

PROUČAVANJE PROMENA U JAJNICIMA KOD PACOVA SA KARCINOMOM DOJKE

Milena Ilić¹, Maja Zečević², Nina Jančić³, Nataša Djindjić³, Ivan Rančić³, Dalibor Jovanović¹, Tomislav Jovanović⁴

Cilj ovog rada bio je proučavanje promena u jajnicima kod pacova sa karcinomom dojke izazvanim dimetilbenz(a)antracen (DMBA). Za istraživanje su korišćeni ženski, nepareni, beli Wistar pacovi (ukupno 35, starosti 35-37 dana, telesne mase 120-140gr), koji su bili podeljeni u kontrolnu (ukupno 10) i eksperimentalnu grupu (ukupno 25). Anesteziranim životinjama eksperimentalne grupe implantirano je 2 mg mešavine (1mg DMBA i 1mg holesterolskog pufera) u petu levu mlečnu žlezdu. Životinje su žrtvovane nakon 90 dana od implantacije, nakon čega su ispitivani jajnici i mlečne žlezde. Karcinomi mlečne žlezde (in situ i/ili invazivni) su patohistološki bili verifikovani kod 19 eksperimentalnih životinja. Urađena su histološka, histochemijska i imunohistochemijska istraživanja na jajnicima. Upotrebljavana su antitela na citokeratine AE1/AE3 i PCNA.

Pored neneoplastičnih promena, kao što je smanjenje veličine jajnika, redukcija brzine folikularnog razvoja i formacija žutog tela, pronađene su i sledeće preneoplastične promene: papilomatozna hiperplazija epitela, inkluzione ciste, mikroglandularne formacije sa displazijom i seromucinozne mikrociste. U epitelu glandolikih struktura, folikularnih i inkluzionih cisti prisutna je intenzivna, difuzna ekspresija PCNA.

DMBA je pluripotentan karcinogen sposoban da izazove širok spektar preneoplastičnih lezija u jajnicima, ali je prisutna dilema da li su opisane promene posledica direktnog dejstva DMBA ili hormonske aktivnosti indukovanih karcinoma dojke ili su, pak, u pitanju oba faktora. *Acta Medica Medianae* 2013;52(1):25-32.

Ključne reči: pacovi, mlečna žlezda, jajnici, karcinom, DMBA

Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Kragujevac, Srbija¹
Klinika za dečiju hirurgiju i ortopediju, Klinički centar Niš, Srbija²
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Niš, Srbija³
Univerzitet u Beogradu, Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija⁴

Contact: Milena Ilić
Institut za patologiju, Fakultet medicinskih nauka
Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Srbija
E-mail: lena.ilic@gmail.com

Uvod

Karcinom jajnika je prvi među uzrocima smrti od svih malignih tumora ženskog genitalnog trakta, a četvrti je vodeći uzrok smrti od karcinoma kod žena. Bez obzira na širok spektar moćnih dijagnostičkih tehnika kojima raspolaže savremena medicina (transvaginalni dopler, kompjuterizovana tomografija, 3D-ultrazvuk, magnetna rezonanca, tumorski markeri), procenat karcinoma jajnika otkrivenih u ranom stadijumu je nizak. Razlog za visok mortalitet je da se skoro 70% ovarijalnih karcinoma dijagnostikuje u kasnom

stadijumu, kada se bolest raširila van male karlice, odnosno tek nakon nastanka peritonealnih metastaza i pratećeg ascitesa (1,2,3).

Nedovoljno poznata etiopatogeneza bolesti i činjenica da karcinom jajnika, u poređenju sa drugim ginekološkim tumorima, još uvek nema jasno definisanu preneoplastičnu leziju, u velikoj su meri odgovorni za visok mortalitet i za kasno otkriće ovih tumora (3,4). U prilog ovome govore i saopštenja Wong-a i Auersperg-a (2003) o preživljavanju blizu 90% žena, bez izmene trenutnih terapijskih pristupa, ukoliko se karcinom jajnika dijagnostikuje u ranom stadijumu (stage I)-(5).

Izveštaji iz literature o simultanoj pojavi karcinoma dojke i karcinoma jajnika ukazuju da ova dva tumora imaju međuzavisne faktore rizika i da žene sa povećanim rizikom za jedan od ovih tumora istovremeno imaju povećan rizik i za drugi (6,7,8).

Cilj našeg rada bio je ispitivanje promena u jajnicima pacova sa karcinomom mlečne žlezde. Za istraživanje smo koristili dobro poznat i uspešan model indukcije karcinoma mlečne žlezde 7.12 dimetilbenz(a)antracenom (DMBA) (9.13).

Materijal i metode

Životinje

Istraživanje je sprovedeno na ženskim, neparenim, belim Wistar pačovima, težine 120 ± 10 g, starosti 35-37 dana. Životinje su čuvane u kontrolisanim uslovima laboratorijske štale (12h svetlost/12h tama, na temperaturi od $22 \pm 2^\circ\text{C}$). Životinje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom za pacove i pile česmenu vodu "ad libitum". Sve procedure na životinjama pratile su Uputstva za rad sa eksperimentalnim životinjama i odobrene od strane Etičkog komiteta Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu.

