

Immunoekspresja białek związanych z apoptozą i proliferacją w surowiczych nowotworach jajnika

Immunoexpression of proteins related to apoptosis and proliferation in serous ovarian tumour

Paweł Stawerski, Małgorzata Wągrowaska-Danilewicz, Olga Stasikowska, Marian Danilewicz

Zakład Nefropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;
kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Małgorzata Wągrowaska-Danilewicz

Przeгляд Menopauzalny 2010; 1: 23–27

Streszczenie

Wstęp: Nowotwory złośliwe jajnika ze względu na swą znaczną agresywność są przyczyną wysokiej śmiertelności wśród kobiet. Białko CAS (*cellular apoptosis susceptibility protein*) jest związane z mikrotubulami wrzeciona kariokinetycznego i prawdopodobnie bierze udział w procesach progresji nowotworów. Białko Ki-67 jest białkiem proliferacyjnym, którego immunoekspresja jest wskaźnikiem stopnia proliferacji nowotworów.

Cel pracy: Ocena immunoekspresji białka CAS oraz jej związku z aktywnością proliferacyjną nowotworu wyrażoną immunoekspresją białka Ki-67.

Materiał i metody: Badaniami objęto 43 pacjentki z surowiczymi nowotworami złośliwymi jajnika, którym w 29 przypadkach towarzyszyły przerzuty nowotworu. Immunoekspresję białka CAS oznaczano metodą półilościową, natomiast immunoekspresję białka Ki-67 badano za pomocą komputerowej analizy obrazu.

Wyniki: W grupie guzów jajnika dających przerzuty stwierdzono znamienne wyższą immunoekspresję białka CAS w porównaniu z grupą guzów niepowodujących przerzutów. Odsetek komórek wykazujących immunoekspresję białka Ki-67 był znamienne wyższy w guzach z przerzutami niż w przypadkach, w których przerzutów nie stwierdzono. W obu badanych grupach wykazano dodatnią korelację pomiędzy immunoekspresją białka CAS a stopniem proliferacji nowotworu wyrażonym immunoekspresją białka Ki-67, jednak korelacja ta nie była znamienna statystycznie.

Wnioski: Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy mogą sugerować, że ocena immunoekspresji białek związanych z proliferacją i apoptozą w surowiczych nowotworach jajnika może być pomocna w identyfikacji guzów o wyższym potencjale przerzutowym.

Słowa kluczowe: apoptoza, proliferacja, nowotwory surowicze jajnika, CAS, Ki-67

Summary

Introduction: Ovarian cancer takes fourth place as a cause of death from all cancers and first place from gynaecological malignancies in Poland. Recent investigations have noted the prognostic significance of proteins linked with proliferation (Ki-67) and apoptosis (CAS – cellular apoptosis susceptibility protein).

The aim of the study was to evaluate the immunoexpression of CAS and Ki-67 proteins in metastatic and non-metastatic serous ovarian tumours, as well as to find possible relationships between this immunoexpression and tumour proliferation activity.

Material and methods: The analysis comprised 43 women diagnosed and treated for malignant epithelial ovarian tumours. The immunoexpression of CAS protein was assessed semiquantitatively, whereas immunoexpression of Ki-67 was performed using a computer image analysis system.

Results: The immunoexpression of both CAS and Ki-67 proteins was significantly increased in the metastatic group as compared with patients without metastases. Also, a positive correlation was found between immunoexpression of Ki-67 and CAS protein, but this correlation was not significant.

Conclusions: In conclusion, our data suggest that increased immunoexpression of CAS and Ki-67 proteins in serous ovarian tumours may be helpful in identifying cases of higher metastatic potential.

