

Angiogeneza w guzach złośliwych jajnika u kobiet po menopauzie: przydatność immunohistochemicznej oceny pericytów i gęstości mikronaczyń

Angiogenesis in malignant ovarian tumors after menopause: usefulness of pericytes immunohistochemic evaluation and microvessels density

Sylwia Czekierdowska¹, Artur Czekierdowski²

¹Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie; kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński

²Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie; kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

Przeгляд Menopauzalny 2006; 1: 17–24

Streszczenie

Cel pracy: Porównanie angiogenezy nowotworowej ocenianej jako gęstość mikrokapilar (MVD) i towarzyszących tym naczyń pericytów w guzach złośliwych jajnika u kobiet.

Materiał i metody: Grupa badana obejmowała 77 chorych, wśród których 45 było po menopauzie. Porównano zależności pomiędzy immunohistochemiczną ekspresją aktyny mięśni gładkich (alfa-SMA) oraz desminy, jako markerów pericytów oraz antygenu CD34 jako markera mikronaczyń a typem i stopniem zróżnicowania histologicznego, stadium zaawansowania nowotworów wg FIGO oraz statusem menopauzalnym badanych kobiet.

Wyniki: W guzach kobiet przed menopauzą ekspresja CD34 była niższa w porównaniu do pacjentek po menopauzie ($p < 0,005$). Ocena gęstości pericytów przy pomocy oceny ekspresji desminy wykazała, że w badanej grupie mediana dla tego parametru wynosiła 4,8 (zakres 0,0–25,8), przy czym w 12 przypadkach stwierdzono brak reakcji barwnych z przeciwciałem anti-desmina (w tym 3 chore po menopauzie). Gęstość pericytów oceniana przy użyciu markera alfa-SMA wynosiła 10,5 (zakres 2,7–47,0). Wartości mediany gęstości pericytów badanych przy pomocy każdego z markerów nie różniły się istotnie pomiędzy grupami nowotworów w zależności od ich stopnia zróżnicowania histologicznego. Status menopauzalny badanych pacjentek również nie wpływał istotnie na wyniki oceny gęstości pericytów wokół sieci naczyń nowotworowych. Ekspresja alfa-SMA była istotnie skorelowana z ekspresją desminy ($R=0,61$, $p < 0,0001$). Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy gęstością mikronaczyń identyfikowanych przy pomocy CD34, a liczbą pericytów identyfikowanych zarówno przy pomocy alfa-SMA ($R=0,57$ $p < 0,0001$), jak i desminy ($R=0,40$ $p=0,0002$). Zaobserwowano ponadto ujemną zależność pomiędzy gęstością mikronaczyń a tzw. wskaźnikiem pokrywy pericytów (PCI) ocenianym przy pomocy alfa-SMA ($R=-0,35$ $p=0,001$).

Wnioski: Na podstawie przeprowadzonych badań sądzimy, że niezależnie od statusu menopauzalnego ocena gęstości pericytów w powiązaniu z analizą mikroangiogenezy może być przydatnym prognostycznym parametrem w różnicowaniu charakteru angiogenego nowotworów złośliwych jajnika u kobiet.

Słowa kluczowe: angiogeneza, guzy złośliwe jajników

Summary

Material and methods: We compared microvessel density (MVD) and pericytes expression in malignant ovarian tumors of 45 postmenopausal and 32 premenopausal women who were operated in the Ist Department of Gynecology of Medical University in Lublin between 2002 and 2004. Immunohistochemistry was performed and MVD was assessed with the use of anti CD34 antibody (Dako, Denmark), whereas pericytes were detected with anti-smooth muscle actin (alpha-SMA) and anti-desmin specific monoclonal antibodies.

Results: Additionally, the so called pericytes coverage index (PCI) was calculated for each tumor. MVD was significantly higher in malignant tumors of postmenopausal women when compared to premenopausal patients

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. prof. nadzw. AM Artur Czekierdowski, I Klinika Ginekologii Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego, ul. Staszica 16, 20-081 Lublin, tel. +48 81 532 78 47, faks+48 81 532 06 08, email: ginonkol@am.lublin.pl

($p < 0.005$). Medians of pericytes as measured with alpha-SMA or desmin were not significantly different between the groups. Desmin expression was highly correlated with alpha-SMA expression ($R = 0.61$, $p < 0.0001$). The median number of desmin-positive cells per high-power field was 4,8 (range: 0.0-25.8), however, in 12 tumors (including 3 postmenopausal women) there was no positive staining with anti-desmin antibody. Malignant tumor median pericyte density assessed with alpha-SMA was 10,5 (range: 2.7-47.0). There was a positive correlation of MVD-CD34 and pericytes median numbers for both alpha-SMA ($R = 0.57$; $p < 0.0001$) and desmin ($R = 0.40$; $p = 0.0002$). A negative correlation between MVD and PCI as measured with alpha-SMA was also found ($R = -0.35$; $p = 0.001$).

Conclusions: We conclude that regardless of the women's menopausal status the assessment of pericytes expression and microvessel density may be used in the malignant ovarian tumors angiogenic characterization.

