Histohemijska karakterizacija epitelnih ovarijalnih tumora

Histochemical characterization of epithelial ovarian cancer

Zoran Milosavljević¹, Zlatibor Anđelković², Ivana Nikolić³

1 Fakultet medicinskih nauka Kragujevac, Institut za Histologiju i embriologiju Kragujevac
2 Medicinski fakultet u Kosovskoj Mitrovici, Institut za Histologiju i embriologiju Kosovska Mitrovica
3 Fakultet medicinskih nauka Kragujevac, Institut za Biohemiju

Zoran Milosavljevic¹, Zlatibor Andjelkovic², Ivana Nikolic³

1 Faculty of Medical Sciences Kragujevac, Department of Histology and Embryology, Kragujevac, Serbia
2 Faculty of Medical Sciences Kosovska Mitrovica, Department of Histology and Embryology, Kragujevac, Serbia
3 Faculty of Medical Sciences Kragujevac, Department of Biochemistry, Kragujevac, Serbia

PRIMLJEN 14.04.2014.
PRIHVACEN 11.06.2014.

RECEIVED 14.04.2014.
ACCEPTED 11.06.2014.

SAŽETAK

Cilj. Cilj našeg istraživanja je bilo određivanje prognostičke važnosti izmene sekrecije mucina i ekspresije Ki-67 antigena i IgA u tkivu tumora jajnika.

Metode. Tumorsko tkivo jajnika 42 pacijentkinje je histološki obrađivano i bojeno uz pomoć mucinohistochemijskih i imunocitohemijskih metoda.

Rezultati. Na našem materijalu marker proliferacije ćelija se pokazao kao validan prognostički faktor stepena atipije tumorskih ćelija. Imunoglobulin A je verifikovan u značajnoj meri u epitelu i sekretu kod benignih formi, a znatno manje kod malignih formi ovarijalnih neoplazmi. Histohemijska analiza mucina pokazala je izmenu od neutralnih do kiselih kako stepen malignosti tumora raste. Istovremeno u poljima anaplazije mucini nedostaju.

Zaključak. Marker proliferacije Ki-67, IgA i izmena sekrecije mucina su validni prognostički faktori kod ovarijalnih neoplazmi.

Ključne reči: Ki-67 antigen; imunoglobulin A; mucini; jajnik.

ABSTRACT

Objective. Study was designed to reveal the prognostic significance of Ki-67, IgA and mucin secretion in ovarian neoplasms.

Methods. Samples of ovarian tumours of 42 female patients were routinely processed and stained with anti-Ki67 and anti-IgA antibodies as well as with histochemistry methods for mucin verification.

Results. In our study proliferation marker Ki-67 was proven to be a good prognostic tool of the degree of the cellular atypia. High immunoglobulin A expression was verified in the epithelium and along the luminal border of well differentiated tumors. Histochemical mucin analysis showed quantitative and qualitative changes in mucin secretion that correlates with the degree of tumor differentiation.

Conclusion. Ki-67, IgA and epithelial mucins are valid prognostic factors in ovarian neoplasms.

Keywords: Ki-67 antigen; immunoglobulin A; mucins; ovary.

KORESPONDENCIJA / CORRESPONDENCE

Milosavljević Zoran, Fakultet medicinskih nauka, Svetozara Markovica br.69, 34000 Kragujevac, Telefon/Fax 034306800, E-mail: zormil67@medfkg.ac.rs

Milosavljević Zoran, Faculty of Medical Sciences, Svetozara Markovica No.69, 34000 Kragujevac, Serbia, Phone/Fax +38134306800, E-mail: zormil67@medfkg.ac.rs