Key words: apoptosis, proliferation, serous ovarian tumours, CAS, Ki-67

Adres do korespondencji:

Paweł Stawerski, Zakład Nefropatologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź, e-mail: pawel.stawerski@umed.lodz.pl

Wstęp

Rak jajnika jest szóstym co do częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Śmiertelność z jego powodu jest wysoka – zajmuje czwarte miejsce wśród wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych u kobiet i pierwsze miejsce wśród nowotworów narządów płciowych u kobiet w Polsce [1]. Odsetek pięcioletnich przeżyć mieści się w granicach 80–90% przy wczesnym wykryciu i niskim stopniu zaawansowania klinicznego do 25% przy późnej diagnostyce i wysokim stopniu zaawansowania klinicznego [2]. Do klasycznych czynników rokowniczych w raku jajnika zalicza się m.in. stopień rozwoju tego nowotworu wg klasyfikacji FIGO, stopień dojrzałości histologicznej, wielkość guza pierwotnego, a także wiek pacjentki oraz obecność przed operacją takich objawów klinicznych, jak na przykład wodobrzusze [3]. Prowadzone w ostatnich latach badania zwracają uwagę na znaczenie prognostyczne ekspresji białek związanych z adhezją i proliferacją komórek nowotworu. W niezbyt licznych jeszcze piśmiennictwie poświęconym temu zagadnieniu podkreśla się znaczenie białek proliferacyjnych – Ki-67 (MIB-1) oraz białka związanego z apoptozą – CAS (*cellular apoptosis susceptibility protein*). Białko Ki-67 jest antygenem jądrowym, którego ekspresja jest ściśle związana z cyklem komórkowym. Dzięki temu może on być traktowany jako istotny marker proliferacji w danej populacji komórek [4]. Białko CAS jest homologiem białka genu segregacji chromosomów CSE1. Działanie białka CAS jest co najmniej dwukierunkowe – bierze ono udział zarówno w procesach apoptozy, jak i proliferacji komórek [5, 6], jednak mechanizmy działania cząstki CAS nie są jeszcze do końca wyjaśnione.

Cel pracy

Celem pracy było określenie, czy immunoekspresja białka CAS oraz białka Ki-67 wiąże się z potencjałem przerzutowym surowicznych nowotworów jajnika oraz zbadać, czy immunoekspresja białka Ki-67 koreluje z nasileniem immunoekspresji białka CAS w tych przypadkach.

Materiał i metody

Pacjentki

Badaniami objęto materiał pooperacyjny pobrany od 43 chorych diagnozowanych i leczonych z powodu złośliwych nowotworów surowicznych jajnika w latach 1997–2002 w Instytucie Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Badany materiał podzielono na grupy w zależności od występowania przerzutów nowotworu. Do grupy pierwszej zaliczono pacjentki, u których stwierdzono obecność przerzutów nowotworowych (29 pacjentek – 67,44%, w tym 3 raki w stopniu G1, 9 w G2 i 17 w G3).

Do grupy drugiej włączono chore, u których przerzutów nie stwierdzono (14 przypadków – 32,56%, w tym 5 raków w stopniu G1, 5 w G2 i 4 guzy w stopniu G3).

Ocena w mikroskopie świetlnym

Materiał do badań stanowiły skrawki tkankowe z materiałów pooperacyjnych, z których wykonano techniką parafinową preparaty mikroskopowe zabarwione hematoksyliną i eozyną. W celu oceny stopnia zaawansowania histologicznego nowotworu zastosowano obowiązujące wg Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) kryteria morfologiczne [7].

Badania immunohistochemiczne

Zastosowano mysie monoklonałne przeciwciała firmy Novocastra klasy IgG przeciwko antygenowi CAS (rozcieńczenie 1 : 80) i antygenowi MIB-1 (rozcieńczenie 1 : 100), przestrzegając procedur zaleconych przez producenta.

Immunoekspresję białka CAS oceniano metodą półilościową. W każdym preparacie oceniano pod mikroskopem komórki nowotworowe w 10 sąsiadujących polach widzenia, w powiększeniu 400×, stosując następującą skalę: 0 – brak odczynu w komórkach nowotworu; 1 – słaby odczyn w nielicznych (< 25%) komórkach nowotworu; 2 – odczyn w komórkach nowotworu o średnim nasileniu, obejmujący 26–74% komórek guza; 3 – silny odczyn w większości (> 75%) komórek nowotworu.

