

Neoangiogeneza w guzach nowotworowych jajnika

Angiogenesis of ovarian neoplasms

Katarzyna Wójcik-Krowiranda¹, Leszek Gottwald¹, Robert Kubiak², Andrzej Bieńkiewicz¹

Celem pracy była ocena znaczenia ilościowej neoangiogenezy w diagnostyce i różnicowaniu guzów nowotworowych jajnika. Badaniem objęto 42 chore na raka jajnika oraz 10 kobiet z nowotworami granicznymi przydatków. Stwierdzono, że nasilenie neoangiogenezy w nowotworach złośliwych jest istotnie wyższe niż w zmianach granicznych i nie zależy ono od stopnia zaawansowania klinicznego ani stopnia zróżnicowania komórek guza. Nie stwierdzono zależności między nasileniem neoangiogenezy a typem histopatologicznym raka jajnika.

Słowa kluczowe: neoangiogeneza, rak jajnika

(Przegląd Menopauzalny 2003; 3:28–31)

Wstęp

Nowotwory złośliwe jajnika stanowią nadal jedną z głównych przyczyn umieralności kobiet. Pomimo znacznego postępu w medycynie, patomechanizm rozrostu nowotworowego guzów jajnika nie jest dobrze poznany. W progresji guzów oraz w powstawaniu odległych przerzutów istotną rolę zdaje się odgrywać neoangiogeneza [1].

Wraz ze wzrostem każdej tkanki wzrasta liczba naczyń krwionośnych dostarczających do niej składniki odżywcze i odprowadzających zbędne produkty przemiany materii. W warunkach fizjologicznych liczba i wielkość naczyń włosowatych przenikających wszystkie tkanki nie zwiększa się, ponieważ komórki wyścielające je śródbłonna nie ulegają podziałom. W pewnych sytuacjach, np. w jajniku po owulacji, w błonie śluzowej macicy po menstruacji lub po uszkodzeniu tkanki, naczynia zaczynają rozrastać się. Proces ten nazywany jest angiogenezą.

Neoangiogeneza zachodzi tylko w warunkach patologicznych i jest inicjowana przez komórki nowotworowe,

które pojawiwszy się w zdrowej tkance, nie są początkowo zdolne do pobudzenia neoangiogenezy. Kiedy kilka milionów komórek utworzy guz, a komórki położone centralnie coraz bardziej oddalają się od komórki macierzystej i dochodzącej do niej włosniczki, wówczas guz przestaje rosnąć i osiąga stan równowagi, w którym liczba umierających komórek odpowiada liczbie komórek proliferujących. Jest to wczesne stadium rozwoju raka. Komórki nowotworowe w hodowli mogą namnażać się przy braku unaczynienia tylko do guza o średnicy 1–2 mm. Dopiero kiedy nowe naczynia dostarczą składników odżywczych – masa guza powiększa się. Neoangiogeneza jest więc przełomowym etapem w rozwoju guza. Znalazienie przyczyn wyzwalających proces neoangiogenezy i sposobów jej przerywania może mieć istotne znaczenie w procesie hamowania rozrostu nowotworowego.

Aktywność procesu neoangiogenezy zależy od równowagi pomiędzy jej regulatorami – aktywatorami i inhibitorami. Jedną z metod pomiaru aktywności neoangiogennej jest pomiar wewnątrzguzowej gęstości mikronaczyń – IMD [2].

¹ I Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej Instytutu Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi, kierownik Kliniki i dyrektor Instytutu: prof. dr hab. med. J. Suzin

² Zakład Patologii Nowotworów Katedry Onkologii UM w Łodzi, kierownik Katedry: prof. dr hab. med. R. Kordek



Wiele niezależnych, retrospektywnych badań wykazuje, że stopień nasilenia neoangiogenezy w początkowych stadiach litych, złośliwych guzów (np. rak piersi) jest znaczącym czynnikiem rokowniczym [3, 4].

Cel pracy

Celem pracy jest ocena znaczenia ilościowej neoangiogenezy w diagnostyce i różnicowaniu guzów nowotworowych jajnika.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowiły 42 pacjentki w wieku 29–84 lat ($\bar{x}\pm 56,5$) operowane w I Klinice Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej Instytutu Ginekologii i Położnictwa (IGiP) Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z powodu rozpoznanego raka jajnika. Grupę kontrolną, do której odnoszono uzyskane wyniki oznaczeń stanowiło 10 pacjentek w wieku 34–89 lat ($\bar{x}\pm 61,5$ roku) operowanych z powodu guzów granicznych przydatków.

