kontrastowe skrawków hematoksyliną Meyera i zanurzano je w żelu glicerolowym. Dodatkowo wykorzystano próbkę tkanki z raka sutka jako pozytywną kontrolę dla MT. Wszystkie barwienia przeprowadzono zgodnie z tą samą procedurą, z pominięciem pierwotnej reakcji z przeciwciałem jako kontroli negatywnej.

Ekspresja MT (w cytoplazmie, z barwieniem jąder komórkowych lub bez ich barwienia) w komórkach doczesnej

surgical procedures performed in the Department of Gynecology, Obstetrics, and Oncology of the Jagiellonian University, Krakow, Poland between November, 2006 and December, 2009. The patients were additionally divided into two subgroups according to whether or not they had needed chemotherapy following the surgical procedure. An increase in the beta HCG serum level was observed following the surgical procedure in those patients who did require chemotherapy. For the chemotherapy methotrexate was used. The patient's consent was obtained in each case, and prior to the present study we also obtained the approval of the Jagiellonian University Ethical Committee for our research program (DK/KB/CM/0031/447/2010).

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemical analysis was performed in the Department of Pathomorphology of the Jagiellonian University. After evaluating the entire curettage material (H&E stained slides made from the material routinely fixed in formalin solution and processed to paraffin blocks) from each case, the adequate single paraffin block was selected for further immunohistochemistry. For each case, four-micrometer slides that contained the deciduas and molar villi were stained to visualize the expression of MT. Mouse monoclonal [UC1MT] to metallothionein (ab 12228) (Abcam plc, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, UK) was used in dilution 1:25, with incubation of the specimens at +4°C over night in the humidified chamber without an unmasking procedure according to the manufacturer's instruction. Immunohistochemistry was performed manually by the application of the UltraVision LPValue Detection System (Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). Visualization of the reaction products was performed using AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole) as a chromogen (AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use, DAKO, Denmark) (orange-red color of the final product) or DAB+chromogen (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (gold-brown color of the final product) for 10 min at room temperature. Sections were counterstained with Meyer's hematoxylin and mounted in glycergel. Furthermore, a breast cancer specimen was used as a positive control for MT. All stainings were done according to the same procedure, except that the primary antibody was omitted as a negative control. The MT expression (cytoplasmic with/without nuclear staining) in decidual cells and molar villi was analyzed by an experienced pathologist (G.K.). The degree of MT positivity was then evaluated semiquantitatively as a percentage of the overall number of MT-positive decidual and trophoblastic cells found in the entire specimen (at least 10 high power – obj. magn. $\times 40$ – fields), using the following scale: 0 – no reactivity, +1 – staining of up to 10% of the cells (usually weak cytoplasmic), +2 – expression in 11-30% of the cells (usually marked cytoplasmic,

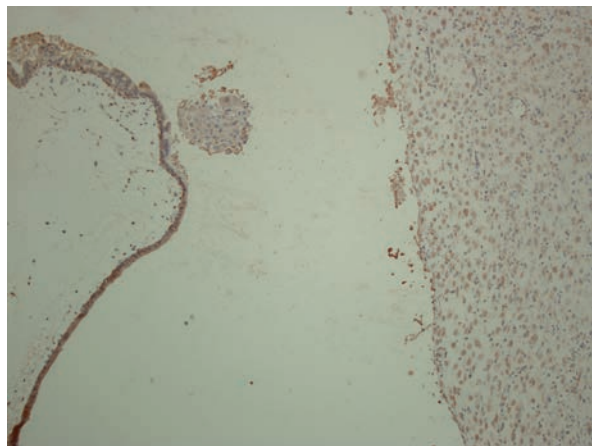
i w kosmkach zaśniadu była oceniana przez doświadczono-patologa (G.K.). Nasilenie ekspresji MT oceniano metodą półilościową jako odsetek komórek MT-dodatnich w stosunku do całkowitej liczby komórek doczesnej i komórek trofoblastu widocznych w preparacie (co najmniej 10 pól widzenia przy wysokim, 40-krotnym powiększeniu), z zastosowaniem następującej skali: 0 – brak reaktywności, +1 – wybarwienie do 10% komórek (zwykle słabe zabarwienie cytoplazmy), +2 – ekspresja w 11-30% komórek (zwykle wyraźne zabarwienie cytoplazmy, czasem także jąder), +3 – silna ekspresja obecna w ponad 30% komórek.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Rozkład zmiennych w badanych grupach kobiet oceniany testem Shapiro-Wilka wskazuje, że wyniki wszystkich badanych odbiegały od normy. Znamienność statystyczną różnic międzygrupowych oceniano testem Kruskala-Wallisa z jednoczynnikową analizą wariancji i rangowaniem. Tam, gdzie to możliwe, stosowano test U Manna-Whitneya. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy wykorzystaniu oprogramowania Statistica 8.0. Za próg znamienności statycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

