

Ilościowa ocena stref organizatorów jąderkowych (AgNORs) w surowiczych nowotworach nabłonkowych jajnika

The assessment of the argyrophylic nucleolar organizer regions (AgNORs) count in serous ovarian neoplasms

Leszek Gottwald¹, Marian Danilewicz², Jacek Suzin¹, Andrzej Bieńkiewicz¹

Celem pracy było określenie przydatności analizy stref organizatorów jąderkowych (AgNORs) w ocenie stopnia złośliwości surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika. Badaniem objęto 110 kobiet leczonych operacyjnie w naszym ośrodku. Stwierdzono wzrost mAgNOR i pAgNOR, począwszy od surowiczych gruczolaków, przez guzy o złośliwości granicznej do raków jajnika. Wraz ze zmniejszaniem się zróżnicowania histologicznego raków mAgNOR i pAgNOR zwiększały się. Występowanie powyższych zależności w połączeniu z prostą metodyką i niską ceną badania czynią z oceny AgNORs potencjalnie przydatną metodę dodatkową w diagnostyce surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika.

Słowa kluczowe: strefy organizatorów jąderkowych, surowicze nowotwory jajnika

(Przegląd Menopauzalny 2003; 2:38–41)

Guzy pochodzące z nabłonka pokrywającego pierwotną jamę ciała stanowią najliczniejszą grupę nowotworów jajnika. Wśród nich znajduje się 80–85% pierwotnych guzów złośliwych tego narządu. Rak jajnika znajduje się na 4. miejscu wśród przyczyn zgonów na nowotwory złośliwe u kobiet. Odsetek 5-letnich przeżyć dla wszystkich stopni klinicznych tego nowotworu wy-

nosi 30–40% i w ciągu ostatnich 30 lat nie uległ znaczącej poprawie. Najczęściej spotykanym typem histologicznym raka jajnika jest gruczolakorak surowiczy [1].

W procesie nowotworzenia ulega załamaniu równowaga między częstością podziałów komórkowych, a śmiercią komórek na korzyść procesów proliferacyjnych. Ukazały się liczne prace, których autorzy umiesz-

¹ I Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, Instytut Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi; kierownik Kliniki i Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

² Pracownia Morfometrii Katedry i Zakładu Patomorfologii UM w Łodzi; kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. med. Wiesław Papier



czają ocenę proliferacji komórkowej guza wśród niezależnych czynników rokowniczych w chorobie nowotworowej [2, 3, 4, 5]. Wskazuje się m.in. na praktyczne znaczenie analizy ilościowej i morfologicznej srebrzonych stref organizatorów jąderkowych (AgNORs) oraz oceny ekspresji antygenów PCNA oraz Ki-67 w komórkach nowotworu [2, 6, 7, 8]. Dotychczas potwierdzono dużą wartość tych oznaczeń w odniesieniu do licznych nowotworów złośliwych (rak sutka, płuca, przewodu pokarmowego, trzonu i szyjki macicy, gruczołu krokowego, nowotwory ośrodkowego układu nerwowego i in.) [3, 4, 7, 9, 10]. W piśmiennictwie brakuje podobnych badań prowadzonych na reprezentatywnych i histologicznie jednorodnych grupach raków jajnika.

Cel pracy

Celem pracy było określenie przydatności analizy stref organizatorów jąderkowych (AgNORs) w ocenie stopnia złośliwości surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika.

Materiał i metody badań

Badaniem objęto 110 kobiet, operowanych w Instytucie Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi od 1.01.1998 r. do 1.10.2002 r. z powodu surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika. W grupie badanej było 29 chorych z gruczolakami, 12 kobiet z guzami granicznymi i 69 chorych na raka jajnika. Stwierdzono 17 surowiczych raków w stopniu G-1 (24,6%), 21 nowotworów G-2 (30,4%) i 31 raków jajnika G-3 (45,0%). Średni wiek chorych z gruczolakiem surowiczym wynosił $46,276 \pm 19,701$ lat, kobiet z surowiczym guzem granicznym $56,583 \pm 10,317$ lat, a chorych na raka jajnika: $51,880 \pm 16,511$ lat.