Analiza histopatologiczna przeprowadzana była w Pracowni Histopatologicznej IGiP w Łodzi w sposób rutynowy: fragmenty tkankowe po uprzednim utrwaleniu w 10% formalinie były zatapiane w parafinie, a następnie z blozków parafinowych wykonywane były skrawki, które barwiono hematoksyliną i eozyną. Rozpoznanie histopatologiczne było dokonywane wg kryteriów WHO. Oceniano również stopień zaawansowania klinicznego choroby wg FIGO oraz stopień zróżnicowania komórkowego (grading).

Ilościowa neoangiogeneza w preparatach wykonanych z pobranych podczas operacji fragmentów guza przeprowadzana była w Zakładzie Patologii Nowotworów Katedry Onkologii UM w Łodzi. Do badania tego wykorzystywano bloczki parafinowe, z których wykonywano preparaty histopatologiczne barwione metodą immunohistochemiczną z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych CD-31 (wg katalogu Dako) firmy Dako. Skrawki parafinowe po uprzednim trawieniu trypsyną barwione były metodą strepawidynowo-biotynową.

Ocenę liczby naczyń rozpoczynano od miejsc o największej liczbie naczyń (tzw. *hot spots*), co identyfikowano poprzez przeglądanie preparatu pod małym powiększeniem. Właściwą ocenę przeprowadzano z użyciem powiększenia 400 razy w kolejnych polach widzenia. Zliczanie naczyń prowadzono niezależnie przez dwóch patologów, a w przypadkach niezgodności wyników większej niż 15%, preparat oceniano ponownie. Podczas zliczania nowotworzących się naczyń brano pod uwagę każdą zabarwioną komórkę lub też grupę komórek, z widocznym światłem lub bez niego. Za liczbę naczyń brano ich średnią liczbę przypadającą na jedno pole widzenia pod powiększeniem 400 razy w mikroskopie świetlnym.

Dla celów wnioskowania statystycznego przyjęto poziom istotności 0,05. Wartości średnie badanych parametrów porównano przy użyciu uogólnionego modelu liniowego McCulacha i Nedlera, w którym jako rozkład zmiennej zależnej przyjęto rozkład γ oraz rozkład z logarytmiczną funkcją łączącą. Zmienne dyskretne wprowadzone zostały w postaci k-1 (k – liczba kategorii) zmiennych 0–1 z wybraną jedną kategorią odniesienia. W przypadku zależności pomiędzy dwoma zmiennymi ciągłymi, badano istotność trendu liniowego. Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu pakietu statystycznego STATA 6.

Wyniki

Ocenę nowotworzenia naczyń krwionośnych (IMD) w tkankach guza przedstawiono w tab. I. Wewnątrzguzowa gęstość mikronaczyń osiągnęła wyższą wartość w nowotworach złośliwych (średnio 23,9 w polu widzenia) w porównaniu do grupy nowotworów granicznych ($p<0,001$).

Zbadano zależność IMD od wieku chorych na raka jajnika. Średnia IMD u chorych na raka jajnika w wieku 29–45 lat wynosiła $25,8\pm 14,9$, u kobiet w wieku 46–55 lat: $23,5\pm 12,7$, a u pacjentek w wieku 56–84 lat: $22,6\pm 10,0$ (ns).

Oceniono zależność pomiędzy wielkością guza nowotworowego u chorych na raka jajnika, a średnią IMD. IMD w guzach o średnicy mniejszej od 10 cm wynosiła $18,8\pm 7,5$, w guzach większych od 10 cm: $27,4\pm 14,6$, natomiast w przypadkach stwierdzonej rozsianej choroby nowotworowej: $22,8\pm 11,1$ (ns). Średnia IMD obliczona łącznie dla stopni I i II zaawansowania klinicznego raka jajnika (wczesna postać nowotworu) wynosiła $20,6\pm 12,3$, a odpowiednia wartość obliczona dla stopni III i IV (zaawansowana choroba nowotworowa) wynosiła $25,1\pm 12,0$ (ns).

Poddano analizie wpływ zróżnicowania komórkowego raka jajnika na średnią IMD. W rakach dobrze zróżnicowanych (G1) IMD wynosiła $22,2\pm 17,0$, w nowotworach średnio zróżnicowanych (G2): $31,5\pm 14,1$, natomiast w słabo zróżnicowanych rakach jajnika (G3): $21,2\pm 9,8$ (ns).