Komórki trofoblastu MT-immunopoztywne stwierdzono we wszystkich przypadkach zaśniadu groniastego całkowitego (rys. 1-3), a statystycznie znamienne różnice zaobserwowano między poziomem immunoreaktywności MT



Rys. 1. Silna ekspresja MT w wielu komórkach, zarówno błony doczesnej (prawa połowa zdjęcia), jak i komórek trofoblastycznych kosmka zaśniadu groniastego (lewa połowa zdjęcia). Powiększenie 10×. Chromogen AEC

Fig. 1. Strong expression of MT in many cells of both decidua (right half of the picture) and trophoblastic cells of the molar villus (left half of the picture). Obj. magn. $\times 10$ (AEC as chromogen)

sometimes also nuclear), +3 – high expression, in more than 30% of the cells.

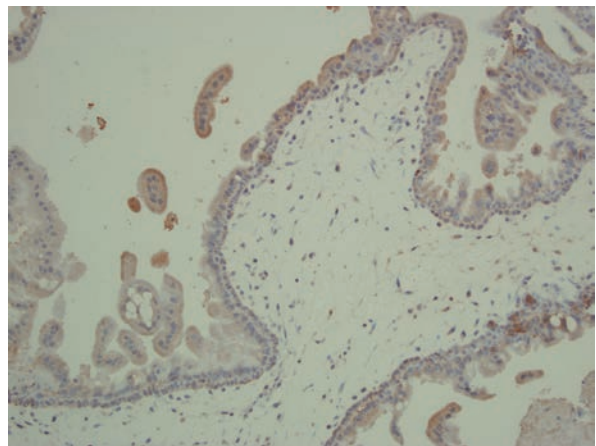
STATISTICAL ANALYSIS

The distribution of variables in the study groups of women checked with the use of the Shapiro-Wilk test showed that each of the women was different from normal. The statistical significance between the groups was determined by the Kruskal-Wallis test one-way analysis of variance by ranks. The Mann-Whitney U test was then used as applicable. All statistical analyses were carried out with the Statistica 8.0 software program. A $p < 0.05$ was considered indicative of statistical significance.

RESULTS

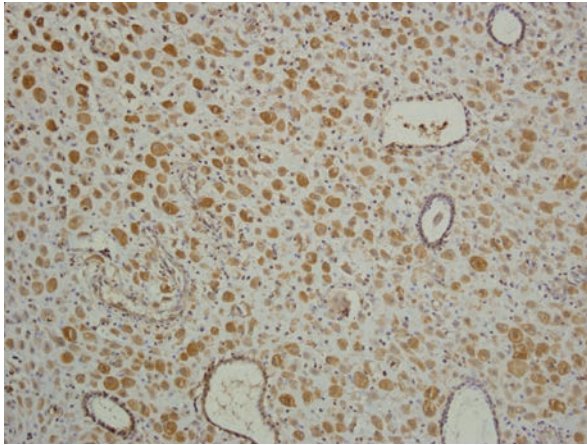
MT-immunopositive trophoblast cells were found in all the cases of complete mole hydatidiform (figs. 1-3), and statistically significant differences were observed between the MT immunoreactivity levels within the molar lesions of those patients who had undergone both the surgical procedure and subsequent chemotherapy compared to the levels found in those who had had only the surgery (fig. 4).

