

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

ANA ČARIĆ

**IZRAŽAJ KASPAZE-3 U APOPTOTSKIM STANICAMA
SEROZNIH TUMORA JAJNIKA**

Magistarski rad

Split, travanj 2009.

**Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju
Kliničkog bolničkog centra Split.**

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Katarina Vilović

Popis kratica

SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
HE	hemalaun-eozin
AI	apoptotski indeks
CAD	kaspazom aktivirana DN-aza
TNF α	čimbenik tumorske nekroze α
TNF β	čimbenik tumorske nekroze β
TNFR	receptor faktora tumorske nekroze
DD	domena smrti
DED	izvršna domena smrti
FIGO	Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara

SADRŽAJ

1.	UVOD	2
1.1.	Apoptoza	2
1.1.1.	Regulacija apoptoze	3
1.1.2.	Apoptoza u tumorima	7
1.2.	Epitelni tumori jajnika	9
1.2.1.	Serozni tumori jajnika	13
1.2.2.	Apoptoza u seroznim tumorima jajnika	16
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	17
2.1.	Ciljevi istraživanja	17
2.2.	Hipoteza	17
3.	SADRŽAJ I METODE ISTRAŽIVANJA	19
3.1.	Prikupljanje materijala	19
3.2.	Materijali	19
3.3.	Metoda imunohistokemije	20
3.4.	Statistički postupci	21
4.	REZULTATI	22
4.1.	Opće karakteristike uzoraka	22
4.2.	Izražaj kaspaze 3 u apoptotskim stanicama atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika	25
4.3.	Izražaj kaspaze 3 u apoptotskim stanicama zloćudnih seroznih tumora jajnika	28
4.4.	Statistička analiza izmjerenih varijabli	28
5.	RASPRAVA	29
6.	ZAKLJUČCI	32
7.	SAŽETAK	33
8.	SUMMARY	35
9.	LITERATURA	37
10.	ŽIVOTOPIS	44

1. UVOD

1.1. APOPTOZA

Pojam apoptoza (grč. *a-po-toe-sis* – otpadati) prvi su upotrijebili Kerr, Wyllie i Currie 1972. godine. Opisali su morfološki oblik stanične smrti koji se odvija kao energetski ovisan proces u kojem djelovanjem vlastitih proteina i enzima dolazi do usitnjavanja jezgre i zgušnjavanja citoplazme uz održanu cjelovitost stanične membrane (1,2). Uočili su da u tkivu umiru pojedinačne stanice ne izazivajući upalu. Tri su glavna razloga zašto apoptoza nije praćena upalnim procesom: stanice ne otpuštaju svoj sadržaj u okolinu, ne otpuštaju medijatore upale i okolne stanice vrlo brzo fagocitiraju apoptotske stanice (3,4). Različite morfološke promjene koje se događaju u stanici tijekom apoptoze vidljive su svjetlosnim i elektronskim mikroskopom (5). Stanice se smanjuju, dolazi do zgušnjavanja citoplazme i kromatina, a stanična membrana "pupa", pa se s površine stanice odvajaju djelići citoplazme i jezgre okruženi staničnom membranom, tzv. apoptotska tjelešca. Na histološkom preparatu obojenom hemalaun eozinom apoptoza se vidi kao pojedinačna stranica ili njeni djelići ovalnog i okruglog oblika s tamnom eozinofilnom citoplazmom i tamnoljubičastim, zgusnutim kromatinom.

Apoptoza je prisutna u različitim fiziološkim i patološkim procesima (6). Uloga apoptoze posebno je istražena u morfogenezi različitih vrsta, te u homeostazi tkiva i organa odrasle jedinke (7). Važno je naglasiti da se apoptozom nastoje odstraniti sve oštećene stanice, npr. stanice inficirane virusom ili stanice s oštećenom DNK (8).

