

IMUNOCITOHEMUSKA EKSPRESUA IMUNOGLOBULINA G (IgG)
U EPITELNIM TUMORIMA JAJNIKA

2_

Miodrag RADOVIĆ, Zoran POP-TRAJKOVIĆ, Slaviša JANČIĆ,
Zoran MILOSAVLJEVIĆ, Katarina KATIĆ i Snežana JANČIĆ

*Ginekološko-akušerska klinika, Klinika za onkologiju, Institut za patologiju
Kliničkog centra u Nišu i Institut za patologiju
Medicinskog fakulteta u Kragujevcu*

Obzirom na retke studije o distribuciji imunoglobulina G kako u normalnom, tako i u tumorskom tkivu jajnika, naš cilj radaje ispitivanje imuno-ekspresije IgG-a u benignim, "borderline" i malignim tumorima jajnika.

Korišćen je operativni materijal koji je, nakon fiksacije u 10% formaldehidu, rutinski obrađivan i kalupljen u parafin. Na presecima debljine 5 mikrometara su primenjene rutinska H&E metoda za patohistološku dijagnozu tumora, mucinohisto-hemijska AB-PAS (pH 2,5) metoda za verifikaciju mucinoznih tumora jajnika i imunocitohemijska SAB tehnika sa anti-IgG-antitelima (1:800).

U benignih tumora nisu verifikovane IgG-imunoreaktivne ćelije, dok u "borderline" lezijama retke, pojedinačne tumorske ćelije sadrže IgG, ali je njihova imuna reaktivnost slabog intenziteta, a često je IgG bio prisutan samo u tragu. Intenzivna ekspresija IgG-a je nađena u polimorfnim, hiperhromnim ćelijama adenokarcinoma, pri čemu su depoziti ovog markera upadljivo izraženi u malignih tumora slabije diferencijacije. Mononukleusne inflamativne ćelije i makrofagi strome kako benignih tako i malignih tumora takode pokazuju intenzivnu imunoreakciju na IgG.

Autori diskutuju o antitumorskoj ulozi IgG-a u imunitetu i sugerišu uvođenje i imunoglobulina G u familiju PAN-markera za "screening" analize tumora jajnika.

Ključne reči: epitelni tumori jajnika, imunocitohemija, tumorski markeri, imunoglobulin G

Uvod

Imunoglobulin G je glikoprotein koji se sastoji od četiri polipeptidna lanca, molekulske težine oko 150.000. Produkuju ga plazmociti i spada u grupu gama globulina odgovornih za humoralni imunitet organizma. Pripada klasi imunoglobulina koji su najzastupljeniji u organizmu zdravih osoba, od-

nosno čini oko 75% ukupnih imunoglobulina seruma. U okviru IgG klase postoje četiri podklase imunoglobulina od kojih je najzastupljeniji IgG 1 (60 - 70%), a najmanje je zastupljen IgG4 (2-4%) (Stites et al., 1989).

IgG ima mnoštvo fizioloških i fiziopatoloških funkcija u organizmu, ali kada je u pitanju tumorska patologija svakako je njegova najvažnija uloga u "prepoznavanju" tumor-specifičnih antigena (antigenih detenninanti koje su specifične samo za tumor) i tumor-asociranih antigena (antigeni koji se nalaze i na normalnim i na tumorski antigen izaziva imuni odgovor, čiji je krajnji rezultat uništenje neoplastično izmenjene ćelije, putem dva glavna mehanizma:

- aktivacijom sistema komplementa, i
- angažovanjem mononuklearno-fagocitnog sistema

U slučaju aktivacije sistema komplementa dolazi do kaskadne reakcije čiji je produkt grupa enzima koji liziraju izmenjenu ćeliju.