Każdorazowo wykonano i poddano ocenie histologicznej 2 grupy preparatów tkankowych z guza uzyskanego podczas operacji. Pierwszą grupę skrawków po odparafinowaniu barwiono hematoksyliną i eozyną i badano histopatologicznie. Drugą grupę odparafinowanych skrawków poddawano procedurze srebrzenia, a następnie badano w nich ilość ziarnistości AgNORs w komórkach nowotworu. W każdym preparacie srebrzonym wg Howella i Plotona poddano analizie średnią ilość stref organizatorów jąderkowych w komórkach nowotworu (mAgNOR) oraz odsetek komórek guza zawierających 5 lub więcej NORs (pAgNOR) ze 100 kolejnych jąder komórkowych oglądanych w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 400 razy. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu CSS Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK., USA).

Wyniki

Oceniono zależność pomiędzy typem histologicznym surowiczego guza jajnika, a średnią ilością stref organizatorów jąderkowych w komórkach nowotworu (mAgNOR) oraz odsetkiem komórek nowotworu zawierających 5 lub więcej NORs (pAgNOR). Wyniki zestawiono w tab. I. oraz II.

Tab. I. Średnia ilość stref organizatorów jąderkowych (mAgNOR) w komórkach surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika

Typ guza	n	MAGNOR	SD
gruczolaki	29	1,925	0,361
guzy graniczne	12	2,908	0,258
raki G1	17	3,742	0,253
raki G2	21	4,127	0,556
raki G3	31	4,745	0,922
ogółem raki	69	4,310	0,811

Tab. II. Procent komórek w poszczególnych typach surowiczych guzów jajnika zawierających 5 lub więcej NORs (pAgNOR)

Typ guza	n	PAGNOR	SD
gruczolaki	29	0,897	0,860
guzy graniczne	12	4,167	2,401
raki G1	17	22,118	10,030
raki G2	21	35,524	13,938
raki G3	31	52,258	20,651
ogółem raki	69	39,739	20,580

Stwierdzono, że istnieją różnice istotne statystycznie w średniej ilości AgNORs (mAgNOR) oraz w odsetkach komórek nowotworu zawierających 5 lub więcej NORs (pAgNOR) pomiędzy gruczolakami, guzami granicznymi i rakami jajnika, a wśród raków pomiędzy guzami G1, G2 i G3 (w każdym przypadku $p < 0,05$) (tab. I., tab. II.). Ustalono też, że występuje silna dodatnia korelacja między wzrostem mAgNOR oraz pAgNOR, a zwiększaniem się stopnia złośliwości surowiczych nowotworów jajnika od guzów łagodnych do raków jajnika. Uzyskane wartości współczynników korelacji ρ -Spearmana wynosiły odpowiednio: $\rho = 0,850$ ($p < 0,001$) i $\rho = 0,831$ ($p < 0,001$).

Stwierdzono występowanie silnej korelacji pomiędzy wartościami mAgNOR i pAgNOR w guzach łagodnych ($\rho = 0,610$; $p < 0,001$) i w rakach jajnika ($\rho = 0,899$;



$p < 0,001$), natomiast nie uzyskano podobnej zależności w guzach o granicznej złośliwości ($p = 0,442$; ns).

Dyskusja

Strefy organizatorów jąderkowych to segmenty metafazowych chromosomów, wokół których podczas telofazy podziału komórkowego tworzą się jąderka. NORs (*nucleolar organizer regions*) zlokalizowane są w okolicach przewężeń wtórnych chromosomów akrocentrycznych, czyli chromosomów 13., 14., 15., 21. i 22. pary. W ich skład wchodzi DNA kodujące rybosomalny RNA, związane z niehistonowymi białkami, które odpowiadają liczbie i wielkości stref organizatorów jąderkowych i mogą być uwidocznione za pomocą srebrzenia. W mikroskopie świetlnym są one wtedy widoczne jako czarne lub ciemnobrązowe ziarnistości w obrębie jądra komórkowego. Uważa się, że metafazowe ziarnistości AgNORs są znacznikami aktywnych stref organizatorów jąderkowych, a więc odpowiadają tym genom rybosomalnym, które ulegają ekspresji podczas interfazy. Ilość stref organizatorów jąderkowych jest wyraźnie związana z fazą cyklu komórkowego, a zwiększone ich ilości wskazują, że większość komórek jest w fazie S-G2, a tylko niewielka ich część znajduje się w fazie G1. Jest to cecha charakterystyczna dla komórek szybko dzielących się. Do takich komórek należą komórki nowotworowe [11, 12, 13, 24].