1.1.1. Regulacija apoptoze

Velik broj podražaja i stanja u organizmu, bilo fizioloških ili patoloških, mogu dovesti do apoptotske stanične smrti. Apoptozu može uzrokovati nedostatak međustaničnih signala. Većina stanica treba stalnu stimulaciju ili kontakt s površinom na kojoj rastu, a osobito je važna uloga citokina, čimbenika rasta i nekih hormona (9). Oštećenja DNK pokreću apoptozu, pa čimbenike koji uzrokuju oštećenje DNK, kao što je ionizacijsko zračenje, kemoterapeutici i lijekovi poput analoga nukleozida, ubrajamo u "pokretače apoptoze" (10). Reaktivni spojevi kisika koji nastaju kao produkti aerobnog metabolizma u ljudskim stanicama mogu aktivirati apoptozu djelujući na propusnost membrane mitohondrija i otpuštanje citokroma c (11). Posebno mjesto zauzimaju molekule koje se vežu na površinskim receptorima stanica, a nazivaju se "pokretači smrti". Neki od njih su: molekula Fas (FasL ili CD95 *ligand*), čimbenik tumorske nekroze α (TNF α), limfotoksin (TNF β) i TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) (7).

Najbolje istraženi putevi aktivacije apoptoze su mitohondrijski (unutrašnji) i receptorski (vanjski) put. U mitohondrijskom putu signali pokreću staničnu smrt aktivacijom proapoptotskih članova obitelji proteina bcl-2. U receptorskom putu do apoptoze dolazi nakon vezanja molekula, kao što je Fas, na receptore stanične membrane (6).

Oba puta aktiviraju enzime nazvane kaspaze (engl. *caspase, cysteine aspartyl proteases*). Kaspaze su proteolitički enzimi (citoplazmatske cisteinil-aspartatno specifične endoproteaze) koji potiču apoptozu (12). U citoplazmi stanice nalaze se u obliku proenzima, a mogu biti aktivirane autokatalitički ili s drugom kaspazom. Svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kao tetrameri koji nastaju nakon dvostrukog cijepanja. Stupnjevita razgradnja u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, ali i samu sebe, pojačava apoptotski signalni put i dovodi do vrlo brze smrti stanice (13). Inhibitori kaspaza zaustavljaju apoptozu (12).

Danas je poznato 14 članova obitelji kaspaza koje se označavaju rednim brojem 1-14, pri čemu prokaspaze 2, 8, 9 i 10 ubrajamo u pokretačke, a prokaspaze 3, 6 i 7 u izvršne kaspaze.

U receptorskom putu prva se aktivira kaspaza 8, a u mitohondrijskom kaspaza 9. Navedene kaspaze aktiviraju kaspazu 3 (poznatu kao CPP32, *Yama* i *apopain*) koja aktivira endonukleazu CAD (engl. *caspase activated DNase*) (6). Tijekom apoptoze kaspaza 3 je odgovorna, ili dijelom ili u cijelosti, za stupnjevitu razgradnju velikog broja proteina u stanici, fragmentaciju DNK i zgušnjavanje kromatina (14).

Osim endonukleaza, u nastajanju apoptotskih promjena važnu ulogu imaju enzimi kalpain i transglutaminaza. Kalpain cijepa stanične elemente, dok transglutaminaza križno povezuje proteine što dovodi do pupanja dijelova stanične membrane i oblikovanja apoptotskih tjelešaca (15).