Oceniono zależność pomiędzy typem histologicznym raka jajnika, a średnią IMD. IMD w surowicznych rakach jajnika wynosiła $24,9\pm 9,9$, w rakach śluzowych: $21,1\pm 13,5$, w rakach endometrialnych: $29,1\pm 15,7$, w rakach litych: $16,4\pm 3,5$, a w innych postaciach raka jajnika: $20,4\pm 9,3$ (ns).

Dyskusja

Jednym z krytycznych czynników w rozwoju guzów litych jest ich zaopatrzenie w składniki odżywcze, wymiana gazowa i odprowadzanie metabolitów, odbywające się za pośrednictwem naczyń krwionośnych. Możli-



Tab. I. Wewnątrzguzowa gęstość mikronaczyń (IMD) w guzach granicznych i w rakach jajnika

Grupa	IMD	SD	p
guzy graniczne	12,3	2,6	<0,001
guzy złośliwe	23,9	12,0	

wości rozwoju guza są limitowane przez unaczynienie tkanki, a dalsze etapy jego rozwoju zależą od wytworzenia sieci nowych naczyń krwionośnych. Powszechnie uważa się, że bez procesu neowaskularyzacji guzy lite nie są w stanie przekroczyć objętości 2–3 mm³ [5]. Już na bardzo wczesnym etapie wzrostu guza zachodzą zmiany w lokalnym układzie naczyniowym pod wpływem nowotworu i są one bezwzględnie konieczne dla dalszego jego rozwoju. Również bardzo wcześnie dochodzi do lokalnego wydzielania czynników antyangiogennych, mających wpływ na proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych *in vivo*, dlatego wytworzyły one szereg mechanizmów, które w sposób bezpośredni lub pośredni stymulują neoangiogenezę w swoim sąsiedztwie. Wydzielają one cytokiny, które parakrynnie stymulują komórki śródbłonna do proliferacji i przestrzennej organizacji w nowe naczynia. Komórki nowotworowe zdolne są do indukcji stanu zapalnego, a pod wpływem jego mediatorów substancje proangiogenne produkowane są przez makrofagi, neutrofile, limfocyty, fibroblasty oraz komórki śródbłonna [5].

Badania neoangiogenezy prowadzone są od lat 60. XX wieku, ale dopiero w latach 80. nastąpił gwałtowny wzrost zainteresowania tym procesem, niezależnie w kilku ośrodkach badawczych. Było to spowodowane odkryciem i zsekwencjonowaniem kilku czynników wzrostowych oraz inhibitorów neoangiogenezy. W latach 90. XX wieku zsyntetyzowano farmakologiczne inhibitory neoangiogenezy zdolne do tłumienia całej kaskady neowaskularyzacji w warunkach *in vitro*.

Od czasu kiedy Folkman [5] odkrył, że wzrost litych guzów jest zależny od angiogenezy, trwają intensywne badania nad tym procesem, jego mechanizmami i regulatorami. Obecnie znanych jest już wiele czynników angiogenicznych i antyangiogennych.

Proces neoangiogenezy jest niezwykle złożony i zależy od wielu komponentów komórkowych, pozako-

mórkowych i humoralnych. Wśród komórek wpływających na neoangiogenezę należy wymienić również komórki mięśniówki gładkiej otaczającej naczynia i makrofagi, które są głównym źródłem zarówno cytokin prozapalnych, w tym TNF, jak też niektórych czynników wzrostowych dla komórek śródbłonna [6].

Hata i wsp. [7] oceniali neoangiogenezę w tkankach guzów nowotworowych jajników dwiema metodami: metodą immunohistochemiczną – IMD oraz ultrasonograficzną z zastosowaniem techniki kolorowego Dopplera. W prezentowanych badaniach, opartych o metody immunohistochemiczne stwierdzono największe nasilenie wewnątrzguzowej gęstości mikronaczyń (IMD) w zmianach o charakterze złośliwym. W dużych guzach proces neoangiogenezy, jak wynika z piśmiennictwa [8] może ulegać samoograniczeniu. W skrajnych przypadkach prowadzi to do obumierania znacznych jego obszarów. Kubiak i in. [9] stwierdzili, iż nasilenie neoangiogenezy różni się w poszczególnych obszarach guza. W badanych przez niego guzach sutka największe nasilenie neoangiogenezy stwierdza się na granicy guza i tkanki niezmięnionej.