Key words: angiogenesis, malignant ovarian tumors

Wstęp

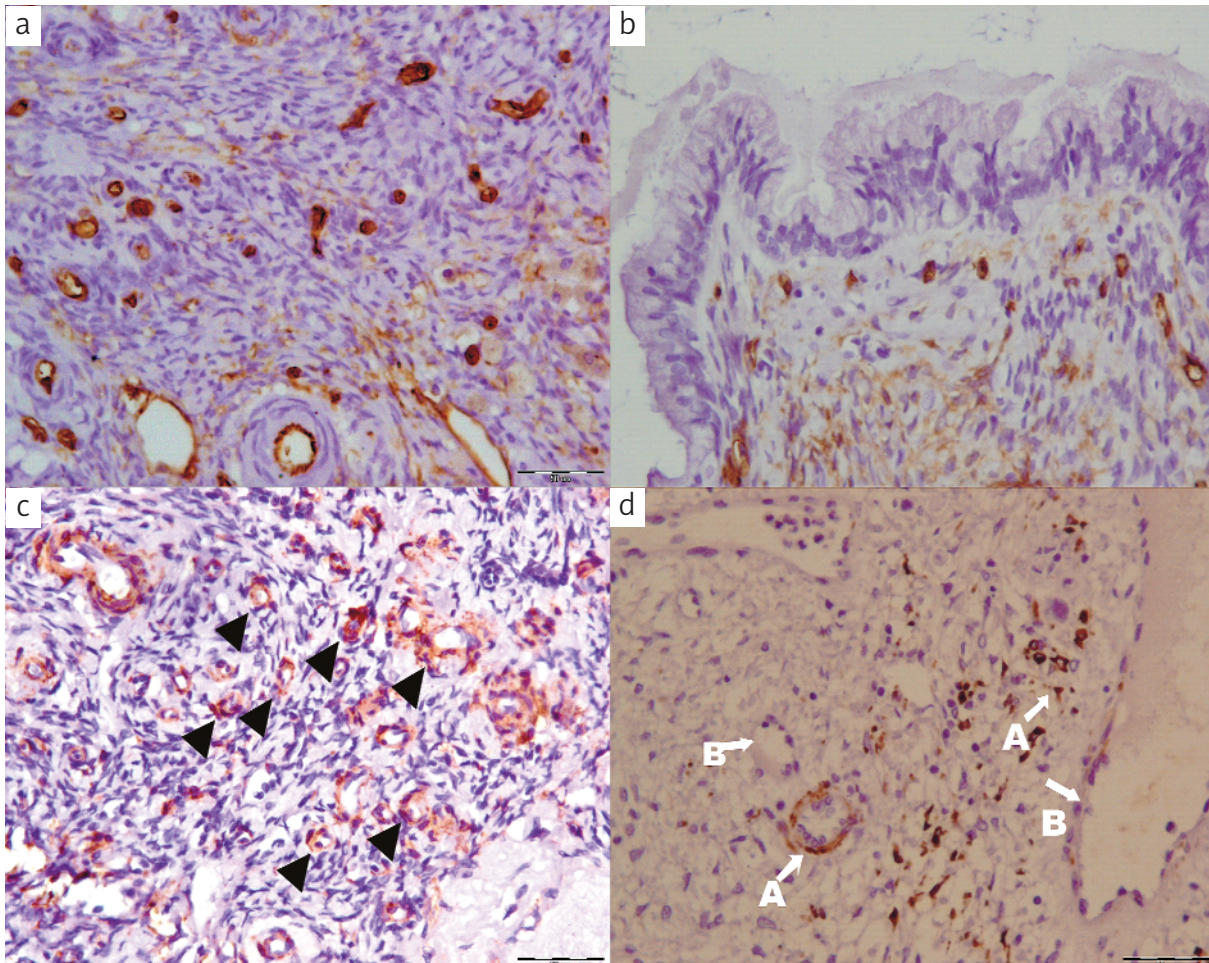
Wzrost każdego guza złośliwego wymaga dostarczenia składników odżywczych poprzez już istniejące, albo nowo powstające naczynia. Pomimo wieloletnich badań, szczególnie intensywnie prowadzonych w minionej dekadzie, molekularne mechanizmy kontrolujące angiogenezę nowotworową u kobiet po menopauzie są ciągle jeszcze stosunkowo słabo poznane. Zrozumienie tych mechanizmów może być przydatne u chorych ze złośliwymi guzami jajnika, u których znalezienie nowych metod pozwalających na wcześniejsze rozpoznawanie rozsiewu nowotworu może mieć istotny wpływ na prognozowanie wyników leczenia operacyjnego i ocenę odpowiedzi na chemioterapię [1, 2]. Szeroko przyjętą metodą oceny neoangiogenezy jest badanie gęstości mikronaczyń często określanej skrótem MVD (od *MicroVessel Density*) w najbardziej unaczynionych częściach guzów nowotworowych [3]. Identyfikacja kapilar możliwa jest dzięki obecności specyficznych dla endotelocytów antygenów, takich jak czynnik VIII, CD31 czy CD34 wykrywanych metodami immunohistochemicznymi [4, 5, 6]. Przydatność histologicznego badania mikroangiogenezy w usuniętych guzach złośliwych pozostaje jednak nadal kontrowersyjna, a stosowane obecnie metody oceny unaczynienia bardzo często nie odzwierciedlają precyzyjnie dynamicznych procesów związanych z powstawaniem sieci mikrokapilar [2]. Z tego względu w badaniach nad potencjalną rolę prognostyczną poszczególnych czynników podejmowane są próby wykorzystania innych antygenów związanych ze śródbłonkiem lub z komórkami otaczającymi naczynia guza [7, 8].