U tumorskoj imunologiji mnogo značajniji imunološki put predstavlja "antitelo-zavisna celularna citotoksičnost" (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity - ADCC), kada se antitela IgG klase, i to posebno IgG1 i IgG3, vezuju sa jedne strane za makrofage ili granlocite a sa druge strane za antigen na tumorskoj ćeliji, izazivajući na taj način aktivaciju fagocitoze i uništenje alterisane ćelije (Keller et al., 1995; Stites et al., 1989).

Studije koje se odnose na prisustvo imunoglobulina G kako u normalnom tkivu, tako i u benignim, "borderline" i malignim epitelnim tumorima jajnika su veoma retke (Berchuck, 1995). Rezultati sporadičnih istraživanja Schauenstein-a i sar. (1996) ukazuju na relevantnu izmenu zastupljenosti podklasa IgG u serumu bolesnica sa karcinomom jajnika u upoređenju sa zdravim. Naime, u njihovoj studiji je istaknuto značajno sniženje IgG1-podklase na račun povećanja podklase IgG2 (Schwuenstein et al., 1996)

Cilj rada

Ispitivanje distribucije i intenziteta ekspresije IgG u benignim, "borderline" i malignim epirelnim tumorima jajnika.

Materijal i metode

Korišćen je operativni materijal, posle ovariektomije ili ovariektomije sa histerektomijom, Ginekološko-akušerske klinike Kliničkog centra u Nišu. Ukupno je analizirano 30 tumora jajnika pri čemu je, na Institutu za patologiju, od svakog tumora uzeto 5-10 isečaka, zavisno od veličine samog tumora i njegovog makroskopskog izgleda. Nakon fiksacije u 10% rastvoru formaldehida u trajanju od 24 kalupljen u parafin.

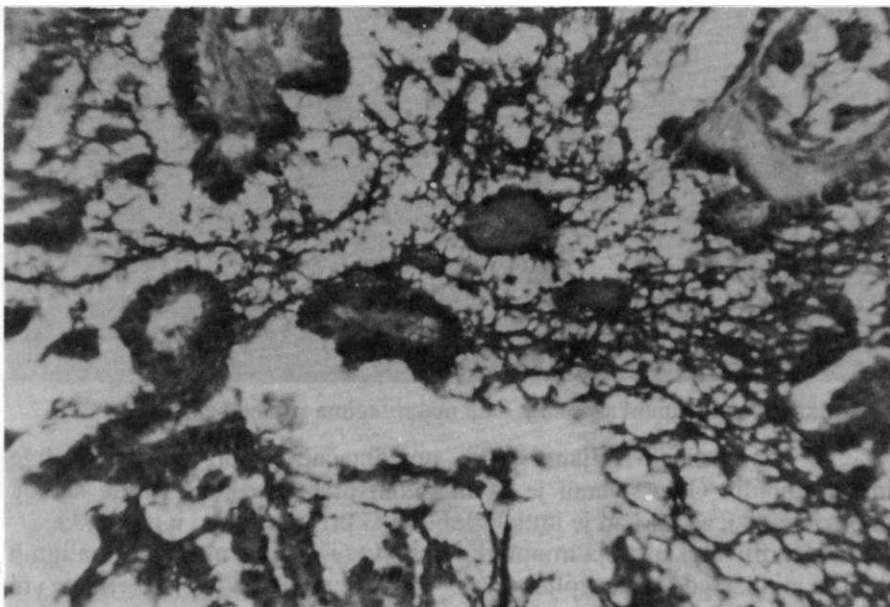
Na parafinskim presecima debljine 5 mikrometara su primenjene sledeće metode bojenja:

- rutinska H&E metoda za patohistološku dijagnozu tumora;
- mucinohistohemijska AB-PAS (pH 2,5) metoda za verifikaciju mucinoznih tumora ovarija;
- imunihistohemijska SAB (streptavidin-biotin) tehnika (Sab-Po Kit, Nichirei, Tokyo) sa anti-IgG monoklonalnim antitelima u razblaženju 1:800 (Nichirei, Tokyo) za detekciju imunoglobulina G u tumorskim ćelijama.