MT-immunopositive decidual cells were discovered in all the cases of complete mole hydatidiform (figs. 1, 5). We did not, however, observe statistically significant differences between the MT-immunoreactivity levels in the decidual cells of patients with complete mole who had had surgery alone when compared with the levels found in the



Rys. 2. Słabo dodatni odczyn immunohistochemiczny MT komórek trofoblastycznych (silniejszy w warstwie pośredniej syncytiotrofoblastu niż w warstwie cytotrofoblastu) w kosmku zaśniadu. Powiększenie 20×. Chromogen AEC

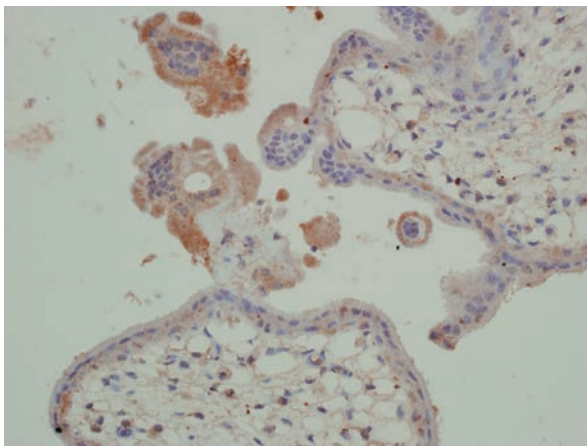
Fig. 2. Weak MT-immunopositivity of the trophoblastic cells (stronger in intermediate/syncytiotrophoblast than in the cytotrophoblast) of the molar villus. Obj. magn. $\times 20$ (AEC as chromogen)



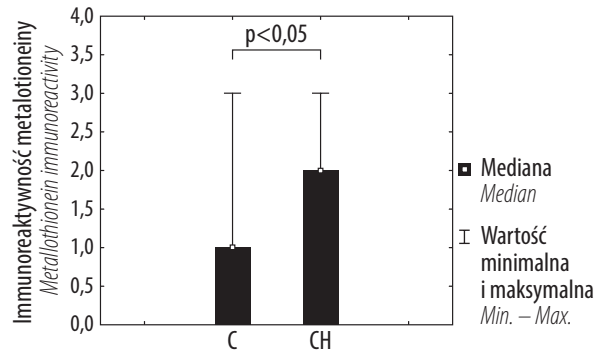
Rys. 3. Silna reakcja na MT w prawie wszystkich komórkach błony doczesnej. Powiększenie 10×. Chromogen DAB
Fig. 3. Strong reaction for MT in almost all decidual cells. Obj. magn. ×10 (DAB as chromogen)

w obrębie zmian zaśniadowych od pacjentek poddanych operacji i chemioterapii a poziomem immunoreaktywności stwierdzonym u osób leczonych wyłącznie chirurgicznie (rys. 4).

Komórki doczesnej MT-immunopoztywne wykryto we wszystkich przypadkach zaśniadu groniastego całkowitego (rys. 1, 5). Nie zaobserwowano jednak statystycznie znamiennych różnic między poziomem immunoreaktywności MT w komórkach doczesnej u pacjentek z zaśniadem całkowitym leczonych wyłącznie operacyjnie a poziomem stwierdzonym w komórkach pacjentek z zaśniadem całkowitym leczonych operacyjnie, a następnie chemioterapią (rys. 6).



Rys. 5. Umiarkowana ekspresja MT w komórkach trofoblastycznych. Powiększenie 60×. Chromogen AEC
Fig. 5. Moderate expression of MT in trophoblastic cells. Obj. magn. ×60 (AEC as chromogen)



Rys. 4. Poziom immunoreaktywności MT w ogniskach zaśniadu pacjentek leczonych zarówno operacyjnie, jak i chemioterapią (CH) w porównaniu z poziomem stwierdzonym u pacjentek leczonych wyłącznie operacyjnie (C)

Fig. 4. MT immunoreactivity levels within the molar lesions of patients who underwent both the surgical procedure and subsequent chemotherapy (CH) compared to the levels found in patients who underwent surgery alone (C)

cells of the complete mole patients who had had surgery followed by chemotherapy (fig. 6).

DISCUSSION

In our study we observed a statistically significantly lower MT immunoreactivity level within the trophoblast cells derived from the patients who were treated for complete hydatidiform mole with surgery alone in comparison to those patients for whom chemotherapy was needed following the surgery.

To our knowledge, this is the first investigation to focus on the immunoreactivity levels of MT within hydatidiform mole and decidual cells in light of the subsequent need of the patient for adjuvant chemotherapy.