U receptorskom putu aktivacije apoptoze važnu ulogu igra obitelj TNF receptora (Fas, TNFR), skupina membranskih proteina koja se proteže od vanjske do unutrašnje površine stanične membrane. Citoplazmatski dijelovi receptora nazivaju se domene smrti DD (engl. *Death Domain*). Vezanjem FasL na Fas-receptor dolazi do receptorske trimerizacije, što rezultira unutarstaničnim nakupljanjem DD dijelova receptora uz pomoć kompleksa proteina poznatih kao DISC (engl. *Death-Inducing-Signalling-Complex*). Preko adapterskih molekula FADD (engl. *Fas-Associated-Death-Domain-Protein*) koje imaju dvije domene, signal aktivira prokaspazu 8 (16). Domena DD molekule FADD veže se na DD-domenu Fas-receptora, a domena DED (*Death-Effector-Domain*) molekule FADD za prokaspazu 8. Time dolazi do njezina cijepanja i prelaska u aktivni oblik (17,18). Vezanjem TNF-liganda za TNFR1 receptor pokreće se sličan put, osim što su u ovom slučaju adapterske molekule TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*) koje imaju sposobnost vezanja različitih proteina na aktiviranom dijelu receptora (7). Apoptozu pokrenutu aktivacijom Fas i TNFR1-receptora inhibira obitelj proteina FLIP (engl. *FasL Inhibitor Protein*), v-FLIP i c-FLIP, koji se kao homolozi kaspaze 8 vežu na Fas-FADD-kompleks, čime inhibiraju aktivaciju prokaspaze 8 (6).

U mitohondrijskom putu aktivacije apoptoze središnje mjesto zauzima mitohondrij preko kojeg se aktiviraju proapoptotski članovi obitelji bcl. Ako je uzrok smrti stanice oštećenje DNK, ključna je uloga proteina p53, koji je u stanicama prisutan u inaktivnom obliku. Oštećenja DNK potiču nakupljanje proteina p53 u stanici, zbog čega dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljivanja oštećene DNK ili do pokretanja apoptoze, ako su ta oštećenja nepopravljiva (19,20). Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina obitelji bcl-2 ili da inducira gene koji povećavaju produkciju reaktivnih spojeva kisika, koji su snažni aktivatori apoptoze. Proteini obitelji bcl-2 dijele se na proapoptotske (bad, bax, bak itd.) i antiapoptotske proteine (bcl-2, bcl-xl, bcl-w). Proapoptotski proteini prisutni su u citosolu kao senzori staničnog oštećenja ili stresa, dok se antiapoptotski proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Omjer proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika određuje osjetljivost stanice na apoptozu (21). Važno je naglasiti da taj omjer bitno određuje odgovor stanica tumora na zračenje i kemoterapiju (22). Članovi obitelji bcl-2 reguliraju broj i tip ionskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu bad i bax dovode do stvaranja većih ionskih kanala kroz koje izlaze citokrom c i druge proapoptotske molekule. Otpušteni citokrom c veže se uz medijatorsku molekulu Apaf-1 koja aktivira kaspazu 9 (23,24). Citokrom c, Apaf-1, kaspaza 9 i ATP zajedno čine apoptosom (25).

Osim citokroma c, mitohondriji sadržavaju i druge apoptotske čimbenike kao što su AIF (engl. *Apoptosis-Inducing Factor*) i endonukleaza G. AIF iz mitohondrija prelazi u jezgru stanice, neovisno o kaspazama uzrokuje fragmentaciju DNK na dijelove veličine od 50-300 kb i time dovodi do zgušnjavanja kromatina uz jezgrinu membranu (26). Endonukleaza G izlazi iz mitohondrija za vrijeme apoptoze i djelomično je odgovorna za internukleosomalno cijepanje DNK, koje je također neovisno o kaspazama (27,28).

U ranoj fazi apoptoze vanjska membrana mitohondrija postaje propusna za proteine, što rezultira otpuštanjem topljivih intermembranskih mitohondrijskih proteina, dok na unutrašnjoj membrani dolazi do slabljenja transmembranskog potencijala što može poslužiti kao pokazatelj ranih apoptotskih promjena u uvjetima *in vivo* (29).

