

UDK 618.11-006.04:612.017

DOI 10.7251/AKPR1801024M

ZNAČAJ TKIVNE IMUNOLOKALIZACIJE IMUNOGLOBULINA A KOD MUCINOZNIH OVARIJALNIH TUMORA

Zoran Milosavljević¹, Ljiljana Tomić², Živka Malić³, Brankica Milovanović⁴

Sažetak

Cilj našeg istraživanja je bilo određivanje prognostičke važnosti izmene sekrecije mucina i ekspresije IgA u tkivu tumora jajnika. Tumorsko tkivo jajnika 34 pacijentkinje je histološki obrađivano i bojeno uz pomoć mucinohistohemijskih i imunocitohemijske metode. Na našem materijalu vrsta mucina i tkivna imunolokalizacija IgA se pokazala 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. IgA i izmena sekrecije mucina su validni prognostički faktori kod ovarijalnih neoplazmi.

Ključne reči: Imunoglobulin A, mucini, tumori jajnika

¹ Milosavljević Zoran, dr, vanredni profesor, Institut za Histologiju i embriologiju, Fakultet Medicinskih nauka Kragujevac, Srbija, tel: +381 64 1247461, zormil67@gmail.com

² Ljiljana Tomić, dr, docent, Univerzitet "Bijeljina", Farmaceutski fakultet, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, BiH, Tel: +387 65 512 481

³ Živka Malić, dr, docent, Univerzitet "Bijeljina", Farmaceutski fakultet, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, BiH, Tel: + 387 65 715 689, e-mail: zivkamalic88@gmail.com

⁴ Brankica Milovanović, MSc, asistent, Univerzitet "Bijeljina", Farmaceutski fakultet, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, BiH, Tel: +387 65 871 856

PROGNOSTIV VALUE OF TISSUE LOCALIZATION OF IMMUNOGLUBULIN A IN MUCINOUS AND SEROUS OVARIAN TUMORS

Zoran Milosavljević¹, Ljiljana Tomić², Živka Malić³, Brankica Milovanović⁴

Abstract

Study was designed to reveal the prognostic significance of IgA and mucin secretion in ovarian neoplasms. Samples of ovarian tumours of 34 female patients were routinely processed and stained with anti-IgA antibody as well as with histochemistry methods for mucin verification. In our study mucin type and tissue immunolocalization of the IgA 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. IgA and change of epithelial mucins are valid prognostic factors in ovarian neoplasms.

Keywords: Immunoglobuline A, Mucins, ovarian tumor

¹ Zoran Milosavljevic, Ph.D, Associate Professor, Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences Kragujevac, Serbia, tel +381 64 1247461, zormil67@gmail.com

² Ljiljana Tomić, Ph.D, Assistant Professor, University "Bijeljina", Faculty of Pharmacy, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, BiH, Tel: +387 65 512 481

³ Živka Malić, Ph.D, Assistant Professor, University "Bijeljina", Faculty of Pharmacy, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, BiH, Tel: + 387 65 715 689, e-mail: zivkamalic88@gmail.com

⁴ Brankica Milovanović, MSc, University "Bijeljina", Faculty of Pharmacy, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Republic of Srpska, BiH, Tel: +387 65 871 856