Badania morfometryczne

Immunoekspresję białka Ki-67 oceniano metodą ilościową przy użyciu komputerowego systemu do analizy obrazu pracującego pod kontrolą oprogramowania MultiScan – wersja 8.08, wyprodukowanego przez firmę Computer Scanning Systems (Warszawa). Określano odsetek komórek immunododatnich w 1000 komórek raka w każdym preparacie (funkcja automatyczna).

Analiza statystyczna

Wyniki badań przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Do oceny różnic pomiędzy grupami stosowano test *one-way* ANOVA i test *post-hoc*: RIR Turkeya (rozkład był normalny i wariancje równe). Do oceny zależności pomiędzy badanymi parametrami stosowano metodę Pearsona. Za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki badań półilościowych immunoekspresji białka CAS i badań ilościowych immunoekspresji białka

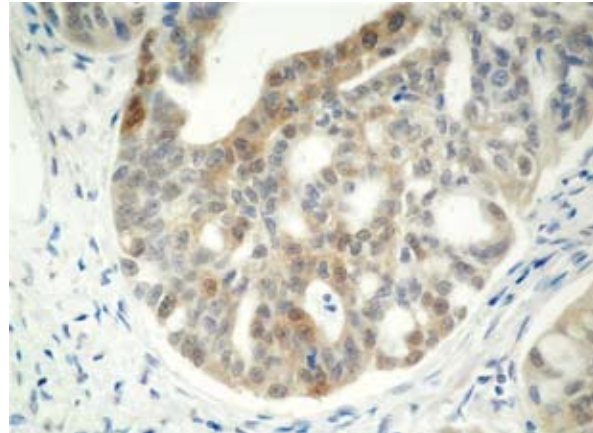
Ki-67 przedstawiono w tabeli I. Wykazano znamienne wyższą immunoekspresję białka CAS w grupie guzów z przerzutami w porównaniu z grupą bez przerzutów ($p < 0,02$, ryc. 1. i 2.). Raki surowicze jajnika z przerzutami charakteryzowały się również istotnym statystycznie wzrostem immunoekspresji białka Ki-67 w porównaniu z grupą raków, w której przerzutów nowotworowych nie stwierdzono ($p < 0,006$, ryc. 3.–4.).

Przeprowadzone badania korelacyjne (ryc. 5.) wykazały ponadto dodatnią korelację między immunoek-

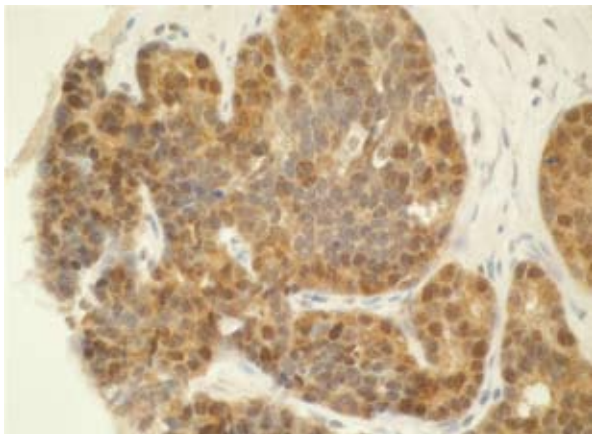
spresją białka CAS i białka Ki-67, jednak nie była ona znamienne statystycznie ($r = 0,2$, $p > 0,05$).