W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na pericyty towarzyszące mikronaczyniom guzów złośliwych. Ze względu na swoje długie wypustki cytoplazmatyczne oraz rozległe elementy cytoszkieletu uważane są za komórki, które stabilizują i ochraniają ściany drobnych naczyń [9]. Komórki te mogą w istotny sposób wpływać na fizjologię mikrokapilar guza, a pośrednio także na jego rozwój i powstawanie przerzutów odległych, gdyż uczestniczą w syntezie czynników angiogennych i wzrostowych wpływających na proliferację i dojrzewanie endotelocytów [9, 10]. W celu immunohistochemicznej identyfikacji pericytów wykorzystywane są różnorodne markery, takie

jak α -SMA (aktywa mięśni gładkich-alfa), tropomiozyna, desmina oraz aminopeptydazy A i N [11–13]. Ekspresja tych markerów różni się w zależności od rodzaju narządu, w którym badana jest obecność pericytów. W przypadku guzów nowotworowych najczęściej stosowane były przeciwciała skierowane przeciwko α -SMA oraz przeciwko desminie [7, 13]. Angiogeneza nie występuje fizjologicznie u kobiet po menopauzie, a w dostępnym piśmiennictwie istnieją sprzeczne doniesienia na temat przydatności oceny pericytów oraz liczby mikronaczyń jako potencjalnych czynników prognostycznych w guzach jajnika [2, 7, 14, 15]. Z wymienionych względów celem pracy było porównanie mikroangiogenezy i występowania pericytów w guzach złośliwych jajnika w zależności od statusu menopauzalnego operowanych kobiet, a także od rodzaju i zaawansowania klinicznego guza.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 45 kobiet po menopauzie i 32 kobiety przed menopauzą, które były operowane z powodu guzów złośliwych jajnika w I Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie w latach od 2001–2005. Menopauzę zdefiniowano jako wiek, w którym upłynął minimum rok od ostatniego krwawienia, albo u kobiet po histerektomii ukończony 45. rok życia. U każdej z 77 pacjentek oceniano typ i stopień zróżnicowania histologicznego guza, stadium zaawansowania klinicznego wg FIGO oraz jej status menopauzalny. Materiał do badań histologicznych i immunohistochemicznych pobrano z centralnej części zmiany z pominięciem obszarów martwiczych oraz obszarów naciekania sąsiednich narządów. Badania immunohistochemiczne wykonano w Zakładzie Patomorfologii AM w Lublinie na seryjnych skrawkach grubości 5 μ m reprezentatywnych preparatów guzów złośliwych utrwalonych w formalinie. Po odparafinowaniu i uwodnieniu materiału tkankowego w szeregu alkoholowym zastosowano procedurę odstonięcia determinanty antygenowej wykorzystując bufor cytrynianowy (0,01 M; pH 6,0) i 2 cykle mikrofalowe (każdy po 5 min, moc 750 W). Aktywność endogennej peroksydazy blokowano 3% roztworem nadtlenu wodoru przez 20 min w temperaturze poko-



Ryc. 1. Mikronaczynia (górny panel) i otaczające perycyty (dolny panel) w raku jajnika. Powiększenie 200x
 a. Ekspresja CD34 w komórkach śródbłonna w raku surowiczym jajnika
 b. Ekspresja CD34 w mikronaczyniach w guzie śluzowym
 c. Ekspresja alfa-SMA w perycytach wokół mikrokapilar guza
 d. Ekspresja desminy w perycytach (a); brak ekspresji desminy w perycytach otaczających duże naczynia oraz niektóre mikrokapilary (b)

jowej. Preparaty płukano każdorazowo 3x5 min w buforze TBS, a następnie inkubowano z odpowiednim przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko badanej antygenowi. Tabela I przedstawia zastosowane przeciwciała pierwotne, ich rozcieńczenie oraz czas i temperaturę inkubacji. Przeciwciało wtórne z kompleksem streptawidyna/biotyna było skoniugowane z peroksydazą (LSAB2/HRP kit; DAKO, Dania). Peroksydazę wykrywano przy użyciu chromogenu – roztworu czterochloru 3'-3-diaminobenzydyny (DAB, DAKO Dania). Preparaty zostały dodatkowo wybarwione hematoksyliną Mayera. Kontrolę negatywną stanowiły identycznie przygotowane seryjne preparaty guzów, ale bez zastosowania przeciwciał. W kontroli pozytywnej wykorzystano fragmenty prawidłowego endometrium.