Uvod

Učestalost tumora jajnika je poslednjih decenija u regionu Evrope u konstantnom porastu. U poslednje vreme ovaj organ sve više privlači pažnju istraživača budući da su maligni tumori ovog organa na sedmom mestu po učestalosti u svetu, a na četvrtom mestu po mortalitetu kod žena čine da (http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/ovarian_cancer_statistics.php). Posebno je za nas važna činjenica da je Srbija na veoma visokom petom mestu u svetu po učestalosti ovog cancera. Prema patohistološkom tipu, epitelne ovarijalne neoplazme čine oko 65% svih tumora jajnika, dok njihovi maligni oblici čine blizu 90% kancera ovog organa (<http://www.ocrf.org/news/2014-ovarian-cancer-statistics>). Prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije grupu epitelnih tumora jajnika čini nekoliko histoloških podtipova među kojima su najzastupljeniji serozni i mucinozni različitog stepena malignosti, od benignih, preko borderline do malignih formi (Chen VW 2003). Dijagnoza bolesti se postavlja relativno kasno, često tek kada se tumor nađe u uznapređovalom stadijumu zbog čestog izostanka simptomatologije u početnim stadijumima razvoja ovih tumora. (Lataifeh I, 2005, Deligdisch L, 2007). 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 (Wang S, 2010, Aune G, 2011). Grupa humanih mucina (MUC) se na osnovu lokalizacije deli na transmembranske i sekretorne mucine. Ovi visoko glikozirani proteini su zapravo selektivna molekularna barijera na površini epitela, a transmembranski proteini imaju i funkciju prenošenja signala, poput faktora rasta, a na taj način i funkciju očuvanja integriteta epitela (Kufe DW, 2009). Brojni istraživači sugerišu da izmene ekspresije mucina i njihovog stepena glikosilacije utiču na važne elemente biološkog ponašanja tumorskih ćelija poput adhezije, diferencijacije i transformacije tumorskih ćelija, a u novije vreme se mucini istražuju kao potencijalni ciljevi antitumorske terapije (Kufe DW, 2009, Kaur S, 2014). Ovo je posebno važno kada je u pitanju lokalna imunološka odbrana sluznica u čemu veoma važnu ulogu sekretorni imunoglobulin A koji se sastoji od sekretorne komponente, jednog J lanca i dva monomera IgA (Günther C, 2014, Mantis NJ, 2011). 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. Iako u naučnoj javnosti preovladava mišljenje da je celularni, a ne humoralni imunitet važniji u odbrani organizma od neoplazmi, uloga IgA koji je prevashodno usmeren protiv izazivača zapaljenjskih procesa u sluznici, ne može se zanemariti a posebno značaj koju IgA ima u proceni očuvanosti polariteta epitelih ćelija (Catros-Quemener V, 2003). Zbog svega navedenog, cilj našeg ispitivanja je bio da se kod epitelih ovarijalnih tumora različitog stepena maligniteta utvrdi i identifikuje moguća izmena sekrecije mucina i imunoglobulina A u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja ovih parametara.

Materijal i metode

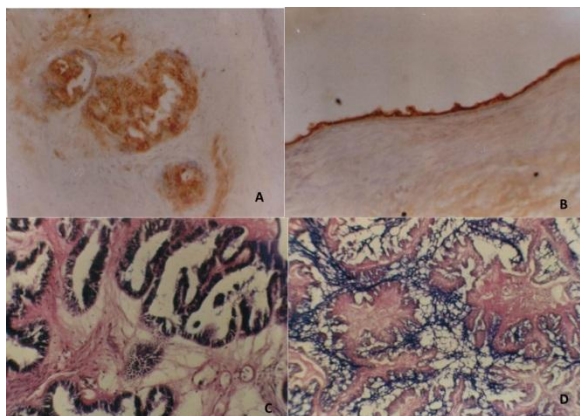
Istraživanje je obavljeno na hirurškom materijalu dobijenom nakon ovariektomije i/ili ovariektomije sa histerektomijom. Sve procedure su izvedene u skladu sa smernicama Etičkog Komiteta KC Kragujevac i dobre kliničke prakse. U ekperimentalnoj grupi bilo je 34 tkivna uzorka jajnika dobijena od pacijentkinja starosti od 42-67 godine sa dijagnozom

epitelnog tumora jajnika pri čemu je u grupi seroznih bilo 15, a u grupi mucinoznih tumora 19 uzoraka. Kao kontrolni uzorak je korišćeno normalno tkivo jajnika udaljeno od najmanje 2 cm od identifikovanih tumorskih 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 preseći debljine 5 mikrometara. Tkivni preseći su postavljeni na adherentne pločice i bojeni standardnom hematoksilin/eozin metodom u cilju verifikacije patohistoloških promena kao i imunocitohemijskom (LSAB+/HRP) metodom sa anti-IgA (Abcam, USA, Ab75671, 1:400) antitelom koja je prethodno podrazumevala demaskiranje antigena, blokiranje peroksidazne aktivnosti i inkubaciju sa primarnim i sekundarnim antitelom. Histochemijska AB-PAS (pH=2,5) (Artisan, DAKO) metoda je korišćena za identifikaciju sekrecije epitelnih mucina pri čemu alcijan blue (AB) boji kisele, a perjodna kiselina i Šifov reagens (PAS) neutralne mucine. Nakon bojenja, preseći tkiva su slikani mikroskopom (Olympus BX51, Japan) koji je opremljen kamerom visoke rezolucije (Olympus C5050Z). 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 imunocitohemijskih i histochemijskih depozita u ispitivanom tkivu.