Eksperimentalni protokol

Pacovi su bili podeljeni u dve grupe: kontrolnu grupu i eksperimentalnu grupu. Deset životinja iz kontrolne grupe nisu bile podvrgnute tretmanu. U eksperimentalnoj grupi bilo je dvadeset pet životinja. Životinjama eksperimentalne grupe je u etar narkozi urađena incizija u predelu ingvinuma i u petu levu mlečnu žlezdu implantirana je smeša karcinogena tipa 9,10dimetil-1,2 benz(a)-antracen-a (DMBA) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) i holesterol pufera. Količina implantirane mešavine za svakog pacova bila je 2mg (1 mg DMBA i 1 mg holesterolskog pufera). Nakon implantacije, incizija je zatvarana hirurškim šavom.

Nakon 90 dana, sve životinje su žrtvovane, posle čega su im izvađene pete mlečne žlezde i oba jajnika. Zatim je vršena makroskopska analiza i merenje promera izvađenih mlečnih žlezda i jajnika. Mlečne žlezde i jajnici fiksirani su u rastvoru Bouin-a u trajanju od 24 časa, a zatim je kompletan materijal rutinski obrađivan i ukalupljen u parafin.

Mikromorfološka ispitivanja

Parafinski isečci mlečnih žlezda i jajnika, debljine $4\mu\text{m}$, deparafinisani su, rehidrirani i bojeni rutinskom hematoksilinom i eozinom (H&E) metodom za patohistološku verifikaciju neneoplastičnih, preneoplastičnih i neoplastičnih promena.

Za imunohistohemijsko ispitivanje korišćena je Avidin Biotin Peroksidaza kompleksna (ABC) metoda (Vectastain ABC-Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA), sa antitelima na citokeratine AE1/AE3 (1:400; Dako, Japan, Kyoto, Japan) i PCNA (1:800; Dako, Japan, Kyoto Japan).

Rezultati

Makroskopska analiza

Mlečna žlezda

Mlečne žlezde životinja iz kontrolne grupe bile su približno jednakih dimenzija, 0.3-0.5cm

prečnika, beličasto-žute boje, staklastog izgleda i čvrste konzistencije.

U 19/25 životinja (76%) iz eksperimentalne grupe nađen je palpatorni tumor u petoj levoj mlečnoj žlezdi, ovalnog oblika, srednje čvrste konzistencije, slabije pokretan, fiksiran za kožu, dimenzija od 1,2- 1,7cm.

Kod 6 životinja iz eksperimentalne grupe bile su uvećane mlečne žlezde, 0.7-1cm, jasno odvojene od okolnog tkiva i veoma čvrste konzistencije. One su bile prekrivene makroskopski nepromenjenom kožom.

Jajnici

Jajnici životinja kontrolne grupe su glatke površine, čvrste konzistencije, tanke kapsule. Jajnici kod 19 životinja eksperimentalne grupe, kod kojih je nađen palpatorni tumor mlečne žlezde, lako su povećani, čvrste konzistencije, delom mikrocistične a delom solidne građe.

Nismo ispitivali jajnike eksperimentalnih životinja (6/25) koje nisu razvile palpatorni tumor mlečne žlezde.

Mikromorfološka analiza

Mikroskopska analiza mlečnih žlezda i jajnika životinja iz kontrolne grupe nisu pokazale patološke promene.

Mlečne žlezde

Mikromorfološkim ispitivanjem mlečnih žlezda životinja iz eksperimentalne grupe zapažen je spektar hiperplastično-displastičnih promena na nivou duktulusa, duktusa i acinusa, do slike adenomatoze. Upadljiva hiperplazija manjih duktusa i duktulusa bila je praćena hiperhromazijom jedara. Hiperplastični acinusi su se često prezentovali u vidu epiteliioze. Kod nekih životinja hiperplazija lobulusa i duktulusa je bila izraženija i davala je sliku mikroadenoma. Navedene promene su u rutinskoj histopatologiji označene nazivom "fibrocistična bolest" i prisutne su kod svih eksperimentalnih životinja.

Adenokarcinomi mlečne žlezde (*in situ* i/ili invazivni) bili su patohistološki verifikovani kod 19/25 eksperimentalnih životinja (76%). Najčešća histopatološki dijagnostikovana neoplazma mlečne žlezde je intraduktalni karcinom, koji je nađen kod 52,6% (10/19) životinja. Drugi po učestalosti, sa 36,8%, (7/19) je duktalni invazivni karcinom. U mlečnoj žlezdi jedne životinje je (1/19) je nađen lobularni "in situ" karcinom. Lobularni invazivni karcinom (sl.1) je takođe dijagnostikovao kod jedne (1/19) eksperimentalne životinje.

Jajnici

U jajnicima životinja iz eksperimentalne grupe, kod kojih je patohistološki potvrđen „in situ“ ili invazivni karcinom mlečne žlezde (19/25) mikroskopska građa je delimično očuvana.