W ocenie preparatów histologicznych wykorzystano mikroskop Olympus CX41 z kamerą cyfrową DP12 połączony z komputerem typu PC. Obraz mikroskopowy ar-

chiwizowano i analizowano przy użyciu programu DP-Soft firmy Olympus (Japonia). Wszystkie pomiary badanych markerów dokonywano przy powiększeniu, w którym pole widzenia mikroskopu odpowiadało powierzchni równej 0,74 mm². Pole powierzchni obrazu rejestrowanego przez kamerę cyfrową widoczne na monitorze cyfrowym było mniejsze i wynosiło 0,093 mm². Do oceny liczby wybarwionych komórek lub grupy komórek zastosowano program DP-soft Measurement (Olympus) i opcję *count point*. W najbardziej unaczynionych miejscach guza (tzw. *hot spots*) oceniano gęstość mikrokapilar w sposób podany przez Weidnera i wsp. [3]. W tej metodzie przy powiększeniu mikroskopu kolejno x40 i x100 wybierano regiony zmiany nowotworowej o największej w danym polu gęstości wybarwionych mikronaczyń. W miejscach tych w powiększeniu mikroskopu x200 oceniano liczbę kapilar. Każda wybarwiona na brązowo komórka lub grupa komórek śródbłonna, od-

dzielona od sąsiednich mikronaczyń, komórek guza, czy innych elementów tkanki łącznej, traktowana była jako odrębne pojedyncze mikronaczynia (ryc. 1a. i 1b.). Nie brano pod uwagę braku lub istnienia światła naczynia w badanej kapilarze. Naczynia krwionośne o średnicy powyżej 20 mm nie były kwalifikowane do oceny gęstości mikronaczyń [3].

Ekspresję desminy oraz α -SMA oceniano na kolejnych seryjnych przekrojach guza, w których wcześniej zlokalizowano przy pomocy markera CD34 obszary o największej gęstości mikronaczyń. Każda komórka z wybarwioną na brązowo cytoplazmą zlokalizowana w sąsiedztwie mikronaczynia była uznawana za pericyty (ryc. 1c. i 1d.). Analizowano pięć wybranych obszarów guza. W celu porównania liczby pericytów występujących w obrębie naczyń z gęstością mikronaczyń obliczono tzw. wskaźnik *pokrywy pericytów* otaczających mikronaczynia (PCI – *Pericyte Coverage Index*). Wskaźnik ten zdefiniowano jako:

$$PCI = \frac{\text{średnia liczba pericytów w polu widzenia} \times 100\%}{\text{średnia MVD-CD34}}$$

Wyniki pięciu kolejnych pomiarów zostały uśrednione i poddane analizie statystycznej. Wartości analizowanych parametrów mierzonych w skali nominalnej scharakteryzowano przy pomocy liczebności i odsetka, a wartości w skali porządkowej przy pomocy średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego i zakresu zmienności. Pozostałe parametry z uwagi na rozkład skośny zmienności oceniano przy pomocy mediany i zakresu zmienności z wyliczeniem 25. i 75. percentyla. Normalność rozkładów badanych zmiennych ilościowych oceniano przy pomocy testu W Shapiro-Wilka. Dla porównania wyników powtarzanych pomiarów zastosowano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA Friedmana. Ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym do wykrycia istotności różnic między cechami niepowiązаныmi dla dwóch grup użyto nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a oraz testu kolejności rang ANOVA wg Kruskala, w przypadku więcej niż dwóch grup. Zależność zmienności oceniono przy pomocy testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana. Przyjęto 5% błąd wnioskowania i związany z nim poziom istotności statystycznej $p < 0,05$ wskazujący na istnienie istotnych różnic, bądź zależności. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica v. 6.0 (Statsoft, Polska).

Wyniki

Badana grupa obejmowała 77 chorych z nowotworami złośliwymi przydatków w wieku od 24 do 85 lat (średnia $56,01 \pm 12,7$ lat). W grupie tej 32 (41,5%) kobiety były przed menopauzą, a 45 (58,5%) było po menopauzie. W grupie przedmenopauzalnej średnia wieku wyniosła $44,4 \pm 7,5$ lat, a w grupie pomenopauzalnej $64,4 \pm 8,3$ lat. Stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO przedstawiał się następująco: w I stopniu zaawansowania było 15 chorych (2 po menopauzie), w II stopniu – 7 pacjentek (2 po menopauzie), w III – 50 kobiet (38 po menopauzie) a w IV stopniu – 5 (3 po menopauzie) chorych. Wyniki oceny wybranych markerów przedstawiono w tab. II.