Rezultati

Naše istraživanje je pokazalo da je prevalenca ispitivanih tumora najveća u starosnoj grupi u rasponu od 50-70 godine starosti jer je najveći broj slučajeva (52%) verifikovan u tom godištu. Histopatološko ispitivanje na našem materijalu je pokazalo da se serozne i mukozne žlezdolike tkivne formacije u navedenom procentu javljaju u tri patološke varijante tumora ovarijuma: benigne (57%), borderline (14%) i maligne forme (29%). Mikromorfološkim ispitivanjem preparata tkiva jajnika bojenih standardnom H/E metodom zaključeno je da je učestalost seroznih benignih tumora bila oko 34%, malignih oko 14%, dok je u slučaju mucinoznih tumora zastupljenost benigne forme bila oko 26%, a maligne oko 9%. Borderline forme su bile znatno ređe verifikovane. Kada je u pitanju imunocitohemijsko ispitivanje tkiva jajnika uz pomoć anti-IgA antitela prema očekivanju, najslabija aktivnost je verifikovana u normalnom tkivu 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), Imunoekspresija sekretornog imunoglobulina A u normalnom pokrovnom epitelu jajnika je veoma slabo izražena. Benigne žlezdolike forme mucinoznih tumora pokazuju snažnu aktivnost na ovaj imunoglobulin, dok sa porastom atipije ćelija tumora nivo njegovog prisustva u tkivu opada sve do potpunog odsustva u anaplastičnim poljima malignih tumora visokog histološkog gradusa i totalno poremećene tkivne arhitektonike. Imunoglobulin A je, kada je prisutan u neoplastičnom tkivu, dominantno lociran u apikalnom domenu epitelnih ćelija i u lumenu žlezdolikih formacija tumora dok se najjača imunoreaktivnost može detektovati na površini žlezdanih ćelija (slika 1 B). Histochemijska karakterizacija mucina na našim materijalu je pokazala da sa porastom ćelijske atipije i povećanjem poremećaja tkivne arhitektonike dolazi do značajnih promena mucina. Dok kod benignih mucinoznih tumora dominira pojačana sekrecija neutralnih (normalnih) mucina, njihove maligne forme pokazuju dominaciju kiselih (izmenjenih) mucina (slika 1 D). Posebno je značajan i interesantan nalaz koji se verifikuje kod loše diferentovanih neoplazmi. Veoma slaba sekrecija isključivo kiselih mucina ili pak potpuno odsustvo sekrecije bilo kojih mucina (slika 1 C) u delovima neoplazme sa anaplastičnim poljima je

prema našem istraživanju jedna od glavnih karakteristika tumora sa lošom prognozom bolesti.



Slika 1. Imunolokalizacija imunoglobulina A u lumenu žlezda i na apikalnoj površini epitelnih ćelija (A,B), histohemijska analiza sekrecija mucina u loše diferentovanim poljima tumora pokazuje izmenu mucina (C) tj. hipersekreciju kiselih mucina kod mucinoznih malignih neoplazmi jajnika (D).

Diskusija

U poslednjih nekoliko decenija došlo je do značajnog povećanja incidence tumora jajnika, pogotovo malignih formi. Prema podacima SZO, u našem regionu u je ova pojava čak i snažnije izražena tako da je na primer Srbija svrstana na nezavidno peto mesto u svetu po učestalosti

(http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/ovarian_cancer_statistics.php