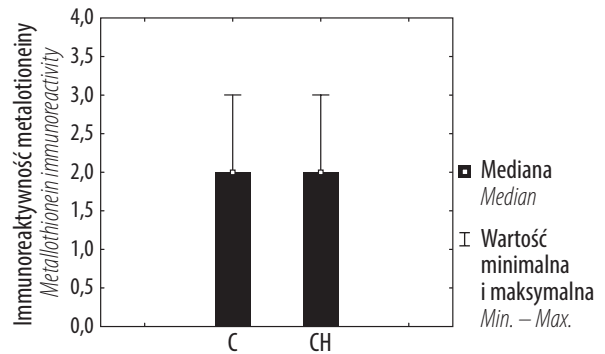
Metallothionein is a well-known cysteine-rich protein involved in the protection of MT-positive cells against apoptosis. MT intracellular immunoreactivity was observed in both the endometrium and decidua of all the patients. Furthermore, the MT endometrial immunoreactivity levels were found to fluctuate according to the particular phase of the menstrual cycle⁽¹³⁾. In our previous study we postulated that the presence of MT in both the endometrium and decidua is linked with resistance to immune-mediated apoptosis. As the MT immunoreactivity level fluctuates in response to the different menstrual cycle phases, the immune cell infiltration within the endometrium also changes. During the implantation process, the homeostasis of the decidua and the endometrium is regulated by the interaction of trophoblast, endometrium, and immune cells. Molecular changes such as MT fluctuation secure an adequate level of resistance to immune-mediated apoptosis in both trophoblast and decidual cells. The proper course of this interaction among

OMÓWIENIE

W badaniu stwierdzono statystycznie znacznie niższy poziom immunoreaktywności MT w komórkach trofoblastu pobranych od pacjentek leczonych z powodu zaśnięcia goniastego całkowitego wyłącznie operacyjnie w porównaniu z osobami, u których po operacji konieczne było dodatkowe włączenie chemioterapii.

Według wiedzy autorów jest to pierwsze badanie dotyczące korelacji między poziomem immunoreaktywności MT w komórkach zaśnięcia goniastego i w komórkach doczesnej a koniecznością późniejszego zastosowania uzupełniającej chemioterapii u danej pacjentki.

Metalotioneina jest ogólnie znanym białkiem bogatym w cysteinę, biorącym udział w ochronie komórek MT-dodatnich przed apoptozą. Wewnątrzkomórkową immunoreaktywność na MT stwierdzono zarówno w błonie śluzowej macicy, jak i w błonie doczesnej u wszystkich pacjentek. Wykazano poza tym, że poziom immunoreaktywności MT w *endometrium* zmienia się zgodnie z fazą cyklu menstruacyjnego⁽¹³⁾. W poprzednim badaniu autorzy sugerowali, że obecność MT zarówno w błonie śluzowej macicy, jak i w błonie doczesnej wiąże się z opornością na apoptozę zależną od czynników immunologicznych. Jako że immunoreaktywność MT jest różna w różnych fazach cyklu menstruacyjnego, nasilenie nacieku komórek immunologicznych w obrębie błony śluzowej macicy także podlega zmianom. W czasie procesu implantacji homeostaza błony doczesnej i błony śluzowej macicy zależy od interakcji między trofoblastem, *endometrium* i komórkami immunologicznymi. Zmiany na poziomie molekularnym, np. wahania ekspresji MT, zapewniają odpowiedni stopień odporności na apoptozę zależną od czynników immunologicznych zarówno komórkom trofoblastu, jak i komórkom błony doczesnej. Właściwy przebieg tej interakcji między komórkami trofoblastu, doczesnej i układu odpornościowego ma kluczowe znaczenie dla rozwoju prawidłowej ciąży. Jednak podczas implantacji komórek trofoblastu w ognisku zaśnięcia równowaga między apoptozą i regulacją procesów proliferacji zostaje zaburzona zarówno w komórkach trofoblastu, jak i w komórkach *endometrium*. Ekspresja cząsteczki anty-apoptotycznej Bcl-2 jest silniejsza w komórkach trofoblastu w ognisku zaśnięcia niż w prawidłowych komórkach trofoblastu. Podobnie ekspresja EGFR (receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu), związanego z proliferacją komórkową, była silniejsza w komórkach trofoblastu pochodzących od kobiet z zaśnięciem goniastym niż w komórkach trofoblastu kobiet będących w pierwszym trymestrze prawidłowej ciąży⁽¹⁷⁾. Co więcej, ekspresja pro-apoptotycznego białka, np. p53 – silnie wyrażona w prawidłowych trofoblastach – była prawie niewykrywalna w trofoblastach pochodzących z ognisk zaśnięcia⁽¹⁷⁾. Najbardziej zauważalnymi komórkami układu immunologicznego naciekającymi błonę doczesną były komórki NK (*natural killer*), zawierające w cytoplazmie granzym B,