Ocena gęstości mikronaczyń przy pomocy markera CD34

Najniższe wartości MVD ocenianego przy pomocy CD34 wśród guzów złośliwych stwierdzono w gruczolakorakach surowicznych (mediana = 16,8). Najwyższą medianę gęstości mikronaczyń zaobserwowano w gruczolakorakach śluzowych (mediana=27,4). Różnica pomiędzy tymi grupami była bliska istotności statystycznej ($Z = -2,02$ $p = 0,08$). W grupie pozostałych guzów złośliwych mediana MVD wynosiła 20,7. Stwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w wartościach mediany MVD w zależności od statusu menopauzalnego chorych. W grupie kobiet przed menopauzą ekspresja CD34 była niższa w porównaniu do pacjentek po menopauzie ($p < 0,05$). Nie wykazano natomiast występowania istotnych statystycznie różnic w MVD w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu. Mediana MVD w grupie kobiet w IV stopniu zaawansowania klinicznego była istotnie wyższa w porównaniu z grupą kobiet w III stopniu zaawansowania ($Z = -2,07$; $p = 0,03$). Różnice w medianach MVD pomiędzy II a IV stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO były bliskie istotności statystycznej ($Z = -1,86$; $p = 0,06$).

Ocena ekspresji desminy w badanych guzach nowotworowych

Gęstość pericytów oceniana przy wykorzystaniu przeciwciała anty-desmina w badanej grupie wynosiła 4,8 (zakres 0,0-25,8). Brak reakcji barwnych z tym przeciwciałem stwierdzono w 12 guzach, a w grupie tej by-

Tab. I. Rodzaje i wybrane parametry reakcji przeciwciał wykorzystanych w celu oceny badanych czynników związanych z angiogenezą w nowotworach złośliwych jajnika

Przeciwciało	Klon	Rozcieńczenie	Czas inkubacji	Temperatura	Firma
anty-CD34	monoklonalne mysie QBEnd/10	1:50	60 min	pokojowa	DAKO
anty-desmina	monoklonalne mysie DE-R-11	1:25	30 min	37°C	Novocastra
anty- α -SMA	monoklonalne mysie α -sm-1	1:50	90 min	pokojowa	Novocastra

to 9 gruczolakoraków surowicznych, 2 raki śluzowe i 1 endometrioidalny. Najwyższą gęstość pericytów (mediana=7,8) w grupie z dodatnią reakcją na desminę stwierdzono w gruczolakorakach śluzowych. W gruczolakorakach surowicznych mediana gęstości pericytów wynosiła 4,5, a w pozostałych typach histologicznych 4,9. Wartości te nie różniły się istotnie pomiędzy grupami nowotworów w różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Status menopauzalny badanych pacjentek również nie wpływał istotnie na gęstość pericytów w badanych guzach nowotworowych. Najwyższą wartość mediany w tej grupie guzów stwierdzono u chorych w IV stopniu zaawansowania nowotworu złośliwego

Mediana wskaźnika *pokrywy pericytów* wokół mikronaczyń nowotworowych identyfikowanych przy pomocy przeciwciała anty-desminy (*PCI-desmina*) w badanej grupie wynosiła 31,4% (zakres 0,0-89,3%). W grupie gruczolakoraków śluzowych wartość wskaźnika *PCI-desmina* wynosiła 28,6%, w rakach surowicznych 31,2%, a w grupie pozostałych guzów złośliwych 36,2%. Różnice pomiędzy tymi grupami nie były statystycznie istotne. Status menopauzalny, stopień zróżnicowania histologicznego oraz stopień zaawansowania klinicznego nie miały istotnego wpływu na wartości wskaźnika *PCI-de-*

smina we wszystkich rodzajach histologicznych badanych guzów.

Ocena ekspresji alfa-SMA w pericytach mikronaczyń nowotworowych

Gęstość pericytów oceniana przy użyciu markera alfa-SMA wynosiła 10,5 (zakres 2,7-47,0). Najwyższą liczbę pericytów α -SMA-pozytywnych stwierdzono w gruczolakorakach śluzowych (mediana=18,1). W gruczolakorakach surowicznych mediana gęstości pericytów wynosiła 11,5, a w pozostałych typach histologicznych 8,5. Różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie ($p<0,05$). Status menopauzalny oraz stopień zróżnicowania histologicznego nie wpływał istotnie na gęstość pericytów ocenianych przy pomocy markera alfa-SMA. Po uwzględnieniu stopnia zaawansowania klinicznego stwierdzono największą liczbę pericytów w grupie kobiet z w IV stopniu zaawansowania wg FIGO, natomiast najniższą w III stopniu zaawansowania, przy czym różnice były istotne statystycznie ($Z=-2,18$; $p=0,02$, test U Manna-Whitney'a).

Mediana wskaźnika *pokrywy pericytów* (*PCI- α -SMA*) w badanej grupie wynosiła 59,1% (zakres 12,2-95,4%). W grupie gruczolakoraków śluzowych stwier-

Tab. II. Gęstość mikronaczyń oceniana jako ekspresja CD34 oraz ocena gęstości pericytów na podstawie badania ekspresji desminy i α -SMA w zależności od rodzaju histologicznego guza, statusu menopauzalnego pacjentek, stopnia zróżnicowania histologicznego oraz stopnia zaawansowania klinicznego wg FIGO w badanej grupie kobiet