). 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. Moderne dijagnostičke metode, pogotovo iz grupe onih koje mogu sa velikom preciznošću da pokažu stepen atipije tkiva tumora a samim tim i da ukažu na prognozu bolesti su u brojnim delovima ovog geografskog regiona nedostupne ili teže dostupne. Zbog ovih činjenica posebna važnost se pridaje standardnim pato-histološkim prognostičkim faktorima bolesti poput proliferativne aktivnosti tumorskih ćelija, očuvanosti polariteta i normalne funkcije ćelija. Međutim, kako je naše istraživanje pokazalo, procenat nedovoljno definisanih formi tumora jajnika, iako ne značajan po učestalosti, obuhvata veliki broj slučajeva budući da je ukupna incidenca ovih tumora u porastu. Štaviše, mi smo pokazali da relativno jednostavna metoda histohemijske karakterizacije epitelnih mucina tumora ovarijuma prilično dobro korelira sa mnogo složenijim metodama imunohemijske lokalizacije pojedinih tumorskih markera. Detekcija Imunoglobulina A spada u pomenute metode kao što je i pokazala naša studija. Sekretorna forma ovog imunoglobulina se normalno nalazi kako u sekretu mukoza i tako i u epitelnim hiperplastičnim i tumorskim ćelijama drugih delova genitalnog sistema žene (Kondi-Paphitis A, 1999). On učestvuje u imunološkoj odbrani sluznica delujući uglavnom antibakterijski i delom antiviralno (Mantis NJ, 2011). Kada je u pitanju pokrovni epitel jajnika, malo je literaturnih podataka koji govore o značajnosti IgA u antitumorskoj zaštiti. Brojni radovi sugerišu da je celularni, a ne humoralni imuni odgovor značajniji u antitumorskoj zaštiti i osporavaju ulogu IgA u tom

procesu (Ankri C, 2013) , ali se on na našem materijalu pokazao kao odličan marker očuvanosti polariteta i transportne funkcije epitelnih ćelija. 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. Boross i sar. (2013) sugerišu da je IgA efikasan u zaustavljanju rasta tumora kod miševa. Rezultati histohemijskog ispitivanja na eksperimentalnom materijalu su pokazali da, poput sekterornog IgA i mucini doživljavaju slične promene. Naši rezultati upućuju na prognostičku važnost histohemijskih nalaza zato što je kod benignih formi verifikovana sekrecija neutralnih mucina, dok kod borderline i malignih formi dolazi do izmene tipa mucina u kisele, pa čak i do asekreције bilo kojih mucina u poljima snažne ćelijske atipije. Ovu tezu potvrđuje i veliko interesovanje istraživača za mucine poslednjih 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) (Kufe DW. 2009, Kaur S, 2014). Kao dokaz validnosti naših rezultata može se prihvatiti i činjenica da u poslednje vreme napor istraživača ide u pravcu korišćenja transmembranskih mucina kao ciljne grupe za antitumorsku terapiju (Noya V, 2013, Gaidzik N, 2011).

Zaključak

Epitelni mucini, kao i imunoglobulin A su veoma dobri parametri za procenu prognoze ovarijanih tumora. Sekrecija neutralnih mucina, praćena snažnom imunoreaktivnošću žlezdanog tkiva tumora jajnika na IgA su znaci dobre prognoze bolesti, dok je izmena mucina i njihova hiposekreција/asekreција uz slabu imunoreaktivnost tkiva na IgA znak da je neoplazma građena od loše diferentovanog tkiva i ima lošu prognozu.

Literatura

1. (available at: <http://www.ocrf.org/news/2014-ovarian-cancer-statistics>)
2. (available at: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/ovarian_cancer_statistics.php)
3. 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 Oct 15;191(8):4121-9
4. 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 Jun 20;4(5):444-53
5. Boross P et al. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol Med.* 2013 Aug;5(8):1213-26.
6. Catros-Quemener V1, Bouet F, Genetet N. Antitumor immunity and cellular cancer therapies. *Med Sci (Paris).* 2003 Jan;19(1):43-53.
7. 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
8. Deligdisch L, Pénault-Llorca F, Schlosshauer P, Altchek A, Peiretti M, Nezhat F. Stage I ovarian carcinoma: different clinical pathologic patterns. *Fertil Steril.* 2007 Oct;88(4):906-10.

9. Gaidzik N et al. 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 Oct 10;50(42):9977-81
10. Günther C, Neumann H, Vieth M. Esophageal epithelial resistance. *Dig Dis.* 2014;32(1-2):6-10
11. Kaur S et al. Altered Expression of Transmembrane Mucins, MUC1 and MUC4, in Bladder Cancer:Pathological Implications in Diagnosis. *PLoS One.* 2014 Mar 26;9(3):e9274
12. 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(2):141-3.
13. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009 Dec;9(12):874-85
14. Lataifeh I, Marsden DE, Robertson G, Gebiski V, Hacker NF. Presenting symptoms of epithelial ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2005 Jun;45(3):211-4.
15. N J Mantis , N Rol and B Corthésy. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology* (2011) 4, 603–611
16. Noya V et al. Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. *Int J Oncol.* 2013 Sep;43(3):775-84
17. 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 Jul;41(4):575-80.