UVOD

Incidenca tumora ovarijuma je poslednjih decenija u regionu Evrope u konstantnom porastu. Podatak da su maligni tumori ovog organa na sedmom mestu po učestalosti u svetu, a na četvrtom mestu po mortalitetu kod žena čine da ovaj organ u poslednje vreme sve više privlači pažnju istraživača.¹ Posebno je za nas važna činjenica da je Srbija na veoma visokom petom mestu u svetu po učestalosti ovog kancera. Kada je u pitanju zastupljenost prema patohistološkom tipu, epitelne ovarijalne neoplazme čine oko 65% svih tumora jajnika, dok njihovi maligni oblici čine blizu 90% kancera ovog organa.² Prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije grupu epitelih tumora jajnika čini nekoliko histoloških podtipova među kojima su najzastupljeniji serozni i mucinozni različitog stepena malignosti, od benignih, preko borderline do malignih formi.³ Izostanak simptomatologije u početnim stadijumima razvoja ovih tumora dovodi do toga da se dijagnoza bolesti postavlja relativno kasno, često tek kada se tumor nađe u uznapredovalom stadijumu, što posebnu važnost daje preciznom utvrđivanju patohistoloških prognostičkih faktora neoplazme.^{4,5} Tu se pre svega misli na proliferativni potencijal tumora, izmenu sekrecije mucina i očuvanost transporta sekretornog imunoglobulina A. Proliferativna aktivnost neoplazmi je jedna od njihovih najvažnijih prognostičkih karakteristika. Danas je standard za procenu ove aktivnosti upotreba markera proliferacije poput Ki-67 koji, kada su u pitanju ovarijalni tumori prema Wang-u i sar. ima prednost nad ostalima.^{6,7} Familija humanih mucina (MUC) se na osnovu ćelijske lokalizacije deli na transmembranske i sekretorne mucine. Obe vrste ovih visoko glikosilovanih proteina predstavljaju selektivnu molekularnu barijeru na površini epitela, a transmembranski i funkciju prenošenja signala, kako faktora rasta, tako i očuvanja integriteta epitela.¹ Autori sugerišu da izmene ekspresije mucina i njihovog stepena glikosilacije utiču na adheziju, diferencijaciju i transformaciju tumorskih ćelija, a u novije vreme se mucini istražuju kao potencijalni ciljevi antitumorske terapije.^{8,9} Kada je u pitanju lokalna imunološka odbrana sluznica važnu ulogu ima sekretorni imunoglobulin A.^{10,11} On se sastoji od sekretorne komponente, jednog J lanca i dva monomera IgA. Sekretorna komponenta je produkt normalnih i izmenjenih epitelih ćelija sluznice i žlezda i služi kao receptor za vezivanje serumskog IgA koji se nakon toga putem transportnih vezikula u ćeliji egzocitozom prebacuje u lumen i uzima učešće u imunološkoj odbrani. Autori uglavnom zastupaju mišljenje da je celularni, a ne humoralni imunitet važniji u odbrani organizma od neoplazmi, ali iako je možda uloga IgA prevashodno usmerena protiv izazivača zapaljenjskih procesa u sluznici, ne može se zanemariti značaj koju IgA ima u proceni očuvanosti polariteta epitelih ćelija.^{11,12} Zbog svega navedenog, cilj našeg ispitivanja

je bio da se kod epitelih ovarijalnih tumora različitog stepena maligniteta utvrdi i kvantifikuje proliferativni potencijal, identifikuje moguća izmena sekrecije mucina i imunoglobulina A u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja ovih parametara.

MATERIJAL I METODE

U toku istraživanja korišćen je hirurški materijal dobijen nakon ovariektomije i/ili ovariektomije sa histerektomijom. Sve procedure su izvedene u skladu sa smernicama Etičkog Komiteta i dobre kliničke prakse. U eksperimentalnoj grupi ukupno je bilo 42 biopsijska uzorka dobijena od pacijentkinja starosti od 24-73 godine sa dijagnozom epitelih tumora jajnika pri čemu je u grupi seroznih bilo 23, a u grupi mucinoznih tumora 19 uzoraka. Kao kontrola služilo je normalno tkivo jajnika udaljeno od promena. Svi uzorci su makroskopski pregledani i fiksirani u 10% rastvoru formaldehida u trajanju od 24 časa. Nakon rutinske obrade tkiva i kalupljenja u parafinske blokove pravljani su preseki debljine 4 mikrometara. Tkivni preseki su postavljeni na adherentne pločice i bojeni standardnom hematoksilin/eozin metodom u cilju verifikacije patohistoloških promena kao i imunocitohemijom (LSAB+/HRP) metodom sa anti-IgA (Abcam, USA, Ab75671, 1:400) i anti-Ki-67 (Abcam, USA, ab16667) antitelima koja je prethodno podrazumevala demaskiranje antigena, blokiranje peroksidazne aktivnosti i inkubaciju sa primarnim i sekundarnim antitelom. Histo-hemijska AB-PAS (pH=2,5) (Artisan, DAKO) metoda je korišćena za identifikaciju sekrecije epitelih mucina pri čemu alcijan blue (AB) boji kisele, a perjodna kiselina i Šifov reagens (PAS) neutralne mucine. Nakon bojenja, preseki tkiva su slikani mikroskopom (Olympus BX51, Japan) koji je opremljen kamerom visoke rezolucije. Sve slike su analizirane specijalizovanim softverom za analizu slike (Image ProPlus 4.1, Media Cybernetics, USA) uz pomoć koga je bilo moguće izvršiti uporednu kvantitativnu analizu imunocito-hemijskih i histohemijskih depozita u ispitivanom tkivu.