	N	CD34		DESMINA		α -SMA	
Typ histologiczny							
surowicze	36	16,8		4,5		11,5	
śluzowe	11	27,4	p=0,2	7,8	p=0,35	18,1	p=0,04
inne	30	20,7		4,9		8,5	
Status menopauzalny							
przed MNP	32	14,3		4,4		8,0	
po MNP	45	25	p=0,02	5,0	p=0,42	11,6	p=0,34
Stopień zróżnicowania histologicznego							
G1	6	27,1		4,3		16,9	
G2	32	17,8	p=0,43	5,6	p=0,98	9,2	p=0,13
G3	39	21,8		4,8		10,4	
Stopień zaawansowania klinicznego							
I	15	21,8		4,4		12,7	
II	7	22,6		6,8		10,4	
III	50	16,3	p=0,14	4,5	p=0,17	8,0	p=0,05
IV	5	33,0		14,6		15,6	

MNP – menopauza

dono najwyższą wartość PCI- α -SMA równą 64,2%. U kobiet z guzami surowiczymi wartość wskaźnika PCI α -SMA wynosiła 62,6% a w grupie pozostałych nowotworów złośliwych 47,5%. Różnice pomiędzy tymi grupami nie były istotne statystycznie. Status menopauzalny kobiet, stopień zróżnicowania histologicznego oraz stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO nie wpływał istotnie na różnice w wartościach PCI- α -SMA w poszczególnych grupach guzów złośliwych. Stwierdzono pozytywną zależność pomiędzy gęstością mikronaczyń identyfikowanych przy pomocy CD34 a liczbą pericytów α -SMA-pozytywnych ($R=0,57$ $p<0,0001$) i pericytów wykrytych dodatnią reakcją na obecność desminy ($R=0,40$ $p=0,0002$). Stwierdzono również negatywną korelację pomiędzy MVD guzów a wskaźnikiem pokrywy pericytów alfa-SMA-pozytywnych ($R=-0,35$ $p=0,001$)

Dyskusja

Angiogeneza jest niezbędna dla wzrostu większości litych guzów nowotworowych powyżej 2–3 mm objętości. Zwiększanie rozmiarów i masy guza oraz odprowadzanie toksycznych metabolitów jest możliwe dzięki wzrostowi sieci mikrokapilar. Szereg dotychczasowych doniesień wskazuje, że gęstość mikronaczyń oceniana metodami immunohistochemicznymi w guzach złośliwych nie zawsze jest przydatnym wskaźnikiem prognostycznym [2, 14]. Z tego względu poszukiwane są metody jeszcze dokładniejszej oceny powstawania i funkcjonowania sieci mikronaczyń. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań wskazują, że średnia gęstość mikronaczyń w rakach śluzowych była niemal 2-krotnie wyższa w porównaniu do raków surowiczych. Wydaje się to potwierdzać teorię, że angiogeneza może być indukowana w różny sposób, zależnie od narządu oraz histologicznego rodzaju guza. Jest również prawdopodobne, że inne, słabo poznane do tej pory mechanizmy molekularne mogą również odgrywać istotną rolę w progresji nowotworu złośliwego. Nasze obserwacje są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami innych autorów, którzy stwierdzili, że gęstość mikronaczyń w gruczolakorakach śluzowych była najwyższa wśród wszystkich badanych typów histologicznych, natomiast najniższa w rakach jasnokomórkowych [16, 17]. W analizowanych w tej pracy grupach kobiet przed i po menopauzie nie stwierdzono istotnych różnic w MVD pomiędzy guzami o wysokim i niskim stopniu zróżnicowania. Nie stwierdzono również różnic w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego guza złośliwego. W badaniach przeprowadzonych przez Amisa i wsp. porównano gęstość mikronaczyń w guzach niezłośliwych oraz w rakach jajnika wykorzystując przeciwciała przeciwko vWF-VIII [6]. Średnie wartości MVD nie różniły się istotnie w grupach guzów złośliwych i niezłośliwych. Nakanishi i wsp. badając angiogenezę w rakach jajnika stwierdzili, że naczynia podlegają jednako-

wej stymulacji czynnikami angiogennymi, niezależnie od stadium zaawansowania klinicznego nowotworu [17].

Orre i wsp. oceniali gęstość mikronaczyń w niezłośliwych, granicznych i złośliwych nowotworach jajnika przy wykorzystaniu trzech różnych markerów śródbłonka: CD31, CD34 oraz antygenu czynnika VIII [18]. Wyniki badań cytowanych autorów również potwierdzają, hipotezę że gęstość mikronaczyń zależna jest od rodzaju histologicznego guza jajnika. Abulafia i wsp. porównali gęstość mikronaczyń w guzach jajnika u kobiet w I stopniu zaawansowania choroby oraz w grupie kobiet z guzami granicznymi [1]. Stwierdzono, że MVD w guzach złośliwych było znacząco wyższe w porównaniu do guzów jajnika o granicznej złośliwości. Może to sugerować, że zjawisko *angiogenic switch*, czyli zmiana fenotypu guza ze stanu *równowagi naczyniowej* na fenotyp proangiogeny ma miejsce właśnie w czasie transformacji guza granicznego w nowotwór złośliwy. Porównanie mikroangiogenezy guza ocenianej jako ekspresja antygenu CD34 ze stopniem zróżnicowania histologicznego (G1-G3) oraz ze stadium klinicznym zaawansowania choroby nie wykazały istotnych zależności pomiędzy tymi cechami. Jest to zgodne z zaproponowaną niedawno hipotezą, że intensywne procesy neoangiogenezy zachodzą prawdopodobnie na bardzo wczesnym etapie rozrostu nowotworowego [2]. Zaobserwowana w analizowanej przez nas grupie kobiet istotna zależność pomiędzy statusem menopauzalnym a gęstością mikronaczyń ocenianą jako ekspresja antygenu CD34 wymaga dalszego potwierdzenia.