Rezultati ispitivanja

Mucinohistohemijski rezultati

Mucinohistohemijskom AB-PAS (pH 2,5) metodom smo konstatovali da mucinozni tumori jajnika pokazuju kvalitativne i kvantitativne izmene epitelnih mucina. Kod benignih mucinoznih kistoma dominira hipersekrecija neutralnih mucina, u slučaju displazije njihovog epitela neutralni mucini ustupaju mesto kiselim, ali je sekrecija oba tipa mucina evidentna (slika 1).



Slika 1. Neutralni i kiseli mucini u mucinoznom tumoru ovarijuma

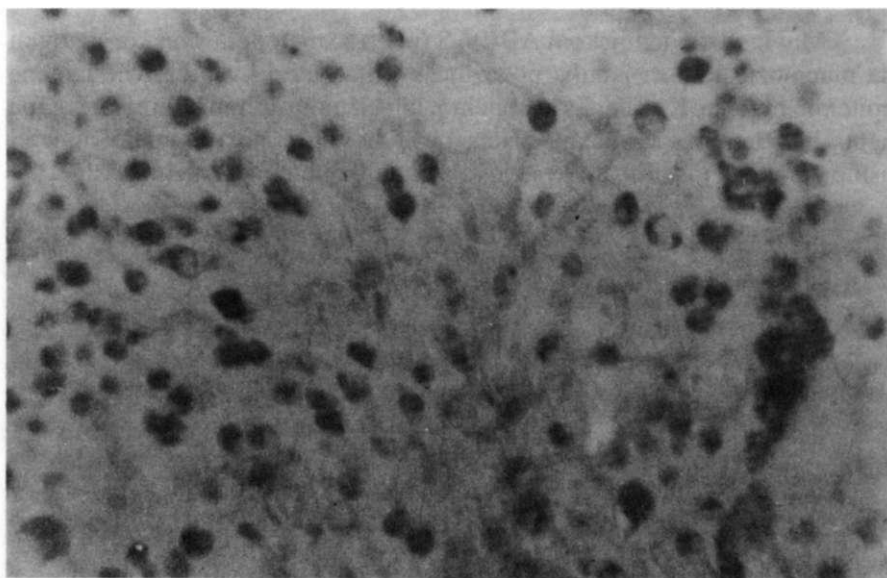
Za razliku od benignih, cistadenokarcinomi sadrže kisele mucine dok slabo diferentovane forme ovih tumora pokazuju asekrekciju mucina ili su pak kiseli mucini oskudni i u vidu intracitoplazmatskih kapi lokalizovani u stratifikovanom epitelu.

Imunocitohemijski rezultati

Ispitujući ekspresiju imunoglobulina G, u tkivu benignih, "borderline" i malignih tumora jajnika, konstatovali smo da su imunocitohemijska distribucija, intenzitet imuno-veoma. /arijabilni. Pri tome je važno istaći da su u svih tumora, bez obzira na biološko ponašanje, imunoglobulini G uvek prisutni u mononukleusnim inflamativnim ćelijama i u makrofagima strome.

U ćelijama normalnog tkiva jajnika, u okolini benignih tumora, ekspresija imunoglobulina