Rys. 6. Różnice w poziomie immunoreaktywności MT między komórkami błony doczesnej u pacjentek z zaśnięciem goniastym całkowitym leczonych wyłącznie operacyjnie (C) w porównaniu z pacjentkami z zaśnięciem całkowitym leczonych operacyjnie, a następnie chemioterapią (CH)

Fig. 6. The differences between the MT immunoreactivity levels in the decidual cells of patients with complete mole who underwent surgery alone (C) compared with the levels of those with complete mole who underwent surgery followed by chemotherapy (CH)

trophoblast, decidual, and immune cells is crucial for the development of normal pregnancy. However, during the implantation of trophoblast cells in molar lesion the balance between apoptosis and the regulation of the proliferation processes is disturbed in both the trophoblast cells and the endometrium. Bcl-2 (anti-apoptotic molecule) expression, however, was found to be stronger in the trophoblast cells of the molar lesion than in normal trophoblast cells. Similarly, the EGFR (epidermal growth factor receptor), which is linked with cell proliferation, was higher in the trophoblasts taken from women with CM than in the trophoblasts derived from women experiencing normal first-trimester pregnancies⁽¹⁷⁾. Moreover, while the expression of a pro-apoptotic protein such as p53 was marked within normal trophoblasts, it was almost undetectable within the trophoblasts of the molar lesion⁽¹⁷⁾. The most prominent cells within the immune cell infiltration into the decidua are NK cells which contain cytoplasm granzyme B, a strong activator of apoptosis in effector cells. The trophoblast cells in molar lesions may evade immune cell control through the expression of PI-9 which is an inhibitor of granzyme B⁽¹⁸⁾. Ma et al. have recently performed proteomic analysis on complete hydatidiform mole tissue, demonstrating that the malignant transformation of hydatidiform mole is linked to changes in the protein profile. They observed 32 different spots in proteomic analysis (comprising trophoblast cells derived from both patients with molar and those with normal pregnancies); represented were groups of proteins such as cytoskeletal protein, stress-associated proteins, apoptosis-associated proteins, and proteins that are involved in signal transduction as well as cell

silny aktywator apoptozy w komórkach efektorowych. Komórki trofoblastu w ogniskach zaśniadu mogą unikać kontroli ze strony komórek immunologicznych dzięki ekspresji PI-9 – inhibitora dla granzymu B⁽¹⁸⁾. Ma i wsp. w niedawno przeprowadzonej analizie proteomicznej tkanki zaśniadu groniastego całkowitego stwierdzili, że transformacja złośliwa zaśniadu groniastego wiąże się ze zmianami profilu białkowego komórek. Zaobserwowali 32 różne miejsca w analizie proteomicznej (obejmującej komórki trofoblastu pochodzące od pacjentek zarówno z zaśniadem, jak i z ciążą prawidłową); znalazły się tu grupy takich białek, jak białka cytoszkieletu, białka stresowe, białka związane z apoptozą i białka uczestniczące w transdukcji sygnałów, a także w proliferacji i różnicowaniu komórek⁽¹⁹⁾. Dodatkowo Chan i wsp. wykazali, że p-Stat3-Ser (727) [aktywator transkrypcji (Stat)3], biorący udział w regulacji apoptozy i w rozwoju zaśniadu groniastego, również może stanowić marker rozwoju inwazyjnego fenotypu zaśniadu groniastego⁽²⁰⁾. Jeśli rozwinię się taki fenotyp inwazyjny, pacjentka będzie wymagała chemioterapii, jak to zaobserwowano w przypadku raka jajnika, w zależnościach między zastosowanym leczeniem i stanem mikrośrodowiska nowotworu⁽²¹⁻²⁴⁾, a także w ciąży zaśniadowej⁽²⁵⁾. W niniejszym badaniu stwierdzono, że poziom immunoreaktywności MT był wyższy u pacjentek, które wymagały chemioterapii po operacji, niż u pacjentek wymagających wyłącznie leczenia operacyjnego. Nie jest to wynik zaskakujący, jeśli uwzględni się ww. zależność między ekspresją MT i odpornością na apoptozę.