Wykorzystanie markerów śródbłonka, takich jak CD34, CD31 czy vWF-VIII umożliwia badanie mikronaczyń, ale nie pozwala na precyzyjną ocenę aktywności angiogennej guza. Najnowsze badania histomorfologiczne wskazują, że pewne rodzaje guzów mogą być dobrze unaczynione bez wyraźnej neoangiogenezy. Dzieje się tak prawdopodobnie dzięki wykorzystaniu istniejących już naczyń gospodarza albo, jak w przypadku czerniaków złośliwych, dzięki wykształceniu kanałów naczyniopodobnych bez udziału śródbłonka. Proces ten został nazwany mimikrą naczyniową [19, 20]. Z tego względu coraz częściej zainteresowanie budzi możliwość oceny występowania i roli pericytów. Komórki te towarzysząc śródbłonkom odgrywają szczególną rolę w rozwoju i wzroście mikrokapilar zarówno w fizjologii, jak i w procesach patologicznych. Trudności związane z identyfikacją pericytów w przypadku zmian nowotworowych spowodowane są różnicami w ekspresji (–) wykorzystywanych obecnie markerów tych komórek [11]. W dotychczas opublikowanych badaniach stosowano najczęściej pojedyncze markery. Prawdopodobnie z tego powodu pojawiają się duże rozbieżności w ocenie gęstości pericytów w otoczeniu mikronaczyń guzów złośliwych [7, 15]. Jednoczesne wykorzystanie przeciwciał skierowanych przeciwko desminie oraz alfa-SMA w naszych badaniach pozwoliło

na porównanie przydatności badanych markerów w ocenie pericytów i mikronaczyń w dużej grupie złośliwych nowotworów jajnika. Ekspresję alfa-SMA w komórkach sąsiadujących z mikrokapilarami stwierdzono we wszystkich analizowanych przypadkach. Brak reakcji z przeciwciałem skierowanym przeciwko desminie stwierdzono w 12 przypadkach (15%) badanych guzów jajnika. Interesującym jest fakt, że 75% tej grupy stanowiły raki surowicze. Można przypuszczać, że brak reakcji barwnej może być wynikiem braku desminy w pericytach i nie wynika z nieobecności samych pericytów. Wydaje się, że może mieć związek z typem histologicznym guza [13, 21].

W nielicznych do tej pory opublikowanych badaniach opisujących pericyty naczyń guzów nowotworowych wskazywano, że gęstość pericytów w różnych guzach waha się od znaczącej do bardzo małej. W niektórych obszarach guza pericyty wokół naczyń były nieobecne [15]. Rozbieżności wyników badań można tłumaczyć różnicami w ekspresji markerów pericytów w różnych typach histologicznych guzów złośliwych. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono też, że ekspresja alfa-SMA była istotnie skorelowana z ekspresją desminy. Średnia liczba pericytów w rakach jajnika identyfikowanych przy pomocy alfa-SMA była ponaddwukrotnie wyższa w porównaniu do liczby pericytów identyfikowanych przy użyciu desminy (10,5 vs 4,8). Sugeruje to, że u chorych z rakiem jajnika marker alfa-SMA może być bardziej przydatny w identyfikowaniu pericytów wokół sieci mikrokapilar guza. Podobnie jak w przypadku średniej gęstości mikronaczyń największą gęstość pericytów zaobserwowaliśmy w gruczolakorakach śluzowych. Mediany komórek wykazujących pozytywną reakcję z przeciwciałami przeciwko desminie, jak i na alfa-SMA różniły się istotnie pomiędzy guzami śluzowymi i surowiczymi. Zarówno stopień zaawansowania klinicznego, jak i zróżnicowania histologicznego guzów nie były związane z gęstością pericytów w badanych guzach. Może to potwierdzać wcześniejsze przypuszczenia, że w guzach złośliwych jajnika angiogeneza pojawia się na bardzo wczesnym etapie transformacji nowotworowej, a jej nasilenie jest prawdopodobnie zależne od rodzaju histologicznego zmiany nowotworowej.

Morikawa i wsp. porównywali ekspresję desminy i alfa-SMA w pericytach wokół mikronaczyń guzów oraz w tkankach prawidłowych [13]. Autorzy stwierdzili, że pericyty kapilar prawidłowych wykazują ekspresję desminy przy równoczesnym braku ekspresji alfa-SMA. Komórki mięśni gładkich małych tętniczek i pericyty żył wykazywały dodatnią ekspresję obu badanych markerów. W przeciwieństwie do tego ponad 97% naczyń krwionośnych badanych guzów, w tym również naczynia o rozmiarach mikrokapilar posiadały pericyty, które wykryto dzięki równoczesnej dodatniej reakcji na oba markery. Wydaje się prawdopodobne, że pericyty w guzach złośliwych syntetyzują zarówno

alfa-SMA, jak i desminę, co odróżnia te naczynia od naczyń prawidłowych. Nietypowa ekspresja obu markerów pojawia się najczęściej w czasie intensywnego wzrostu guza.