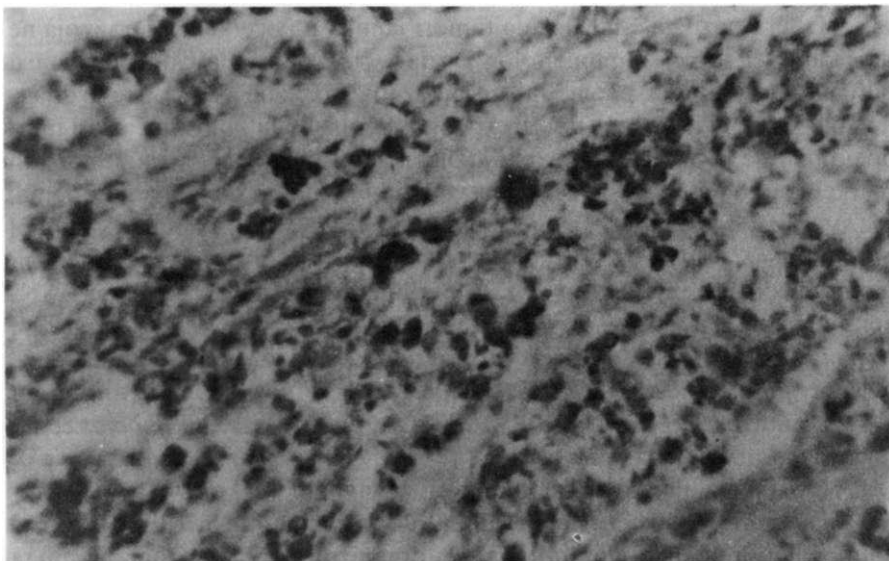
U ćelijama benignih tumora imunoglobulin G nije prisutan, ali je jaka imunocitohemijska aktivnost (+ + +) ovog markera nađena u mononukleusnim zapaljenskim ćelijama i makrofagima tumorske strome (slika 2).



Slika 2. Jaka imunoicakcija IgG-a u makrofagima strome benignih tumora

U "borderline" lezijama retke, pojedinačne tumorske ćelije sadrže imunoglobulin G, pri čemu je imunocitohemijska reakcija negde slabog intenziteta (+), a kad-kad je imunoglobulin G prisutan samo u tragu (\pm).

Upadljiva ekspresija imunoglobulina G (+ + +) je nađena u malignih tumora jajnika, gde je zastupljen izrazit imunocitohemijski polimorfizam i to kako od tumora do tumora, tako i u jednom te istom tumoru. Naime, imunoglobulin G je uvek prisutan u tumorskim ćelijama, od dobro do lose diferentovanih adenokarcinoma, i to kako adenopapilarne, kribriformne, tako i anaplastične grade. Pri tome su tamno-braon do crni depoziti imunoglobulina G nađeni u polimorfnim, hiperhromnim tumorskim ćelijama (slika 3), koje sunekadaumalimgrupamaanekadaformiraju tumorske



Slika 3. Snažna imuno-ekspresija IgG-a u polimorfnim hiperhromnim ćelijama adenokarcinoma jajnika

plaže. Vredna pažnje je i konstatacija da je broj ćelija koje sadrže imunoglobulin G veći u malignih tumora slabije diferencijacije, odnosno najveći broj ćelija koje sadrže imunoglobulin G je prisutan u ovarijalnih karcinoma koji su najmanje diferentovani. Mononukleusne inflamativne ćelije i makrofagi strome i kod mali

Sumirani imunocitohemijski rezultati ekspresije imunoglobulina G u tumorima jajnika su prikazani na tabeli 1.

Tabela 1. Ekspresija imunoglobulina G u ovarijalnim neoplazmama

IgG	Intenzitet ekspresije
Bcnigni tumori	-
Borderline tumori	+ do +
Maligni tumori	+ + +
Mononukleusne zapaljenjske ćelije strome	+ + +
Makrofagi	+ + +

(+ + +) snažna-, (+ +) jaka-, (+) slaba- i (±) u tragu - imunoreakcija

Diskusija

Epitelni ovarijalni tumori, posebno njihove maligne forme, predstavljaju značajan medicinski (u 90%) zastupljeni tumori porekla pokrovnog, odnosno celomskog epitela (Hcrnai, 1990; Herbst, 1994; Shoham, 1994).