REZULTATI

Ispitivanjem distribucije ispitivanih tumora u odnosu na starost utvrdili smo da je najveći procenat pacijentkinja (52%) bio u rasponu od 50 do 70 godina starosti. Mikromorfološkim ispitivanjem na našem materijalu je utvrđeno da se i serozne i mukozne žlezdolike forme javljaju u tri patološke varijante: benigne, borderine i maligne forme pri čemu su i kod seroznih i kod mucinoznih tumora najređe bordeline forme (6,4 i 8,8%). Seroznih benignih tumora je bilo 34,4%, a malignih 14,4%, dok u slučaju mucinoznih tumora zastupljenost benigne forme bila 27,2%, a maligne 8,8%.

Imunocitohemijsko ispitivanje tkiva jajnika je pokazalo da je aktivnost Ki-67 markera proliferacije prisutno u jedrima svih tumora. Prema očekivanju, najslabija aktivnost je verifikovana u normalnom tiku jajnika, nešto snažnija kod benignih tumora i to posebno kod njihovih mucinoznih formi, dok su snažni, difuzno raspoređeni, depoziti ovog antigena nađeni kod svih malignih neoplazmi jajnika (slika 1 A), a posebno u poljima značajne jedarne atipije. Imunoekspresija sekretornog imunoglobulina A ima sličnu izraženost kao i Ki-67 vezano za tip neoplazme jajnika s tim što celularna lokalizacija nije ista.

Slika 1. Imunocitohemijske analize na Ki-67 marker (A), imunoglobulin A (B), asekreција mucina u loše diferentovanim poljima tumora (C) i hipersekrecija kiselih mucina kod malignih neoplazmi jajnika (D).

U normalnom pokrovnom epitelu jajnika imunoreaktivnost na IgA je veoma slabo izražena. Benigne žlezdolike forme mucinoznih tumora pokazuju snažnu aktivnost na ovaj molekul, dok sa porastom ćelijske atipije opada nivo njegovog pristustva u tkivu sve do potpunog odsustva u anaplastičnim poljima malignih tumora visokog histološkog gradusa i totalno poremećene tkivne organizacije. Imunoglobulin A je, kada je prisutan u neoplastičnom tkivu, dominantno lociran u apikalnom domenu epitelnih ćelija i intraluminalno, najviše po površini žlezdanih ćelija (slika 1 B).

Histohemijska detekcija mucina na našim uzorcima je pokazala da sa porastom tkivne atipije dolazi do sledećih promena: benigni mucinozni tumori pokazuju pojačanu sekreciju neutralnih mucina, dok njihove maligne forme pokazuju dominaciju kiselih mucina (slika 1 D). Karakteristično je kod loše diferentovanih neoplazmi ili veoma slaba sekrecija isključivo kiselih mucina ili pak potpuno odsustvo sekrecije bilo kojih mucina (slika 1 C) u delovima neoplazme sa anaplastičnim poljima.

DISKUSIJA

Incidenca tumora jajnika, pogotovo malignih formi, je u našoj zemlji visoka što nas svrstava na nezavidno peto mesto u svetu prema podacima SZO.^{1,2} Imajući u vidu činjenicu da neoplazme ovarijuma gotovo da ne daju ozbiljne simptome sve do uznapredovalog stadijuma, rana dijagnostika ovih bolesti je otežana, a samim i uspeh terapijskog pristupa nije na zadovoljavajućem nivou. Zbog ovih činjenica posebna važnost se pridaje pato-histološkim prognostičkim faktorima bolesti poput proliferativne aktivnosti tumorskih ćelija, očuvanosti polariteta i normalne funkcije ćelija. Mikromorfološko istraživanje na našem materijalu je pokazalo da zastupljenost pojedinih tipova i podtipova ovarijalnih tumora u značajnoj meri odgovara statističkim podacima iz literature. Slična konstatacije se može izreći kada je u pitanju imunocitohemijska detekcija KI-67, markera proliferacije, za koji autori sugerišu da daje validnije rezultate mitotske aktivnosti neoplastičnih ćelija ovarijuma nego neki slični markeri poput PCNA.⁶ Naši rezultati govore da ekspresija ovog markera verno korelira sa mikromorfološkim nalazima jer su znatni depoziti Ki-67 verifikovani baš u lošije diferentovanim tumorima, a posebno u poljima visoke ćelijske atipije. Imunoglobulin A, tj. njegova sekretorna forma se normalno nalazi kako u sekretu mukoza i tako i u epitelnim hiperplastičnim i tumorskim ćelijama drugih delova genitalnog sistema žene.¹³ On učestvuje u imunološkoj odbrani sluznica delujući uglavnom antibakterijski i delom antiviralno.¹¹ Kada je u pitanju pokrovni epitel jajnika, malo je literaturnih podataka koji govore o značajnosti IgA u antitumorskoj zaštiti. Brojni radovi sugerišu da je celuarni, a ne humoralni imuni odgovor značajniji u antitumorskoj zaštiti i osporavaju ulogu IgA u tom procesu, ali se on na našem materijalu pokazao kao odličan marker očuvanosti polariteta i transportne funkcije epitelnih ćelija.^{12,14} Benigne i dobro diferentovane maligne forme neoplazmi jajnika su u našoj studiji pokazale značajne depozite IgA, a poznato je da upravo one imaju dobru prognozu. Da li postoji značajnija uloga sekretorne varijante ovog imunoglobulina i u antitumorskoj zaštiti ostaje da se utvrdi u nekoj sledećoj studiji, ali pojedini autori sugerišu da je IgA efikasan u zaustavljanju rasta tumora kod miševa.¹⁵ Rezultati histohemijskog ispitivanja na eksperimentalnom materijalu su pokazali da, poput sekretornog IgA i mucini doživljavaju slične promene. Naime, od visoke sekrecije, posebno neutralnih mucina, kod benignih formi, do izmene tipa mucina u kisele pa čak i do asekreције bilo kojih mucina u poljima snažne atipije, nalazi upućuju na prognostičku važnost histohemijskih nalaza. Ovu tezu potvrđuje i veliko interesovanje istraživača za mucine zadnjih godina, pogotovo kada se došlo do zaključka da mucini imaju brojne važne uloge u sklopu signalnih puteva (MUC1), kontroli preživljavanja ćelija (MUC4), kao i onkogenezi (MUC13 i MUC16).⁸⁻¹⁰ U poslednje vreme