Zapažaju se mali primordijalni i primarni folikuli, potom srednji i veliki. Mali primordijalni i primarni folikuli se teško zapažaju na klasično obojenim preparatima. Sadrže oocite okružene prstenastim slojem ćelija. Primordijalni i primarni folikuli su nešto gušći u dubljim delovima ovarijuma. Identične građe, ali većih dimenzija, jasno se uočava srednji tip folikula. U superficijalnom delu kore dominantni su veliki folikuli sa razvijenim oocitima, okruženi folikularnom tečnošću (cumulus oophorus).

Granuloznoćelijski sloj koji pokriva folikule je zadebljan, tj. stratifikovan. Ćelije su kubo-idealnog izgleda sa hiperhromnim jedrima i povećanim mitotskim indeksom. Atrelični folikuli su bez folikularne tečnosti i sa apoptotičnim ćelijama u granuloznom sloju, a često i u samom lumenu folikula.

Prisutna žuta tela su različite starosti. Novostvorena žuta tela su bazofilne boje sa hiperhromnim jedrima i povećanim mitotskim indeksom. Atrelična žuta tela inaju vakuolizovane citoplazme i početne fibroze u centralnim područjima.

Preneoplastične promene

Preneoplastične promene su prisutne na površinom epitelu jajnika (ovarian surface epithelium - OSE), ali i u kori. U OSE je multifokalno nađena mikropapilomatoza, klasičnog i invertnog tipa, sa displazijom lakog stepena (sl.2). Epitelne invaginacije su takođe prisutne (sl. 3).

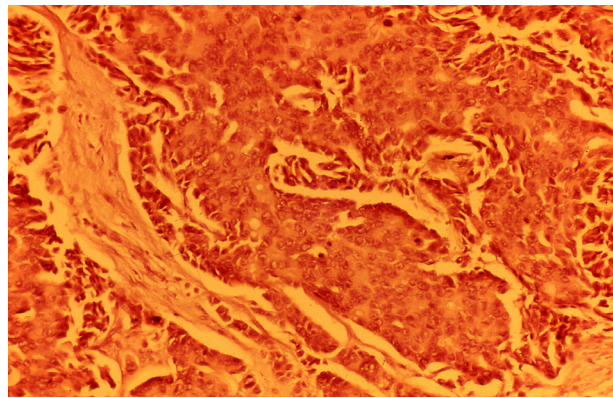
U kori su rasejane žlezdane formacije sa upadljivim histološkim atipizmom: zgusnute, nepravilnog rasporeda, sa malim lumenom. Pokrivene su displastičnim, stratifikovanim epitelom uz poremećaj polariteta jedara, koja ponekad dosežu luminalnu ivicu. U većem broju žlezda prisutna je papilomatoza epitela, takođe displastičnog tipa (sl.4).

Folikularne ciste su brojne, sa velikim lumenom, pokrivene granuloznim ćelijama koje su bazalno luteinizovane. Subepitelno se u kori ovarijuma nalaze seromucinozne i inkluzione ciste malih dimenzija, pokrivene jednoređnim niskokubičnim epitelom.

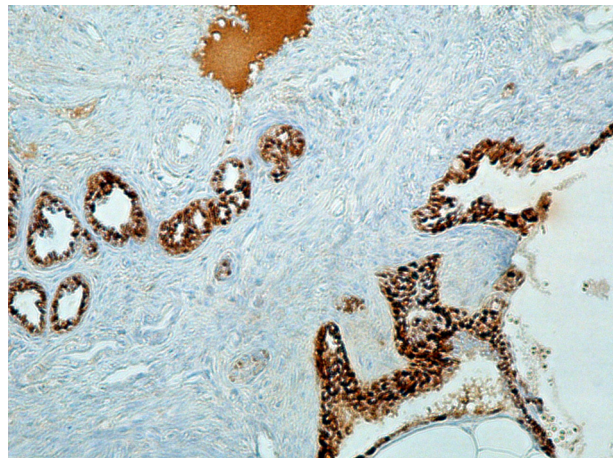
Imunohistohemija

Intenzivna difuzna ekspresija PCNA prisutna je u oocitima i granuloznim ćelijama folikula. Zahvaljući intenzivnoj ekspresiji oocita, primordijalni folikuli se bolje zapažaju. Identična ekspresija PCNA nađena je i u novostvorenim žutim telima, epitelu adenomatoidnih struktura (sl.4), folikularnih i inkluzionih cisti. Slaba ekspresija PCNA nađena je u atreličnim folikulima i u atreličnom žutom telu.

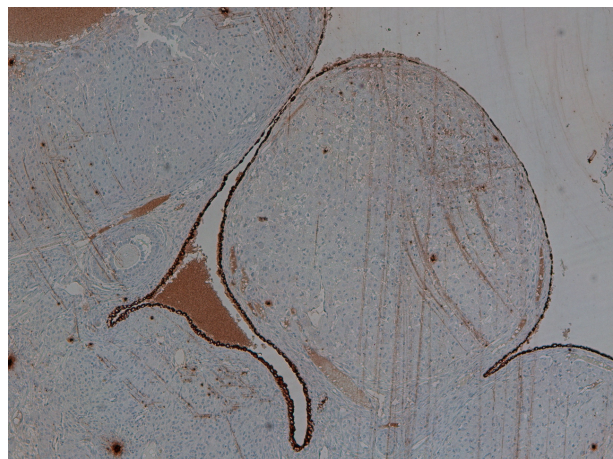
Imunohistohemijska ekspresija cytokeratina AE1/AE3 je intenzivna i prisutna u svim opisanim prekanceroznim lezijama, sem u folikularnim cistama. Reakcija je negativna i u granuloznom sloju folikula.