WNIOSEK

Oporność na apoptozę może zależeć od wewnątrzkomórkowej obecności metalotioneiny, co prawdopodobnie ma wpływ na przebieg kliniczny zaśniadu groniastego.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Chen R., Alvero A.B., Silasi D.A., Mor G.: Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 57: 93-107.
2. Garnett C.T., Schlom J., Hodge J.W.: Combination of docetaxel and recombinant vaccine enhances T-cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 3536-3544.
3. Kondo Y., Rusnak J.M., Hoyt D.G. i wsp.: Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.* 1997; 52: 195-201.
4. Dutsch-Wicherek M., Popiela T.J., Klimek M. i wsp.: Metallothionein stroma reaction in tumor adjacent healthy tissue in head and neck squamous cell carcinoma and breast adenocarcinoma. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2005; 26: 567-574.
5. Popiela T.J., Klimek M., Wicherek L. i wsp.: The characterization of the exposure to immune mediated apoptosis and the regulation of immune cytotoxic activity in the environment of a neoplasm and in decidua. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006; 27: 779-785.

proliferation and differentiation⁽¹⁹⁾. Moreover, Chan et al. have demonstrated that p-Stat3-Ser (727) [activator of transcription (Stat)3], which is involved in the regulation of apoptosis and molar lesion development, may also be a marker for the development of the invasive phenotype of hydatidiform mole⁽²⁰⁾. If this invasive phenotype does develop, the patient will need chemotherapy, as it was observed in ovarian cancer and relationship between applied therapy and status of tumor microenvironment⁽²¹⁻²⁴⁾, and in molar pregnancy⁽²⁵⁾. In our study we have found that the MT immunoreactivity levels were higher in those patients who required chemotherapy after surgery than in those patients who needed surgery alone. This is not surprising given that the resistance to apoptosis was more strongly indicated.

CONCLUSION

Resistance to apoptosis linked with MT intracellular immunoreactivity may influence the clinical course of hydatidiform mole.

6. Popiela T.J., Rudnicka-Sosin L., Dutsch-Wicherek M. i wsp.: The metallothionein and RCAS1 expression analysis in breast cancer and adjacent tissue regarding the immune cells presence and their activity. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006; 27: 786-794.
7. Dutsch-Wicherek M.: RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63: 181-188.
8. Dutsch-Wicherek M., Tomaszewska R., Strek P. i wsp.: The analysis of RCAS1 and DFF-45 expression in nasal polyps with respect to immune cells infiltration. *BMC Immunol.* 2006; 7: 4.
9. Dutsch-Wicherek M., Sikora J., Tomaszewska R.: The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Front. Biosci.* 2008; 13: 4029-4038.
10. Surowiak P., Materna V., Maciejczyk A. i wsp.: Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch.* 2007; 450: 279-285.
11. Wicherek L., Galazka K., Lazar A.: Analysis of metallothionein, RCAS1 immunoreactivity regarding immune cell concentration in the endometrium and tubal mucosa in ectopic pregnancy during the course of tubal rupture. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2008; 65: 52-61.
12. Wicherek L., Galazka K., Popiela T.J. i wsp.: Metallothionein expression and infiltration of cytotoxic lymphocytes in uterine and tubal implantation sites. *J. Reprod. Immunol.* 2006; 70: 119-131.
13. Wicherek L., Popiela T.J., Galazka K. i wsp.: Metallothionein and RCAS1 expression in comparison to immunological cells activity in endometriosis, endometrial adenocarcinoma and endometrium according to menstrual cycle changes. *Gynecol. Oncol.* 2005; 99: 622-630.
14. Klimek M., Wicherek L., Galazka K. i wsp.: Cycle dependent expression of endometrial metallothionein. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2005; 26: 663-666.
15. Shih IeM., Kurman R.J.: Molecular basis of gestational trophoblastic diseases. *Curr. Mol. Med.* 2002; 2: 1-12.
16. Kim S.J., Lee S.Y., Lee C. i wsp.: Differential expression profiling of genes in a complete hydatidiform mole using cDNA microarray analysis. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103: 654-660.