Metoda AgNORs, czyli jednostopniowe srebrzenie kolidowe regionów organizatorów jąderkowych jest jedną z najczęściej stosowanych metod w celu oceny proliferacji komórkowej. Pierwsze doniesienia dotyczące jej zastosowania w diagnostyce nowotworów pochodzą z lat 80. [11, 12]. Od tego czasu obserwuje się stały wzrost zainteresowania tą tanią i prostą, a jednocześnie bardzo użyteczną metodą. W praktyce stosuje się dwie metody oceny AgNORs. Pierwsza z nich polega na ocenie średniej ilości stref organizatorów jąderkowych w komórkach nowotworu (mAgNOR), w drugiej natomiast oblicza się odsetek komórek nowotworu zawierających 5 lub więcej NORs (pAgNOR). Uważa się, że mAgNOR odpowiada ocenie ploidii nowotworu, natomiast pAgNOR odzwierciedla aktywność proliferacyjną guza [6]. W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano duże podobieństwo pomiędzy zachowaniem się obu tych parametrów.

Metoda srebrzenia stref organizatorów jąderkowych znalazła już także zastosowanie w onkologii

ginekologicznej. Uważa się, że wzbogacenie diagnostyki mikroskopowej zmian w szyjce macicy o srebrzenie skrawków wg metody AgNOR może mieć dużą wartość w ocenie transformacji nowotworowej zmian przedrakowych oraz w prognozowaniu klinicznego przebiegu choroby nowotworowej [14, 15]. Pojawiły się także doniesienia o istnieniu zależności pomiędzy parametrami ziarnistości AgNORs, a odpowiedzią raka szyjki macicy na radioterapię. W odniesieniu do raka trzonu macicy zaobserwowano, że może to być czynnik pomocny w ustalaniu przynależności chorych na ten nowotwór do grup wysokiego i niskiego ryzyka [7, 9, 1].

W piśmiennictwie pojawiły się również publikacje, mówiące o zastosowaniu oceny stref organizatorów jąderkowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia nowotworów jajnika [1, 6, 8, 10, 17, 18, 19]. Uważa się, że zarówno ilość zgrupowań ziarnistości, jak i pojedynczych AgNORs, wreszcie łączna liczba tych ziarnistości wykazują istotny wzrost od zmian łagodnych przez guzy graniczne do nowotworów złośliwych jajnika, co potwierdziło przeprowadzone przez nas badanie. Stwierdzenie, że ilość ziarnistości AgNORs, podobnie jak dla raków o innym niż jajnik umiejscowieniu, rośnie ze wzrostem stopnia zróżnicowania komórkowego nowotworu również znalazło potwierdzenie w naszym materiale [6, 17]. Wg większości autorów najsilniej wyrażone są powyższe zależności właśnie w surowiczych nowotworach jajnika [8, 10, 17].

Wnioski

1. Stwierdza się wzrost średniej ilości stref organizatorów jąderkowych w komórkach nowotworów (mAgNOR) i podobny wzrost odsetka komórek nowotworów zawierających 5 lub więcej NORs (pAgNOR) począwszy od gruczolaków, przez guzy o złośliwości granicznej do raków jajnika.
2. Ilość stref organizatorów jąderkowych jest jednym z czułych wykładników stopnia złośliwości surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika.
3. Występowanie powyższych zależności w połączeniu z prostą metodyką i niską ceną badania czynią z oceny AgNORs potencjalnie przydatną metodę dodatkową w diagnostyce surowiczych nowotworów nabłonkowych jajnika.

Summary

Aim of study: To evaluate the usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) analysis in the assessment of malignancy in the serous ovarian neoplasms.

Material and methods: 110 women who underwent a surgical procedure between 1998–2002 in our department due to serous ovarian neoplasms (29 adenomas, 12 borderline and 69 carcinomas) were covered by the study. The specimens were prepared according



to the method described by Howell and Ploton. The mean number of AgNORs per nucleus (mAgNOR) and the mean percentage of nuclei with five or more AgNORs per nucleus (pAgNOR) were counted in the light microscope in 100 randomly chosen epithelial cell nuclei at 400 x oil immersion magnification.