Slika 1. Invazivni lobularni karcinom mlečne žlezde (HE X400)



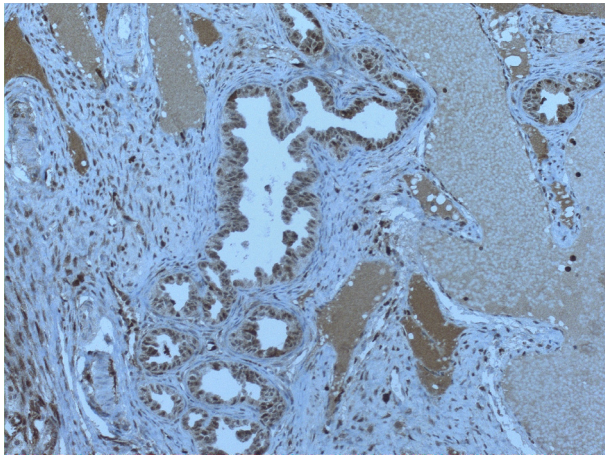
Slika.2.Intenzivna ekspresija citokeratina u površnom epitelu jajnika i u papilomatozi klasičnog i invertnog tipa (ABC X 400)



Slika.3. Ekspresija citokeratina u dubokim epitelnim invaginacijama (ABC X 400)

Diskusija

Model karcinoma dojke izazvan DMBA-om pokazao se kao koristan eksperimentalni sistem za proučavanje patogeneze i bioloških osobina tumora (9-14). U našem istraživanju smo koristili ovaj model za ispitivanje ranih preneoplastičnih lezija u jajnicima pacova tokom karcinogeneze mlečne žlezde.



Slika 4. Intenzivna ekspresija PCNA u stratifikovanom epitelu adenomatoidnih formacija (ABC X 300)

Posle 90 dana od implantacije DMBA kod svih eksperimentalnih životinja su patohistološki verifikovane hiperplastične, displastične, cistične i metaplastično-skvamozne promene duktusa i acinusa, lezije koje su često saopštavane (9,11,12,15) i koje su u humanoj patologiji obuhvaćene terminom „fibrocistična bolest“ dojke (2,15).

DMBA-indukovani karcinomi nađeni su kod 76% (19/25) naših eksperimentalnih životinja. Najučestaliji je intraduktalni karcinom (52,6%), zatim duktalni invazivni karcinom (36,8%). Lobularni karcinom „in situ“ i invazivni lobularni karcinom nađeni su u po jednoj životinji. Lobularni karcinomi, koji su inače i kod žena upadljivo ređi od duktalnih, u DMBA-indukovanoj karcinogenezi kod pacova samo su sporadično saopštavani (10) Različita incidenca DMBA-indukovanih karcinoma u literaturi se može objasniti različitim dizajnom studije. Ističe se da broj indukovanih tumora zavisi od vrste karcinogena, doze, načina aplikacije, mesta aplikacije, vrste, soja i od starosti eksperimentalnih životinja (9,13-16).

Istraživanja Ohi-a and Yoshida-e (1992) i Thompson-a sa sar. (1998), koja su pokazala da je incidenca karcinoma dojke značajno niska u ovariektomisanih pacova, sugerišu da ovariektomija verovatno inhibiše neki korak u procesu karcinogeneze i da na inicijaciju i promociju hemijske karcinogeneze mlečne žlezde mogu da utiču i hormonski faktori (17,18). Kod žena je klasifikacija karcinoma dojke zasnovana na hormonalnoj zavisnosti, koristi prilikom odlučivanja o terapiji koju će bolesnica dobiti, a takođe ima i prognostički značaj (18,19). Smatra se da je hemijski indukovana karcinogeneza dojke dobar model za proučavanje ovog aspekta bolesti ljudi, ali se istovremeno opominje da je proporcija hormon zavisnih karcinoma kod pacova veća nego kod ljudi (18,21).

Uzrok nastanka karcinoma jajnika je nepoznat, ali većina epidemioloških studija pokazuju da sterilitet, karcinom jajnika u porodici, karcinom dojke i endometrijuma u anamnezi

povećavaju rizik za nastanak malignih epitelnih tumora jajnika (22,23). Razumevanje patogeneze malignih tumora jajnika je otežano zbog nedostatka dovoljnog broja uzoraka u ranom stadijumu bolesti i česte dijagnoze uznapredovalog stadijuma tumora. Postojanje prekursorsnih lezija koje se mogu identifikovati i koje evoluiraju u karcinom jajnika još uvek je predmet mnogih debata u literaturi (6, 22-25).