Dobro poznata činjenica da tumori jajnika u početku svog razvoja ne daju karakterističnu simptomatologiju i da se zbog toga uglavnom otkrivaju u odmaklom stadijumu, potencira značaj razvoja precizne i sigurne rane dijagnostike koja najviše markera su umnogome doprineli rasvetljenju različitih dijagnostičkih dilema, pre svega u odnosu na histogenezu tumora (*Hanoi*, 1990). Međutim, i pored ogromnih napora istraživača, još uvek nije nađen ni organ-specifičan ni tumor-specifičan marker, pa se zato u kliničkoj praksi često koriste PAN-epitelni markeri u formi "screening" testa (*Droegemueller*, 1994; *Look*, 1994; *Niekerk*, 1997). Danas su najčešće u upotrebi CA125 (za koga se smatra da je najspecifičniji), CK20, CK7, STN-antigen, EGF, PCNA, p53 i dr. (*Anioničet al.*, 1995; *Milosavljević et al.*, 2000, 2001; *Perego et al.*, 1996; *Thomas et al.*, 1995; *Wauters et al.*, 1995).

Kad su u pitanju imunoglobulini uglavnom se koriste IgA (*Milosavljević et al.*, 2000; *Zarcone et al.*, 1994), dok imunoglobulin G, koji je dominantan imunoglobulin u ljudskom organizmu i čija je primarna uloga prepoznavanje tumor-asociranih i tumor-specifičnih determinanti na membrani alterisanih ćelija, još uvek čeka svoje mesto u "screening" testu (*Bast*, 1993; *Stites et al.*, 1989) U nama dostupnoj literaturi se mogu naći saopštenja koja se tiču prisustva i/ili odsustva IgG-a u tumorskom tkivu različitih organa, ali su o distribuciji i imuno-ekspresiji ovog markera u tumorima jajnika, literaturni podaci veoma retki (*Thanimura*, 1995).

U toku našeg ispitivanja imunoglobulin G nije nađen ni u normalnom tkivu jajnika ni u ćelijama benignih tumora. U "borderline" lezijama je prisutan u tragu ili je imunoreakcija slaba, dok je snažna ekspresija imunoglobulina G verifikovana kako u malignim epitelnim neoplazmama, tako i u mononukleusnim zapaljenjima.

Prisustvo snažne imunoreaktivnosti na imunoglobulin G, naročito u srednje i loše diferentovanim karcinomima, se može objasniti na tri načina (*Thakamura et al.*, 1995):

- ili je u pitanju nespecifično vezivanje antitela na IgG za neku strukturu koja daje unakrsnu reakciju sa ovim imunoglobulinom;
- ili su u pitanju depoziti IgG-a koji su u ćeliju dospeli putem receptorne endocitoze. Poznata je činjenica da alterisane ćelije poseduju sposobnost da, posle vezivanja IgG-a za antigen na membrani, receptornom endocitozom u citoplazmu "uvuku" kompleks antigen-antitelo;
- ili je u pitanju novostečena osobina alterisanih ćelija da produkuju imunoglobulin G.

Od ove tri mogućnosti danas su ubedljivije prve dve, dok je za dokaz treće neophodno opsežno istraživanje, u tkivu i u kulturi tkiva, koje bi se odnosilo na prisustvo mRNK za imunoglobulin G u tumorskim ćelijama

(Kutteh et al., 1996). Istovremeno je potrebno isključiti unakrsne reakcije i endocitozu. Ipak, bilo koja da je mogućnost u pitanju, pojava značajne količine IgG-a u tkivu neoplazmi sa lošom prognozom kao i u makrofagima okolne strome, indirektno potvrđuje stav većine autora da je celularni, a ne humoralni tip imunog odgovora, značajniji u antitumorskoj zaštiti (Stites et al, 1989; Tanimura, 1995).

Zaključak

Nasi rezultati koji se tiču prisustva imunoglobulina G u "borderline" lezijama i u malignim tumorima, a njegovog istovremenog odsustva u benignim tumorima i u normalnom tkivu jajnika, sugerišu uvođenje ovog markera u grupu PAN-epitelnih markera za "screening" testove ovarijalnih neoplazmi.

Literatura

[^] Anionić, J. and Rakar, S. (1995). Colour and pulse Doppler US and tumor marker CA 125 in differentiation between benign and malignant ovarian masses. *Anticancer Res.*, 75, 1527-1532.