Tab. I. Immunoeekspresja białek CAS i Ki-67 w grupach z przerzutami i bez przerzutów raka surowiczego jajnika (średnia \pm odchylenie standardowe – SD)

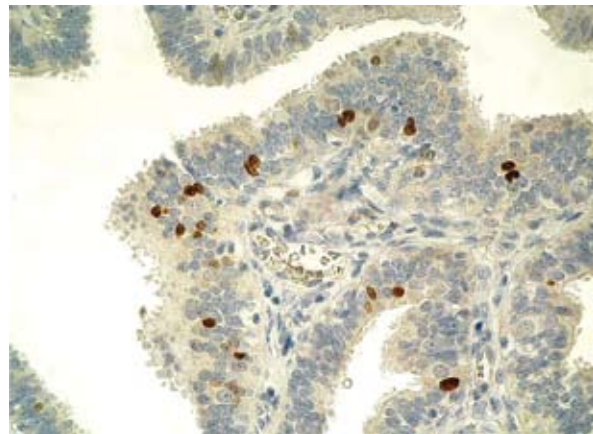
Grupa	CAS	Ki-67
przypadki z przerzutami	2,00 \pm 0,73	33,65 \pm 12,89
przypadki bez przerzutów	1,4 \pm 0,86	22,23 \pm 15,37
<i>p</i>	< 0,02	< 0,006



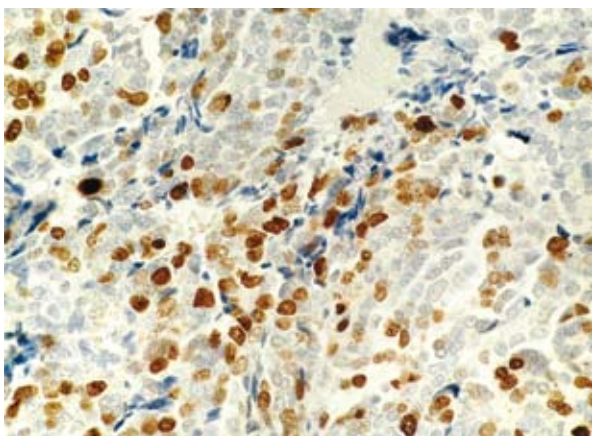
Ryc. 1. Immunoeekspresja białka CAS w grupie nowotworów bez przerzutów (pow. 400 \times)



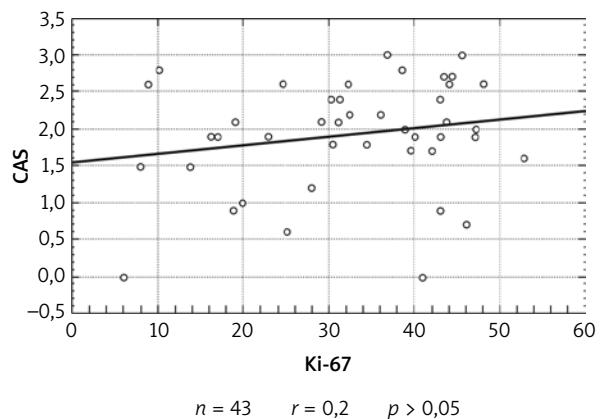
Ryc. 2. Immunoeekspresja białka CAS w grupie nowotworów z przerzutami (pow. 400 \times)



Ryc. 3. Immunoeekspresja białka Ki-67 w grupie nowotworów bez przerzutów (pow. 400 \times)



Ryc. 4. Immunoeekspresja białka Ki-67 w grupie nowotworów z przerzutami (pow. 400 \times)



Ryc. 5. Korelacja immunoeekspresji białka CAS oraz Ki-67 w surowicznych nowotworach jajnika