Prvi kliničko-patološki opisi prekursorsnih lezija u jajniku potiču od Gusberg-a i Deligdisch-a (1984), koji su ispitivali makroskopski (naizgled) normalne jajnike koji su profilaktički uklonjeni iz identičnih sestara bliznakinja, bolesnica sa invazivnim karcinomom jajnika (26). Površne papile, inkluzione ciste, nuklearni polimorfizam ili stratifikacija površnog i invaginiranog epitela su, u profilaktički odstranjenim jajnicima, opisane i od strane drugih autora (5, 17).

Patohistološkom analizom jajnika životinja sa DMBA-indukovanim karcinomima dojke, dijagnostikovali smo folikularne multipne mikrociste, papilarnu hiperplaziju (klasičnu i invertnu) i invaginaciju OSE-a, inkluzione ciste, adenomatoidne strukture sa papilomatoznom hiperplazijom epitela i displazijom. Sve identifikovane hiperplastične lezije su dobro ograničene, sa niskim mitotskim indeksom i nijedna od njih nije invazivna. Ove karakteristike ih dobro razlikuju od graničnih tumora jajnika. U brojnim studijama ističe se da ove promene u jajnicima predstavljaju prekursore karcinoma (4,5,27-29).

Ciste se u jajniku, u eksperimentalnim uslovima, osim DMBA-om mogu indukovati i N-methyl-N-nitrosourea-om (MNU), hormonima poput androgena ili hipotalamičnim lezijama (18,27,29).

Policistični ovarijalni sindrom (PCOS) je najčešći endokrini poremećaj kod žena. Karakteriše se prisustvom uvećanih jajnika sa multipnim cistama i hipervaskularizovanom androgen-sekretujućom stromom. Sindrom je povezan sa znacima hiperandrogenizma (hirsutizam, alopecija, akne), poremećajima menstrualnog ciklusa (oligomenoreja ili amenoreja) i gojaznošću (3). Endokrinološki se karakteriše visokim nivoima serumskog LH i testosterona (31). Na jajnik utiču i spoljašnji faktori, naročito gonadotropini, insulin i drugi faktori rasta, koji zavise i od genetskih i od uticaja okoline (32,33).

Otprilike 20% žena u reproduktivnom dobu ima policistične jajnike (30). Kod žena sa PCOS postoji dugoročni rizik za endometrijalnu hiperplaziju i karcinom endometrijuma zbog hronične anovulacije (34). Takođe, može postojati povećan rizik i za karcinom dojke. Gojaznost, hiperandrogenizam i infertilitet su česti kod PCOS-a i to su istovremeno i faktori rizika za karcinom dojke (34). Međutim, studije koje su ispitivale vezu između PCOS-a i karcinoma dojke nisu uvek identifikovale signifikantno povišen rizik. Relativni rizik od 3,6 nađen je samo kod žena u postmenopausalnom periodu (35). Postoje dugoročni rizici za razvoj dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti za PCOS bolesnike (34,36). Kad je u

pitanju veza PCOS-a i karcinoma jajnika, rezultati malobrojnih studija su protivurečni. Dok je jedna grupa autora isključuje takvu mogućnost (34), drugi ističu da PCOS nosi relativni rizik od 2,5 za epitelni ovarijalni karcinom (38).

U jajnicima naših eksperimentalnih životinja patohistološki smo dijagnostikovali i brojne inkluzione ciste. Iako je odavno poznato da je prisustvo inkluzionih cisti kod starijih žena uobičajena pojava (39), kontradiktornosti koje se tiču toga da li su one preneoplastična lezija još uvek su prisutne u literaturi. Okamura i Katabuchi (2001) sugerišu da se broj inkluzionih cisti povećava u jajnicima bolesnica sa kontralateralnim karcinomom jajnika, ili sa porodičnom istorijom karcinoma jajnika u poređenju sa zdravim (40), ali Baracat i sar. (2000) ispitujući profilaktički uklonjene jajnike nosioca BRCA 1 mutacija, u poređenju sa zdravim, nisu našli značajnu razliku (41). Međutim, većina istraživača se slaže da su inkluzione ciste prekursor ovarijalnih adenokarcinoma (1,4,16,26,28,42). Smatra se da se inkluzione ciste formiraju iz multipnih invaginacija epitela jajnika (1,42-44).

U jajnicima životinja sa DMBA-indukovanim karcinomom našli smo mikropapilomatozu (klasičnu i invertnu), sa displazijom lakog stepena i invaginaciju OSE-a. Visoku frekvencu hiperplastičnih i metaplastičnih promena u površnom epitelu u jajnicima sa kontralateralim ovarijalnim tumorima (92%), endometrijalnim adenokarcinomima (76%) i policističnom bolešću jajnika (68%) saopštili su Resta i sar. (1993), uz sugestiju da se hiperplastične i metaplastične promene površnog epitela mogu smatrati prekursorima epitelnih tumora jajnika (44). Druge ranije studije koje su koristile svetlosnu mikroskopiju i citometriju pokazale su celularnu i nuklearnu atipiju u ne neoplastičnom OSE u blizini primarnih ovarijalnih tumora (46).