Results: The mAgNOR and pAgNOR mean numbers were respectively: 1.925 ± 0.361 and 0.897 ± 0.860 in adenomas, 2.908 ± 0.258 and 4.167 ± 2.401 in borderline tumors, 4.310 ± 0.811 and 39.739 ± 20.580 in cancers. According to the grading of cancers it was as follows 3.742 ± 0.253 and 22.118 ± 10.030 in G1 tumors, 4.127 ± 0.556 and 35.524 ± 13.938 in G2 tumors, and 4.745 ± 0.922 and 52.258 ± 20.651 in G3 neoplasms. All the differences were statistically significant. The correlation between the tumor type and mAgNOR as well as pAgNOR from adenomas to G3 cancers was found.

Conclusions: We found an increase in mAgNOR and pAgNOR from serous adenomas through borderline tumors to cancers. Together with the tumor grade increase, an increase in mAgNOR and pAgNOR was observed. These findings together with easy methods and low costs make the evaluation of AgNORs at potential helpful method in the assessment of serous ovarian neoplasms.

Key words: argyrophilic nucleolar organizer regions, serous ovarian neoplasms

Piśmiennictwo

1. Markowska J. *Rak jajnika*. Springer PWN, Warszawa 1997: 9-10.
2. Ceccarelli C, Trere D, Santini D, et al. AgNORs in breast tumours. *Micron* 2000; 31 (2): 143-9.
3. Chiusa L, Galliano D, Formiconi A, et al. High and low risk prostate carcinoma determined by histologic grade and proliferative activity. *Cancer* 1997; 79 (10): 1956-63.
4. Costa Ad, de Araujo NS, Pinto Dd, et al. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1999; 28 (10): 438-41.
5. Miller B, Umpierre S, Tornos C, et al. Histologic characterization of uterine papillary serous adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56 (3): 425-9.
6. Ghazizadeh M, Sasaki Y, Araki T, et al. Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNOR analyses. *Am J Clin Pathol* 1997; 107 (4): 451-8.
7. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experimentia* 1980; 36: 1014-5.
8. Terlikowski S, Lenczewska A, Sulkowska M, et al. Heterogenność nowotworów nabłonkowych jajnika w analizie ekspresji białek regionów organizatorów jąderkowych. *Gin Pol* 2000; 71 (9): 1194-7.
9. Miller B, Flax S, Dockter M, et al. Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994; 74 (12): 3142-5.
10. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*. 2000; 31 (2): 121-6.
11. Gryczyński M, Niewiadomska H, Kobos J, et al. Ekspresja wybranych wskaźników apoptozy, proliferacji i przerzutowości w ocenie dynamiki rozrostu raka krtani. *Otolaryngol Pol* 2000; 54 (6): 615-9.
12. Nakae S, Nakamura T, Ikegawa R, et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region and proliferating cell nuclear antigen in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1998; 69 (1): 28-35.
13. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the Nucleolar Organizer Regions at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14.
14. Wierchniewska A. Przydatność ilościowej oceny stref organizatorów jąderkowych (AgNORs) oraz niektórych parametrów morfometrycznych jądra komórkowego w diagnostyce różnicowej wybranych zmian patologicznych szyjki macicy. Praca doktorska. AM Łódź 1997.
15. Mauri FA, Scampini S, Aldovini D, et al. AgNOR distribution in serous tumours of the ovary. *Pathologica* 1990; 82 (1081): 487-92.
16. Miller B, Morris M, Silva E. Nucleolar organizer regions: a potential prognostic factor in adenocarcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol* 1994; 54 (2): 137-41.
17. Criscuolo M, Martinelli AM, Migaldi M, et al. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in ovarian epithelial tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12 (3): 259-63.
18. Kędzia W, Rutkowski R, Jankowska A, et al. Markery proliferacji oraz parametry morfoimmunologiczne w ocenie czynników rokowniczych w rakach błony śluzowej macicy. *Gin Pol* 1997; 68 (4): 199-205.
19. Terlikowski S, Sulkowski S, Lenczewska A, et al. Study of borderline and invasive mucinous ovarian tumors using Ki-67 (MIB 1) antibodies and nucleolar organizer region (NOR) staining. *Arch Gynecol Obstet* 1999; 263 (1-2): 29-33.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. med. Jacek Suzin
I Klinika Ginekologii i Onkologii
Ginekologicznej
Instytutu Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Wileńska 37
94-029 Łódź