Dyskusja

Ważną rolę w rozwoju i progresji nowotworów (w tym również nowotworów surowicznych jajnika) odgrywają procesy proliferacji i apoptozy [8, 9]. Do klasycznych markerów apoptozy zalicza się głównie białka z rodziny bcl2. CAS jest słabo dotychczas poznanym białkiem biorącym udział zarówno w procesach proliferacji komórek, jak i w procesach apoptozy. Białko to jest homologiem białka produktu genu odpowiedzialnego za segregację chromosomów podczas fazy G1 cyklu komórkowego. Dlatego też białko CAS jest wykrywane w komórkach proliferujących, natomiast w komórkach nieproliferujących nasilenie ekspresji białka CAS jest niskie. Z drugiej strony białko CAS jest związane z procesem apoptozy wyzwalanej przez czynnik martwicy nowotworów (*tumour necrosis factor α* – TNF- α). Mechanizm tego działania jest wciąż niejasny. Przypuszcza się, że rolą białka CAS jest udział w transporcie z i do jądra białek związanymi z procesem apoptozy. W związku z tym dualizmem funkcji białko CAS prawdopodobnie służy jako swoisty przetątnik regulujący kierunek, w którym zmierza historia komórki – zaprogramowana śmierć lub proliferacja. Mimo że badania nad rolą białka CAS w patogenezie nowotworów prowadziło dotąd niewielu autorów, w dostępnym piśmiennictwie zwraca się uwagę na wysoką korelację między wykrywalnością białka CAS a niskim stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworów złośliwych piersi, wątroby oraz surowiczego raka jajnika [10, 11]. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy uzupełniają te obserwacje o spostrzeżenie, że immunoekspresja białka CAS jest statystycznie znamienne większa w grupie raków surowicznych jajnika z przerzutami w zestawieniu z grupą bez przerzutów nowotworu. Opisywane zjawiska mają prawdopodobnie związek z zaburzeniami regulacji podziałów komórkowych przez białko CAS, a także z deregulacją procesów apoptozy. Być może zaburzenia te są związane z mutacjami w obrębie genu *CSE1* kodującego białko CAS, które opisywali Wantabe i wsp. [12] oraz Tanner i wsp. [13]. Peiro i wsp. [14] wskazywali nawet na mutacje w obrębie chromosomu 20q13.2 wraz z mutacjami genu kodującego cyklinę 1 jako na jedną z głównych ścieżek wiodących do powstania raka surowiczego jajnika. Interpretacja wyników uzyskanych przez autorów tej pracy wymaga dużej ostrożności, ponieważ wiąże się z nierozstrzygniętą kwestią: czy białko CAS rzeczywiście bierze udział w procesach związanych z powstawaniem przerzutów raka jajnika, czy też wzrost jego immunoekspresji w grupie z przerzutami związany jest z większym potencjałem przerzutowym guzów o wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Mimo przedstawionych powyżej zastrzeżeń i wątpliwości wyniki naszych badań pozwalają sądzić, że immunoekspresja białka CAS może być przydatna jako marker agresywności w raku surowiczym jajnika.

Nasilenie proliferacji w nowotworach surowicznych jajnika autorzy niniejszej pracy badali, określając im-

munoekspresję białka Ki-67 w poszczególnych grupach. Białko Ki-67 jest szeroko stosowane jako marker proliferujących komórek nowotworowych. Wraz z liczbą proliferujących komórek rośnie również indeks proliferacyjny mierzony jako odsetek komórek nowotworu wykazujących dodatnią immunoekspresję białka Ki-67. Zależność taką wykazało wielu autorów w licznych tkankach [15, 16]. Liczni autorzy wiążą również indeks proliferacyjny z rokowaniem w chorobach nowotworowych, w tym w nowotworach surowicznych jajnika [16, 17]. Wykazanie przez autorów niniejszej pracy, że indeks Ki-67 jest statystycznie znamienne wyższy w grupie raków surowicznych jajnika z przerzutami w zestawieniu z grupą bez przerzutów nowotworu, jest zgodne z większością danych opublikowanych w dostępnym na ten temat piśmiennictwie [15–17].