OSE okružuje, štiti jajnik i važan je za održavanje njegove strukture. Međutim, OSE je odgovoran za transport nutrijenata i postovulatornu reparaciju rana. Uprkos što obavlja važne endokrine i reproduktivne funkcije OSE obezbeđuje progenitor ćelije za 85-90% humanih ovarijalnih karcinoma. OSE ćelije pokrivaju stromu i u bliskom su kontaktu sa hormonima koje luči jajnik (3,25,47). U kulturi tkiva davno je pokazano da su normalne OSE ćelije visoko osetljive na signale iz okoline i imaju tendenciju da se tokom vremena podvrgnu epitelno-mezenhimnoj konverziji (48,49).

Adenomatoidne strukture koje smo verifikovali u jajnicima naših eksperimentalnih životinja retko su saopštavane u literaturi (24,50). Umnožene atipične žlezdane strukture sa papilomatozom i displazijom koje odgovaraju displastičnim papilarnim adenomima jajnika kod žena nisu opisane od strane drugih autora. U našim rezultatima su kod 36,8% (7/19) životinja nađene ove preneoplastične lezije. Njihova histogeneza je nepoznata, ali smatramo da su one u direktnoj vezi sa nastajanjem inkluzionih

cisti. U prilog ovom mišljenju govori identična topografija inkluzionih cisti i adenomatoidnih proliferacija, kao i njihova mikroglandularna građa. Intenzivna ekspresija PCNA govori o malignom potencijalu adenomatoidnih struktura, a pozitivno bojenje na citokeratine definiše njihovo epitelno poreklo.

Kad je u pitanju etiopatogeneza karcinoma jajnika, od brojnih hipoteza ponuđenih u literaturi, čini se da, ipak, ima najviše pristalica (25,47-50) ona koju su ponudili Cramer i Welch (1983). Oni pretpostavljaju da je prvi korak karcinogeneze invaginacija pokrovnog epitela jajnika u ovarijalnu stromu. Drugi korak je diferencijacija, proliferacija i možda maligna alteracija uključene epitela, stimulisana gonadotropinima i estrogenima (51). Međutim, stimulus za malignu transformaciju ostaje neidentifikovan.

Dobro je poznato da poremećaj sekrecije gonadotropina i stimulacija strome mogu nastati kao posledica poremećenog normalnog feedback mehanizma između jajnika i hipofize (17,18,21,29,30). Poremećaje hipofizno-gonadalne osovine mogu izazvati hamioterapeutici i radijacija (54,53), ali i brojne citotoksične materije koje ili direktno deluju na stimulaciju sekrecije hipofize ili povećavaju degradaciju estrogena u jetri (51-54).

DMBA je potentan karcinogen za koga je dokazano da sigurno izaziva karcinome kože, mlečne žlezde, jajnika i želuca kod eksperimentalnih životinja (11-14, 55-59). Smatra se, da DMBA kroz formaciju DNA adukta, indukuje početne tačkaste mutacije koje menjaju ekspresiju i/ili aktivnost velikog broja onkogenih i tumor supresornih gena (24).

Relevantnost modela DMBA-indukovane karcinogeneze podržava nalaz specifične mutacije u p53 tumor supresornim genima, u DMBA-izazvanim ovarijalnim tumorima, koje su inače među najčešćim mutacijama u humanim tumorima jajnika (24,42,57). Međutim, sugerise se opreznost, prilikom odabira životinja za eksperiment sa obzirom na razlike između pacova i primata. Najupadljivije razlike su relativno odsustvo juvenilnog hijatusa sekrecije gonadotropina (FSH i LH) kod pacova, koji je karakteristika primata. Takođe je važno imati na umu da prva ovulacija kod laboratorijskih pacova nastaje 35-45 dana posle rođenja (60).

Zaključak

U jajnicima eksperimentalnih životinja su histopatološki identifikovane lezije, koje su u humanoj patohistologiji sa sigurnošću označene kao prekancerozne. Međutim, prisutna je dilema da li su opisane promene posledica direktnog dejstva DMBA ili hormonske aktivnosti indukovanih karcinoma dojke ili su, pak, u pitanju oba faktora. Potrebna su dalja istraživanja, uz sukcesivno praćenje eksperimentalnih životinja, ne bi li se saznali mehanizmi koji omogućuju transformacije prekanceroznih lezija u ovarijalni karcinom.