Osim receptorskog i mitohondrijskog puta, apoptozu mogu direktno aktivirati enzimi citotoksičnih T-limfocita. Glavne izvršne molekule u ovom putu aktivacije apoptoze su granzim A i B, serinske esteraze citotoksičnih T limfocita i NK stanica. Granzim B može direktno aktivirati kaspaze 3, 7, 8 i 10, te tako pokrenuti apoptozu. Granzim A aktivira kaspaza neovisan put apoptoze posredovan DNazom NM23-H1 tako što razgrađuje protein SET koji inaktivira gen za NM23-H1. Uloga ovog puta osobito je važna u imunološki posredovanoj prevenciji karcinoma putem apoptoze tumorskih stanica (30).

Tijekom 90-ih godina prošlog stoljeća većina istraživača bila je uvjerena da je aktivacija kaspaza nužna za apoptotsku smrt stanice. Svi do tada opisani procesi aktivacije apoptoze dovodili su do stupnjevite razgradnje kaspaza. U posljednjih 10-ak godina sve više se istražuje kaspaza neovisni put apoptoze (31). Naime, ugrožena stanica može aktivirati različite puteve apoptotske stanične smrti kako bi osigurala samouništenje. U istraživanjima na stanicama Jurkat (stanična kultura T stanične leukemije) opisna je stanična smrt morfološki identična apoptozi, iako je kaspazna aktivnost bila blokirana. Dokazano je da kaspaza ovisan put ne isključuje kaspaza neovisan i da neki podražaji mogu potaknuti oba puta apoptoze (32). Primjerice, protutijelo AD5-10 (monoklonalno anti-humano protutijelo DR5) potaknulo je uobičajenu stupnjevitu aktivaciju kaspaza, te kaspaza ovisnu apoptozu u Jurkat stanicama. Međutim, inaktivacija kaspaze inhibitorom Z-VAD nije uzrokovala inhibiciju apoptoze što znači da je istim protutijelom aktiviran kaspaza neovisni put apoptoze (33). Istraživanja *in vitro* na staničnim kulturama opisala su još neke proteaze kao što je kalpain, katepsin B, D, L, Omi/HtrA2 i granzim

A i B čija aktivacija dovodi do smrti stanice morfološki identične apoptozi bez aktivacije kaspaza (31).

Kaspaza neovisna smrt stanice odvija se puno sporije od kaspaza ovisne apoptoze. Sve ove činjenice govore u prilog tvrdnji da ljudski organizam ne može ovisiti o aktivaciji samo jedne skupine proteaza u odstranjivanju oštećenih stanica. Kaspaza ovisna apoptoza je najučinkovitija i najbrža, ali ukoliko je zbog mutacija, genetskih manipulacija i inhibicija poremećena, stanica može pokrenuti apoptotsku smrt kaspaza neovisnim putem (34). Međutim, istraživanja na staničnim kulturama su pokazala da ukoliko tumorske stanice imaju mogućnost aktivacije i kaspaza ovisnog i kaspaza neovisnog puta, kaspaza ovisni put može biti manje učinkovit u odgovoru na terapiju (35,36).

1.1.2. Apoptoza u tumorima

Danas se smatra da su poremećaji u apoptotskim putevima značajni u patogenezi mnogih bolesti, od neurodegenerativnih poremećaja do malignih tumora (13).

Jedna od temeljnih značajki malignih stanica je preživljavanje stanice s oštećenjem DNK i nakupljanje novonastalih genskih mutacija. Zdrave stanice imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravka oštećenih mjesta DNK, a aktivacijom apoptoze sprječavaju diobu stanice i umnažanje stanica-kćeri s mutacijom. Nakupljanje tumorskih stanica može biti posljedica aktivacije onkogeni, inaktivacije tumor supresor gena, mutacije gena koji reguliraju apoptozu ili poremećaja u popravku DNK (37).

Važna uloga apoptoze u kancerogenezi prvi put je uočena zahvaljujući istraživanjima gena *bcl-2* (engl. *B cell lymphoma*), čija mutacija je otkrivena u stanicama folikularnog limfoma. U normalnim stanicama protein *bcl-2* inhibira apoptozu, a njegovo nakupljanje u citoplazmi tumorskih stanica sprječava odumiranje malignog klona (37).