Stępień i in. [10] badali neoangiogenezę w hormonozależnych guzach gruczołów dokrewnych metodą immunohistochemiczną. Stwierdzili, iż ilość mikronaczyń zależy wprost proporcjonalnie od wielkości zmiany pierwotnej. W naszych badaniach korelacji takiej nie zaobserwowano. Być może w guzach jajnika hormonalnie czynnych, które nie były przedmiotem badań, podobna zależność miałyby miejsce.

Przedstawione powyżej wyniki badań wydają się potwierdzać opinie cytowanych wyżej autorów i w niedalekiej przyszłości mogą przyczynić się do udoskonalenia diagnostyki i terapii nowotworów.

Wnioski

1. Nasilenie neoangiogenezy w nowotworach złośliwych jest istotnie wyższe, niż w zmianach granicznych.
2. Nasilenie neoangiogenezy w guzach złośliwych jajnika nie zależy od stopnia zaawansowania klinicznego, ani stopnia zróżnicowania komórek guza.
3. Nie stwierdzono zależności między nasileniem neoangiogenezy, a typem histopatologicznym raka jajnika.

Summary

Objective: The aim of this study was to evaluate the importance of angiogenesis intensity in the diagnostics and differentiation of ovarian neoplastic tumors.

Material and methods: The study group consisted of 42 women with ovarian cancer, and 10 patients with ovarian tumors of borderline malignancy as a control group. The paraffin tumor sections were immunohistochemically stained with Dako monoclonal antibodies, and then angiogenesis was assessed in the light microscope at 400x oil immersion magnification.



Results: The IMD in ovarian cancers in one high-power microscopic field was 23.9 ± 12.0 and in borderline tumors it was 12.3 ± 2.6 ($p < 0.001$). The IMD in patients with ovarian cancer aged 29–45 was 25.8 ± 14.9 , in women aged 46–55 years it was 23.5 ± 12.7 and in women aged 56–84 it was 22.6 ± 10.0 . The IMD in FIGO stages I and II was 20.6 ± 12.3 and in stages III and IV it was 25.1 ± 12.0 . When tumor size was under 10 cm, the IMD was 18.8 ± 7.5 , in the case of tumor size exceeding 10 cm it was 27.4 ± 14.6 . In cases of the disseminated neoplastic disease, the IMD was 22.8 ± 11.1 . The IMD was 22.2 ± 17.0 in G1 cancers, 31.5 ± 14.1 in G2 tumors, and 21.2 ± 9.8 in G3 neoplasms. In serous cancers the IMD was 24.9 (9.9, in mucinous it was 21.1 ± 13.5 , in endometrioid ones it was 29.1 ± 15.7 , in solid ones it was 16.4 ± 3.5 , and in another cancers it was 20.4 ± 9.3 . All these differences were statistically insignificant. **Conclusions:** The level of angiogenesis in malignant neoplasms is significantly higher when compared to borderline tumors, and does not depend on clinical staging and histological grading. We did not find any correlation between the intensity of angiogenesis and the histological type of ovarian cancers.

Key words: angiogenesis, ovarian cancer

Piśmiennictwo

- Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, et al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 1995; 55: 1687-93.
- Gasparini G. Angiogenesis research up to 1996. A commentary on the state of art and suggestions for future studies. *Eur J Cancer* 1997; 14: 2379-84.
- Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* 1996; 14: 2534-9.
- Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, et al. Clinical significance of determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2513-9.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis depend? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 4-11.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, et al. The role of TNF in angiogenesis. *Clin Invest* 1998; 101: 40-7.
- Hata K, Nagami H, Iida K, et al. Expression of thymidine phosphorylase in malignant ovarian tumors: correlation with microvessel density and an ultrasound-derived index of angiogenesis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12: 201-6.
- Folkman J. *Tumor angiogenesis. In: The Molecular Basis of Cancer.* Eds. J Mendelsohn, PM Howley, MA Israel & LA Liotta. Philadelphia: Saunders, 1995: 206-32.
- Kubiak R, Miszczak-Zaborska E, Jesinek-Kupnicka D, et al. Correlation between the activity of thymidine phosphorylase and some clinical features and the level of angiogenesis in breast carcinoma. *Z Naturforsch* 1999; 54c: 1096-101.
- Stępień HM, Kołomecki K, Pasięka Z, et al. Angiogenesis of endocrine gland tumors – new molecular targets in diagnostics and therapy. *Eur J Endocr* 2002; 146: 143-51.

Adres do korespondencji

I Klinika Ginekologii
i Onkologii Ginekologicznej
Instytutu Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Wileńska 37
94-029 Łódź