Literatura

1. Burdette JE, Oliver RM, Ulyanov V, Kilen SM, Mayo KE, Woodruff TK. Ovarian epithelial inclusion cysts in chronically superovulated CD1 and Smad2 dominant-negative mice. *Endocrinology* 2007; 148(8): 3595-604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL. Cancer of the breast. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, editors. *Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2004. p. 2369- 97.
3. Brewer MA, Johnson K, Follen M, Gershenson D, Bast R Jr. Prevention of ovarian cancer: intra epithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1):20-30. [[PubMed](#)]
4. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 2001; 38(2):87-95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wong AS, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vollebergh MA, Jonkers J, Linn SC. Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(2):223-45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Milly M, Zavodna K, Weismanova E, Gregorova J, Mlkva I, Ilencikova D, et al. Comprehensive genetic characterization of hereditary breast/ovarian cancer families from Slovakia. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126(1):119-30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, Ponder BA, Easton DF. Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol* 2000; 18(2):173-90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Huggins CB, Grand LC, Brillantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature (London)* 1961; 189:204-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Jančić S. Mammary gland changes induced by carbohydrogene type 9,10-dimethyl -1,2-enz(α) anthracene (DMBA) and hypofunction of thyroid gland. (PhD thesis). Serbia: Faculty of Medicine, University of Niš; 1990.
11. Russo IH, Russo J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61(6):1439-49. [[PubMed](#)]
12. Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 1987; 57(2): 112-37. [[PubMed](#)]
13. Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumours of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000; 5(2):187-200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Padmavathi R, Senthilnathan P, Chodon D, Sakthisekaran D. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Life Sci* 2006; 78(24):2820-5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Joksimović I, Bojanić V, Jančić S, Bojanić Z, Živanov-Čurlis J, Perić S, et al. Precancerous morphologic and functional aberrations in the rat mammary glands carcinogenesis. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28 Spec No:162-7. [[PubMed](#)]
16. Costa I, Solans M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12dimethylbenz (alpha) anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(8): 915-27. [[PubMed](#)]
17. Ohi Y, Yoshida H. Influence of estrogen and progesterone on the induction of mammary carcinomas by 7,12-dimethylbenz (a)anthracene in ovariectomized rats. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992; 62(6):365-70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Thompson HJ, McGinley J, Rothhammer K, Singh M. Ovarian hormone dependence of pre-malignant and malignant mammary gland lesions induced in pre-pubertal rats by 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis* 1998; 19(3):383-6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gao JD, Zhang BN, Wang X, Wang J, Bi XF. Clinicopathological characteristics and prognosis of patients with breast cancer over 65 years of age. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009; 89(2):83-6. [[PubMed](#)]
20. Altintas S, Lambein K, Huizing MT, Braems G, Asjoe FT, Hellemans H, et al. Prognostic significance of oncogenic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a clinicopathologic study. *Breast J* 2009; 15(2):120-32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Nandi S, Guzman R, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(9):3650-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rossing MA, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Doherty JA, Weiss NS. Risk of epithelial ovarian cancer in relation to benign ovarian conditions and ovarian surgery. *Cancer Causes Control* 2008; 19(10):1357-64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jordan SJ, Green AC, Whiteman DC, Webb PM. Australian Ovarian Cancer Study Group: Risk factors for benign, borderline and invasive mucinous ovarian tumours: epidemiological evidence of a neoplastic continuum. *Gynecol Oncol* 2007; 107(2): 223-30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Stewart S, Querec T, Ochman A, Grover B, Bao R, Babb J, et al. Characterization of carcinogenesis rat model of ovarian preneoplasia and neoplasia. *Cancer Res* 2004; 64(22):8177-83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium : biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev* 2001; 22(2):255-88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gusberg SB, Deligdisch L. Ovarian dysplasia. A study of identical twins. *Cancer* 1984; 54(1):1-4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ting AY, Kimler BF, Fabian CJ, Petroff BK. Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. *Carcinogenesis* 2007; 28(1):130-5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tan OI, Hurst PR, Fleming JS. Location of inclusion cysts in mouse ovaries in relation to age, pregnancy, and total ovulation number: implications for ovarian cancer. *J Pathol* 2005; 205(4):483-90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Brewer MA, Ranger-Moore J, Greene MH, Alberts DS, Liu Y, Bartels HG, et al. Preneoplastic changes in ovarian tissues. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26(4):207-16. [[PubMed](#)]
30. Balen A. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Hum Reprod* 2001; 7(6):522-5. [[CrossRef](#)]
31. Lunn Sf, Fraser HM, Mason HD. Structure of the corpus luteum in the ovulatory polycystic ovary. *Hum Reprod* 2002; 17(1):111-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Trottier A, Battista MC, Geller DH, Moreau B, Carpentier AC, Simoneau-Roy J, et al. Adipose tissue insulin resistance in peripubertal girls with first-degree family history of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2012; 98(6):1627-34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Saxena P, Prakash A, Nigam A, Mishra A. Polycystic ovary syndrome: Is obesity a sine qua non? A clinical, hormonal, and metabolic assessment in relation to body mass index. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012; 16(6):996-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gadducci A, Gargini A, Palla E, Fanucchi A, Genazzani AR. Polycystic ovary syndrome and gynecological cancers: is there a link? *Gynecol Endocrinol* 2005; 20(4):200-8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Moini A, Esiami B. Familial associations between polycystic ovarian syndrome and common diseases. *J Asist Reprod Genet* 2009; 26(2-3):123-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Huang G, Coviello A. Clinical update on screening, diagnosis and management of metabolic disorders and cardiovascular risk factors associated with polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012; 19(6):512-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rajkhowa M, Glass MR, Rutherford AJ, Michelmore K, Balen AH. Polycystic ovary syndrome: a risk factor for cardiovascular disease? *Br J Obstet Gynecol* 2000; 107(1):11-8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Schildkraut JM, Schwingl P, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovarian disease. *Obstetrics & Gynecology* 1996; 88(4):554-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Scully RE. Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 23:208-18. [[PubMed](#)]
40. Okamura H, Katabuchi H. Detailed morphology of human ovarian surface epithelium focusing on its metaplastic and neoplastic capability. *Ital J Anat Embryol* 2001; 106(Suppl 2):263-76. [[PubMed](#)]
41. Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, Robson ME, Offit K, Boyd J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alteration in prophylactic oophorectomy specimens from BRCA1 heterozygotes. *Cancer* 2000; 89(2):383-90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Vanderhyden BC, Shaw TJ, Ethier JF. Animal models of ovarian cancer. *Reprod Biol and Endocrinol* 2003; 1:67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wong AS, Pelech SL, Woo MM, Yim G, Rosen B, Ehlen T, et al. Coexpression of hepatocyte growth factor-Met: an early step in ovarian carcinogenesis? *Oncogene* 2001; 20(11):1318-28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mok SC, Chao J, Skates S, Wong K, Yiu GK, Muto MG, et al. Prostatein a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(19):1458-64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Resta L, Russo S, Colucci GA, Prat J. Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* 1993; 82(2):181-6. [[PubMed](#)]
46. Plaxe SC, Deligdisch L, Dottino PR, Cohen CJ. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990; 38:367-72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wong AS, Leung PC. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res* 1990; 38(3):367-72. [[PubMed](#)]
48. Kruk PA, Maines-Bandiera SL, Auersperg N. A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab Invest* 1990; 63(1):132-6. [[PubMed](#)]
49. Wong AST, Leung PC, Maines-Bandiera SL, Auersperg N. Metaplastic changes in cultured human ovarian surface epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol. Anim* 1998; 34(9):668-70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Giles JR, Olson LM, Johnson PA. Characterization of ovarian surface epithelial cells from the hen: a unique model for ovarian cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231(11):1718-25. [[PubMed](#)]
51. Cramer DW, Welch WR: Determinants of ovarian cancer risk II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71(4):717-21. [[PubMed](#)]
52. Chatterjee R, Mills W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone A. Prospective study of pituitary-gonadal function to evaluate short-term effects of ablative chemotherapy or total body irradiation with autologous or allogenic marrow transplantation in post-menarcheal female patients. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13(5):511-7. [[PubMed](#)]
53. Meistrich ML, Shetty G. Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 2008; 136(6):691-701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Macejova D, Radikova Z, Macho L, Liska J, Brtko J. MNU-induced carcinogenesis of rat mammary gland: effect of thyroid hormone on expression of retinoic acid receptors in tumours of mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 244(1-2):47-56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Anđelković I, Jančić S, Katić , Jovanović T. Side-effects of DMBA on skin during the mammary carcinogenesis. *Pathol Res and Prac* 1991; 187:630.
56. Katić V, Jančić S, Stefanović-Lončar H, Jovanović T. DMBA carcinogenic potential on gastric mucosa. *Experimental Study. Analyt Cell Pathol* 1992; 4:184.
57. Crist KA, Zhang Z, You M, Gunning WT, Conran PB, Steele VE, et al. Characterization of rat ovarian adenocarcinomas developed in response to direct instillation of 7,12-dimethylbenz (a)anthracene (DMBA) coated suture. *Carcinogenesis* 2005; 26(5):951-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Hoyer PB, Davis JR, Bedrnicek JB, Marion SL, Christian PJ, Barton JK, et al. Ovarian neoplasm development by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure. *Gynecol Oncol* 2009; 112(3):610-5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sharmila R, Manoharan S. Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol* 2012; 50(3):187-94. [[PubMed](#)]
60. Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty of the rat. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 363-409.