Gen p53 prvi je tumor supresorski gen koji je povezan s apoptozom (37). Mutacija gena p53 prisutna je u većini tumora i povezana je s uznapredovalim stadijem tumora i lošijom prognozom pacijenata. Gubitak funkcije gena p53 povećava kromosomsku nestabilnost i dovodi do nakupljanja različitih oštećenja u stanici što može dovesti do zloćudne preobrazbe stanice (37). Protein p53 potiče proapoptotske gene kao što je gen za bax i aktivira apoptozu u svrhu odstranjivanja tumorskih stanica. Zračenje i kemoterapija uzrokuju oštećenje DNK što aktivira apoptozu preko proteina p53 u stanicama tumora, pa su tumori s mutacijom gena p53 rezistentniji na kemoterapiju i zračenje (13).

Apoptoza je istraživana u mnogim tumorima, ali rezultati brojnih studija nisu u suglasju. Broj apoptotskih stanica na patohistološkom preparatu može se izraziti apoptotskim indeksom (AI) (38). U različitim radovima apoptotski indeks se određuje kao broj apoptotskih stanica na 1000 stanica (39), kao broj apoptotskih stanica u ukupnom broju tumorskih stanica (38) ili kao broj apoptotskih stanica na 10 vidnih polja velikog povećanja (40). Budući da je kaspaza 3 glavna izvršna molekula apoptoze, mnogi autori su apoptotski indeks određivali kvantifikacijom kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica (41).

U posljednjih 10 godina otkriveno je da neki kemoterapeutici kao npr. doxorubicin potiču apoptozu, a da su poremećaji u signalnim putevima apoptoze u tumorskim stanicama povezani s rezistencijom na lijekove (42). Apoptoza je prisutna u spontanoj regresiji tumora i u tumorima pacijenata koji su liječeni kemoterapijom (43). Lijekovi koji aktiviraju apoptozu preko "receptora smrti" kao što je Fas receptor, aktiviraju apoptozu isključivo putem stupnjevite aktivacije kaspaza (44,45). Međutim, neki čimbenici, uključujući kemoterapeutike i određene endogene proapoptotske proteine kao što su bax i bak, mogu aktivirati apoptozu kaspaza ovisnim i kaspaza neovisnim putem (46).

1.2. EPITELNI TUMORI JAJNIKA

Tumori jajnika su histološki i klinički vrlo heterogena skupina. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije temelji se na pretpostavci da određeni tumori potječu od pojedinih struktura jajnika (47). Stoga se tumori jajnika histogenetski mogu svrstati u tri glavne skupine: epitelno-stromalne tumore pokrovnog epitela (80%), tumore spolnih stanica (5%) i tumore specijalizirane strome jajnika (10%). Tumori pokrovnog epitela jajnika čine oko 60% svih tumora jajnika i oko 90% svih zloćudnih tumora jajnika (48).

Zloćudni tumori pokrovnog epitela tj. karcinomi jajnika čine 5% svih zloćudnih tumora u žena i predstavljaju otprilike 30% svih karcinoma ženskog spolnog sustava. U razvijenim zemljama ima gotovo jednaku učestalost kao karcinom tijela maternice (35%) i karcinom ušća maternice (27%). U ekonomski razvijenim državama Sjeverne Amerike, Europe, Australije i Novog Zelanda pojavnost karcinoma jajnika je najveća (15/100 000 žena), dok je u Indiji i Kini vrlo niska (2/100 000 žena) (47). Donedavno je učestalost karcinoma jajnika u cijelom svijetu bila u neprekidnom porastu. U posljednjih nekoliko godina u razvijenim zemljama, poglavito u zemljama sa visokom potrošnjom kontraceptiva, primijećen je lagani pad učestalosti (49). U Hrvatskoj, karcinom jajnika je peto najčešće sijelo karcinoma u žene. U 2006. godini, bilo je 440 novooboljelih, a incidencija i mortalitet u Hrvatskoj su u porastu (48). Karcinomi jajnika najčešće se pojavljuju u žena starijih od 50 godina kad im incidencija dramatično raste. Najveća je u dobnoj skupini od 65-85 godina i iznosi 54 na 100 000 (48). Žene s karcinomom jajnika imaju vrlo lošu prognozu s petogodišnjim preživljenjem od 32% u Europi. Glavni razlog visoke smrtnosti je što se preko 70% bolesnica u vrijeme postavljanja dijagnoze nalazi u uznapređovalom kliničkom stadiju (47).