ⁱ Bast, R. (1993). Perspectives on the future of cancer markers. *Clin. Chem.*, 39, 2444-2451

Berchuck, A. (1995). Biomarkers in the ovary. *J. Cell Biochem.*, 23, 223-226.

Droegemueller, W. (1994). Screening for ovarian carcinoma: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170, 1095-1098.

Hanai, A. (1990). Trends and differentials in ovarian cancer: incidence, mortality and survival experience. *APMIS*, 72, 1-20.

Herbst, A. L. (1994). The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 770, 1099-1105.

Keller, T., Morley, T. W. and Graziano, R. F. (1995). Bispecific antibody (MDX-210) targeting of tumor cell to monocytes via the Fc receptor type I promotes antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and induction of specific cytokines. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 36, A2892-A2892.

ⁱ Kutteh, W.H., Miller, D.S and Mathis, J.M. (1996). Immunologic characterization of tumor markers in human ovarian cancer cell lines. *J. soc. Gynecol, Investig.*, 4, 216-222.

Look, K. Y. (1994). Evaluation of screening for epithelial ovarian carcinoma: the quest for early diagnosis. *Semin. Surg. Oncol*, 10, 261-267.

\ • Milosavljević, Z., Jančić, S., Jančić, St. and Katie, V. (2001). Expression and distribution of Sialyl-Tn - antigen (STN) in mucinous and serous ovarian tumors. *Archive of Oncol*, 9, 31-32.

Milosavljević, Z., Jančić, S., Jančić, St. and Katie, V. (2000). Distribution of IgA marker in benign, borderline and malignant serous and mucinous ovarian tumors. *Pathology International*, 5, 17-18.

Niekerk, C. C., Vooijs, P. and Poels, L. G. (1997). Differentiation margins of ovarian tumor pathology: first incidences of epithelial ovarian tumors monitored by marker antibodies. *Cancer Detect. Prev.*, 21, 247-257.

Perego, P., Giarola, M. and Righetti, R. C. (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell system. *Cancer Res.*, 56, 556-562.

Schauenstein, E., Lahausen, M., Weblacher, M. et al. (1996). Selective decrease in serum immunoglobuline G1. A tissue nonspecific tumor marker detecting early stages of gynecologic malignant disease with high efficiency. *Cancer*, 78,511-516.

Shoham, Z. (1994) Epidemiology, ethiology and fertility drugs in ovarian epithelial carcinoma: where are we today? *Fertil. Steril.*, 62, 433-448.

Stites, D., Sobo, J. and Wells, J. V. (1998). Osnovna i klinička imunologija. Savremena administracija. Beograd.

Thomas, H., Nasim, M. M. and Sarraf, C. E. (1995). Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining - a pronostic factor in ovarian cancer? *Br. J. Cancer*, 71, 357-362.

Thanimura, T. (1995). Studies on tissue-localization of various tumor markers in ovarian tumours by immunoperoxidase method. *Nippon Sanka Fujinika Gakkai Zasshi*, 37, 2344-2352.

Wauters, C. C., Smedts, F., Gerrits, L. G. et al. (1995). Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. *Hum. Pathol.*, 26,852-858.

Zarcone, R., Candido, R., Cardone, G. et al. (1994). Ovarian neoplasms and tumor markers. *Minerva Ginecol.*, 46, 531-533.

EXPRESSION IMMUNOCYTO-CHIMIQUE DTMMUNOGLOBULINE G (IgG) DANS LES TUMEURS EPITHELIENNES DES OVAIRES

Miodrag RADOVIĆ, Zoran POP-TRAJKOVIĆ, Slaviša JANČIĆ,
Zoran MILOSAVLJEVIĆ, Katarina KATIĆ et Snežana JANČIĆ

*Clinique gynecologique et d'accouchement, Clinique pour l'oncologie,
Institut pour la pathologic du Centre clinique de Niš et Institut pour la pathologie
de la Faculte de Medecine de Kragujevac*

Vu que les etudes sur la distribution d'immunoglobuline G qui sont rares dans le tissu normal at aussi dans le tissu de tumeur chez les ovaires, le but de notre travail est d'examiner l'immuno-expression IgG chez les benignes, "bordereline" et malignes tumeurs des ovaries.