STUDY OF OVARIAN CHANGES IN RATS WITH MAMMARY CARCINOMAS

Milena Ilić, Maja Zečević, Nina Jančić, Nataša Djindjić, Ivan Rančić, Dalibor Jovanović and Tomislav Jovanović

The aim of this study was to estimate ovarian changes in 7,12 dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) induced rat mammary carcinomas. The study was carried out on female virgin albino Wistar rats (n=35, age=35-37days, body mass 120-140g), divided into control (n=10) and experimental group (n=25). Anesthetised animals of experimental group were inoculated with 2 mg mixture (1 mg of DMBA and 1 mg of cholesterol-buffer) into the fifth left mammary gland. The animals were sacrificed 90 days after implantation, and ovaries and mammary glands were investigated. Mammary gland carcinomas (in situ and/or invasive) were pathohistologically verified in 19 experimental animals. Histological, histochemical, and immunohistochemical (cytokeratin AE1/AE3 and PCNA) studies of ovaries were performed.

Besides non-neoplastic changes, such as decrease in ovary's volume, reduction in the rate of follicular development and numerous corpora lutea formation were found in the vicinity of preneoplastic changes: papillomatous epithelial hyperplasia and inclusion cysts, microglandular formations with dysplasia and seromucinous microcystic formation. Intensive diffuse PCNA expression was present in the epithelium of glandlike structures, follicular and inclusion cysts.

These morphological changes confirmed that DMBA is a pluripotent carcinogen capable to induce a wide spectrum of preneoplastic lesions in the ovaries. The present dilemma is whether the changes described are the consequence of the direct effects of DMBA or of hormonal activity of the induced breast carcinomas, or both. *Acta Medica Medianae* 2013;52(1):25-32.

Key words: rat, mammary glands, ovary, carcinoma, DMBA