W badaniach Brustmanna [18] wykazano istnienie dodatniej zależności pomiędzy ekspresją cząstki CAS a stopniem proliferacji komórek surowiczego raka jajnika wyrażonym indeksem mitotycznym. Wyniki prezentowanych badań wydają się potwierdzać te obserwacje, autorzy stwierdzili bowiem tendencję do dodatniej korelacji pomiędzy nasileniem proliferacji nowotworu wyrażonym immunoekspresją białka Ki-67 a immunoekspresją białka CAS w nowotworach surowicznych jajnika. Korelacja ta jednak nie okazała się znamienna statystycznie. Być może przeprowadzenie badań z udziałem większej grupy chorych pozwoliłoby w pełni potwierdzić badania Brustmanna.

Podsumowując, należy podkreślić, że zwiększenie immunoekspresji odpowiedzialnego za apoptozę i proliferację białka CAS i wzrost aktywności antygenu proliferacyjnego Ki-67 może sugerować zwiększony potencjał przerzutowy raków surowicznych jajnika. Stopień złośliwości histologicznej nowotworu wraz z jego aktywnością proliferacyjną i potencjałem przerzutowym są jednymi z najważniejszych czynników wpływających na rokowanie w nowotworach surowicznych jajnika. Tak więc wydaje się, że uzyskane przez autorów niniejszej pracy wyniki mogą być pomocne w wyodrębnieniu grupy pacjentek o zwiększonym ryzyku progresji i rozsiewu nowotworów surowicznych jajnika.

Wnioski

1. Ocena immunoekspresji białka CAS i białka Ki-67 w surowicznych nowotworach jajnika może być pomocna w identyfikacji guzów o wyższej agresywności i wyższym potencjale przerzutowym.
2. Wzrost immunoekspresji białka CAS koreluje ze wzrostem aktywności proliferacyjnej nowotworu, mierzonej immunoekspresją białka Ki-67, jednak zależność ta nie jest znamienna statystycznie.

Piśmiennictwo

1. Chałubińska J, Fendler W. Epidemiologia i czynniki ryzyka zachorowania na raka jajnika. www.lekarzonkolog.pl, 2007.

2. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60: 159-79.
3. Agarwal R, Kaye SB. Prognostic factors in ovarian cancer how close are we to a complete picture. *Ann Oncol* 2005; 1: 4-6.
4. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-22.
5. Website: EntrezGene, GeneID. 1434; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. Brinkmann U. CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 509-13.
7. Tavassoéli FA, Devilee P. Tumours of the ovary and peritoneum. In: Tavassoéli FA, Devilee P (eds.). *Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press, Lyon 2003, 114-5.
8. McMenamin ME, O'Neill AJ, Gaffney EF. Extent of apoptosis in ovarian serous carcinoma: relation to mitotic and proliferative indices, p53 expression, and survival. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1997; 50: 242-6.
9. Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 39-44.
10. Shiraki K, Fujikawa K, Sugimoto K, et al. Cellular apoptosis susceptibility protein and proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2006; 18: 77-81.
11. Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, et al. Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. *Anticancer Res* 2001; 21: 2413-7.
12. Watanabe T, Imoto I, Katahira T, et al. Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1114-22.
13. Tanner MM, Grenman S, Koul A, et al. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1831-9.
14. Peiró G, Diebold J, Löhns U. CAS (Cellular apoptosis susceptibility) gene expression in ovarian carcinoma: Correlation with 20q13.2 copy number and cyclin D1, p53, and Rb protein expression. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 922-9.
15. Lopes CV, Mnif H, Pesenti C, et al. p53 and Ki-67 in Barrett's carcinoma: is there any value to predict recurrence after circumferential endoscopic mucosal resection? *Arq Gastroenterol* 2007; 44: 304-8.
16. Mita S, Nakai A, Maeda S, et al. Prognostic significance of Ki-67 antigen immunostaining (MIB-1 monoclonal antibody) in ovarian cancer. *J Nippon Med Sch* 2004; 6: 384-91.
17. Sengupta PS, McGown AT, Bajaj V, et al. p53 and related proteins in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2000; 18: 2317-28.
18. Brustmann H. Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 268-76.