On a utilise le materiel operatoire qui, apres la fixation dans le formaldehide de 10 pour cent, est traite de routine et modele dans le parafine. Sur les intersections de l'epaisseur de 5 micrometres on a applique la methode H&E de routine pour le diagnostic pathohistologique des tumeurs, mucinohistochimique AB-PAS (pH 2,5) methode pour la verification des tumeurs mucoides des ovaries et immunocytochimique et technique SAD avec anti-IgG anticorps (1:1800).

Chez les tumeurs benignes on n'a pas verifie IgG cellules immunoreactives de faible intensite et IgG etait souvent present seulement dans les traces. L'expression intensive IgG est trouve dans les cellules polymorphes et hyperchromes de l'adenocarcinome et les depotes de ce marqueur sont d'un maniere frappante exposes chez les tumeurs malignes de la faible differenciation. Les inflammables cellules mononucleoses et les macrophages des stromas que benignes aussi des tumeurs malignes montrent une immunoreaction intensive sur IgG.

Les auteurs disentent sur le role antitumeur de IgG immunite et ils suggerent l'introduction de l'immunoglobuline G dans la famille de PAN marqueurs pour "screening" de l'analyse des tumeurs des ovaries.

Les mots ties: Tumeurs epithelienne des ovaries, immunocytochimie, marqueurs de tumeurs, immunoglobuline G

IMMUNOCYTOCHEMICAL EXPRESSION OF IMMUNOGLOBULIN G (IgG) IN THE EPITHELIUM TUMORS OF THE OVARIES

Miodrag RADOVIĆ, Zoran POP-TRAJKOVIĆ, Slaviša JANČIĆ,
Zoran MILOSAVLJEVIĆ, Katarina KATIĆ and Snežana JANČIĆ

*Gynecological and Obstetric Clinic, Clinic for Oncology,
Institute for Pathology of the Clinic Center, Niš and
the Institute for Pathology of the Faculty of Medicine, Kragujevac*

Regarding scarce studies about the G immunoglobulin distribution both in the normal and in the tumor tissue of the ovary, the aim of the paper is to examine immuno-exspression of the IgG in benign, "borderline" and malign ovary tumors.

The operative material that was first being fixed in 10% formaldehyde, treated in the routine way and molded in paraffin was used. The method that were applied upon the sections of 5 micrometers in thickness were the routine H&E method for pathohistological tumor diagnostis, the mucinohistochemical AB-PAS (pH 2,5) method for verification of mucinous tumors of the ovary and the immunocytochemical SAB technique with anti-IgG antibodies (1:800).

No IgG-immunoreactive cells were verified in benign cells while in the "borderline" lesions rare and individual tumor cells contain the IgG but their immunoreactivity is of poor intensity; sometimes the IgG was only present in slight traces. The intensive IgG expression was found in polymorphous, hyperchromium cells of adenocarcinoma; in these cases, the deposits of this marker were conspicuously prominent in malign tumors of poorer differentiation. Mononucleous inflammatory cells and macrophages of the stroma of both benign and malign cells also show intensive immunoreaction to the IgG.

The authors discuss anti-tumor role of the IgG in immunity and they suggest that the immunoglobulin G should also be introduced into the PAN marker family for "screening" ovary tumor analyses.

Key words: Epithelium ovary tumors, immunocytochemistry, tumor markers, immunoglobulin G

Autor: Prof, dr sci Miodrag Radović, ginekolog - akušer, Ginekološko - akušerska klinika Kliničkog centra u Nišu, kućna adresa: Niš, Bulevar Nemanjića 74/13

(Rad je Uredništvo primilo 31. januara 2002. godine)