17. Hussein M.R.: Analysis of p53, BCL-2 and epidermal growth factor receptor protein expression in the partial and complete hydatidiform moles. *Exp. Mol. Pathol.* 2009; 87: 63-69.
18. Buzza M.S., Hosking P., Bird P.I.: The granzyme B inhibitor, PI-9, is differentially expressed during placental development and up-regulated in hydatidiform moles. *Placenta* 2006; 27: 62-69.
19. Ma L., Xiang Y., Zhao J. i wsp.: Comparative proteomic analysis between benign and malignant-transformed hydatidiform mole. *J. Reprod. Med.* 2008; 53: 623-628.
20. Chan H.Y., Siu M.K., Zhang H.J. i wsp.: Activated Stat3 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with clinicopathological parameters and apoptotic indices. *Histopathology* 2008; 53: 139-146.
21. Wicherek L., Jozwicki W., Windorbska W. i wsp.: Analysis of Treg cell population alterations in the peripheral blood of patients treated surgically for ovarian cancer – a preliminary report. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011; 66: 444-450.
22. Basta P., Gałązka K., Stasienko E. i wsp.: Analiza immunoreaktywności antygenów B7H4 i HLA-G w ognisku wznowy raka jajnika i jego mikrośrodowisku. *Curr. Gynecol. Oncol.* 2011; 9: 9-17.
23. Wicherek Ł., Windorbska W., Wiśniewski M. i wsp.: Monoclonal antibodies in oncologic gynecology. Part I. *Curr. Gynecol. Oncol.* 2012; 10: 38-45.
24. Wicherek Ł., Windorbska W., Wiśniewski M. i wsp.: Monoclonal antibodies in oncologic gynecology. Part II. *Curr. Gynecol. Oncol.* 2012; 10: 46-60.
25. Wicherek L., Basta P., Wertel I. i wsp.: Analysis of RCAS1 immunoreactivity within hydatidiform mole cells and decidua cells according to the applied therapeutic strategy: surgery or surgery followed by chemotherapy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2012; 73: 106-112.

Zasady prenumeraty kwartalnika „Current Gynecologic Oncology”

1. Prenumeratę można rozpocząć od dowolnego numeru pisma. Prenumerujący otrzyma zamówione numery kwartalnika pocztą na podany adres.
2. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 40 zł. Przy zamówieniu rocznej prenumeraty (4 kolejne numery) koszt całorocznej prenumeraty wynosi 120 zł. Koszt całorocznej prenumeraty zagranicznej wynosi 50 dolarów.
3. Istnieje możliwość zamówienia numerów archiwalnych (do wyczerpania nakładu). Cena numeru archiwalnego – 40 zł.
4. Zamówienie można złożyć:
 - Wypełniając załączony blankiet i dokonując wpłaty w banku lub na pocztcie.
 - Dokonując przelewu z własnego konta bankowego (ROR) – wpłaty należy kierować na konto: Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa Deutsche Bank PBC SA 42 1910 1048 2215 9954 5473 0001 Prosimy o podanie dokładnych danych imiennych i adresowych.
 - Drogą mailową: redakcja@ginekologia.pl.
 - Telefonicznie lub faksem: tel.: 22 651 97 83, faks: 22 842 53 63.
 - Wypełniając formularz prenumeraty zamieszczony na stronie www.ginekologia.pl/gazeta.
5. Zamawiający, którzy chcą otrzymać fakturę VAT, proszeni są o kontakt z redakcją.

Rules of subscription to the quarterly “Current Gynecologic Oncology”

1. Subscription may begin at any time. Subscribers will receive ordered volumes of the journal to the address provided.
2. A single volume of the quarterly costs 40 PLN. The cost of annual subscription (4 consecutive volumes) is 120 PLN. The cost of annual subscription for foreign subscribers is 50 USD.
3. Archival volumes may be ordered at a price of 40 PLN per volume until the stock lasts.
4. Orders may be placed:
 - By filling-in attached form and making a payment by bank or post-office.
 - By making a money transfer from own bank account – payments should be made payable to: Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa Deutsche Bank PBC SA 42 1910 1048 2215 9954 5473 0001 Please provide a precise address and nominative data.
 - By e-mail: redakcja@ginekologia.pl.
 - By phone or by fax: phone: +48 22 651 97 83, fax: +48 22 842 53 63.
 - Filling-in a subscription form, which may be found on the page www.ginekologia.pl/gazeta.
5. Customers wishing a VAT invoice, are requested to contact directly the Editor.