napor istraživača ide u pravcu korišćenja transmembranskih mucina kao ciljnih grupa za antitumorsku terapiju što samo potvrđuje našu sugestiju da su kvalitativne i kvantitativne izmene mucina kod ovarijalnih neoplazmi od visokog prognostičkog značaja.^{16,17}

REFERENCE

1. http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/ovarian_cancer_statistics.php
2. <http://www.ocrf.org/news/2014-ovarian-cancer-statistics>
3. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*. 2003 May 15; 97(10 Suppl): 2631-42
4. Lataifeh I, Marsden DE, Robertson G, Gebiski V, Hacker NF. Presenting symptoms of epithelial ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005; 45: 211-4.
5. Deligdisch L, Pénault-Llorca F, Schlosshauer P, Altchek A, Peiretti M, Nezhat F. Stage I ovarian carcinoma: different clinical pathologic patterns. *Fertil Steril*. 2007; 88: 906-10.
6. Wang S, Ma XY, Xia Y, Zhang LH. Expressions of Ki67, PCNA and mitotic index in ovarian epithelial tumors. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010; 41: 575-80.
7. Aune G1, Stunes AK, Tingulstad S, Salvesen O, Syversen U, Torp SH. The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011; 4: 444-53
8. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 874-85
9. Kaur S, Momi N, Chakraborty S, Wagner DG, Horn AJ, Lele SM, Theodorescu D, Batra SK. Altered Expression of Transmembrane Mucins, MUC1 and MUC4, in Bladder Cancer: Pathological Implications in Diagnosis. *PLoS One*. 2014; 9(3): e92742
10. Günther C, Neumann H, Vieth M. Esophageal epithelial resistance. *Dig Dis*. 2014; 32: 6-10
11. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2011; 4: 603-11
12. Catros-Quemener V1, Bouet F, Genetet N. Anti-tumor immunity and cellular cancer therapies. *Med Sci (Paris)*. 2003; 19: 43-53.
13. Kondi-Paphitis A1, Carvounis H, Kairi E, Frangou M, Papayanopoulou A, Deligeorgi H. Expression of a local immune defense system in the female genital tract. An immunohistochemical study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1999; 20: 141-3.
14. Ankri C, Shamalov K, Horovitz-Fried M, Mauer S, Cohen CJ. Human T cells engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity. *J Immunol*. 2013; 191: 4121-9
15. Boross P, Lohse S, Nederend M, Jansen JH, van Tetering G, Dechant M, Peipp M, Royle L, Liew LP, Boon L, van Rooijen N, Bleeker WK, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Leusen JH. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol Med*. 2013; 5: 1213-26.
16. Noya V, Bay S, Festari ME, García EP, Rodriguez E, Chiale C, Ganneau C, Baleux F, Astrada S, Bollati-Fogolin M, Osinaga E, Freire T. Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. *Int J Oncol*. 2013; 43: 775-84
17. Gaidzik N, Kaiser A, Kowalczyk D, Westerlind U, Gerlitzki B, Sinn HP, Schmitt E, Kunz H. Synthetic antitumor vaccines containing MUC1 glycopeptides with two immunodominant domains-induction of a strong immune response against breast tumor tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011; 50: 9977-81