Eberhard i wsp. porównali wskaźnik *pokrycia* przez pericyty naczyń w różnych rodzajach guzów nowotworowych, w tym w raku sutka, prostaty nerki i odbytu [15]. Autorzy stwierdzili istotne różnice w udziale pericytów wokół mikrokapilar w poszczególnych rodzajach nowotworów. Unaczynienie raka sutka i odbytu charakteryzowało się najwyższym, wynoszącym 70% odsetkiem pericytów zlokalizowanych bezpośrednio wokół naczyń. Glioblastoma i rak nerki z kolei charakteryzowały się najniższym odsetkiem tych komórek, a wskaźnik *pokrycia naczyń* przez pericyty wahał się od 10–20%. W naczyniach prawidłowych odsetek ten wahał się od 11% w mięśniu sercowym, przez 21% w mięśniach szkieletowych, 22–30% w mózgu i 41% w siatkówce [9].

W badanych guzach złośliwych ponad połowa mikronaczyń była pokryta pericytami wykazującymi dodatnią reakcję z przeciwciałem anty-alfaSMA. Interesująca wydaje się w tej sytuacji negatywna korelacja pomiędzy gęstością mikronaczyń wskaźnikiem *pokrycia naczyń* pericytami-alfa-SMA-pozytywnymi. Większa gęstość mikronaczyń w guzie związana była z mniejszym udziałem pericytów, co wskazuje na różnice w funkcjonalnym statusie unaczynienia guzów jajnika. Zaobserwowany brak kontaktu z pericytami mikrokapilar w niektórych nowotworach sugeruje, że obliczenie wskaźnika *pokrywy pericytów* może być odzwierciedleniem dojrzałości nowo powstających naczyń guza [13]. Potencjalna przydatność prognostyczna tego wskaźnika wymaga dalszej weryfikacji.

Wnioski

Nowotwory złośliwe jajnika charakteryzują się różnym stopniem angiogenezy i niezależnym od statusu menopauzalnego kobiety udziałem pericytów. Na podstawie przeprowadzonych badań sądzimy, że ocena gęstości pericytów w powiązaniu z analizą mikroangiogenezy może być przydatnym prognostycznie parametrem w różnicowaniu charakteru angiogenego nowotworów złośliwych jajnika.

Praca finansowana z grantu KBN 3PO 5E 115 24

Piśmiennictwo

1. Abulafia O, Ruizi JE, Holcomb K, et al. Angiogenesis in early-invasive low-malignant-potential epithelial ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 548-52.
2. Bamberger ES, Perrett CW. Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Mol Pathol* 2002; 55: 348-59.
3. Fanelli M, Locopo N, Gattuso D, et al. Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods. *Intern J Biol Markers* 1999; 14: 218-31.

4. Weidner N, Carrol PR, Flax J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-9.
5. Czekierdowska S, Roliński J, Czekierdowski A, et al. A comparison of Bcl-2 expression, microvessel density and Color Doppler sonography in the benign and malignant ovarian tumors. *Pol J Environmental Stud* 2004; 13 Suppl. II 85-88.
6. Amis SJ, Coulter-Smith SD, Crow JC, et al. Microvessel quantification in benign and malignant ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 58-65.
7. Czekierdowska S, Roliński J, Czekierdowski A, et al. Pericytes and microvessel density assessment in women with ovarian malignant tumors. *Pol J Environmental Stud* 2004; 13, Suppl. II 89-92.
8. Orre M, Rogers PAW. VEGF, VEGF-1, and VEGF-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumors of the ovary. *Int J Cancer* 1999; 84: 101-108.
9. Sims DE, Miller FN, Donald A, et al. Ultrastructure of pericytes in early stages of histamine-induced inflammation. *J Morphol* 1990; 206: 333-42.
10. Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* 1993; 99: 1-12.
11. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspfen F, et al. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol* 1991; 138: 1335-47.
12. Hellstrom, M Gerhardt H, Kalen M, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001; 153: 543-53.
13. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh, et al. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 985-1000.
14. Czekierdowski A, Kotarski J. Angiogeneza a ultrasonograficzna ocena przepływu krwi. W: *Ultrasonografia dopplerowska w położnictwie i ginekologii*. Brązert J (red.) i wsp. OWN Poznań 163, 2004.
15. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Research* 2000; 60: 1388-93.
16. Gassparini G, Bonoldi E, Viale G, et al. Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69: 205-11.
17. Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, et al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 256-62.
18. Orre M, Lofti-Miri M, Mamers P, et al. Increased Microvessel density in mucinous serous and benign tumours of the ovary. *Br J Cancer* 1998; 77: 2204-209
19. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1417-23.
20. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-52.
21. Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, et al. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 304-10.