Uzrok nastanka karcinoma jajnika nije poznat, ali je nekoliko čimbenika povezano s porastom ili smanjenjem rizika za ovu bolest. Većina epidemioloških studija pokazuje da dob,

neploidnost, te karcinom jajnika, dojke i endometrija u obiteljskoj anamnezi povećavaju rizik za nastanak epitelnog karcinoma ovarija. S druge strane, veći broj poroda, dojenje i upotreba oralnih kontraceptiva smanjuju rizik (49).

Prema klasifikaciji SZO epitelno-stromalni tumori jajnika dijele se u nekoliko skupina (tablica 1).

Tablica 1. Histološka klasifikacija epitelno-stromalnih tumora pokrovnog epitela jajnika prema SZO (47).

<p>SEROZNI TUMORI</p> <p>Dobročudni</p> <ul style="list-style-type: none"> Cistadenom i papilarni cistadenom površinski papilom adenofibrom i cistadenofibrom <p>Atipično proliferativni</p> <ul style="list-style-type: none"> cistični tumor i papilarni cistični površinski papilom adenofibrom i cistadenofibrom <p>Zloćudni</p> <ul style="list-style-type: none"> adenokarcinom površinski papilarni adenokarcinom adenokarcinofibrom (zloćudni adenofibrom) <p>MUCINOZNI TUMORI</p> <p>Zloćudni</p> <ul style="list-style-type: none"> adenokarcinom adenokarcinofibrom (zloćudni adenofibrom) <p>Atipično proliferativni</p> <ul style="list-style-type: none"> intestinalni tip endocervikalni tip-sličan <p>Dobročudni</p> <ul style="list-style-type: none"> cistadenom adenofibrom i cistadenofibrom <p>Mucinozni cistični tumor sa muralnim nodulima</p> <p>Mucinozni cistični tumor sa pseudomiksomima peritoneuma</p> <p>ENDOMETRIOIDNI TUMORI</p> <p>Zloćudni</p> <ul style="list-style-type: none"> adenokarcinom adenokarcinofibrom (maligni adenofibrom) zloćudni mezodermalni miješani tumor (karcinosarkom) adenosarkom endometrioidni stromalni sarkom (niski gradus-stupanj) nediferencirani sarkom ovarija <p>Atipično proliferativni</p> <ul style="list-style-type: none"> cistični tumor adenofibrom i cistadenofibrom <p>Dobročudni</p> <ul style="list-style-type: none"> cistadenom adenofibrom i cistadenofibrom 	<p>SVIJETLOSTANIČNI TUMORI</p> <p>Zloćudni</p> <ul style="list-style-type: none"> adenokarcinom adenokarcinofibrom (maligni adenofibrom) <p>Atipično proliferativni</p> <ul style="list-style-type: none"> cistični tumor adenofibrom i cistadenofibrom <p>Dobročudni</p> <ul style="list-style-type: none"> cistadenom adenofibrom i cistadenofibrom <p>TUMORI PRIJELAZNIH STANICA</p> <p>Zloćudni</p> <ul style="list-style-type: none"> karcinom prijelaznih stanica (ne-Brennerov tip) zloćudni Brennerov tumor <p>Atipično proliferativni</p> <ul style="list-style-type: none"> atipično proliferativni Brennerov tumor proliferativna varijanta-tip <p>Dobročudni</p> <ul style="list-style-type: none"> Brennerov tumor metaplastična varijanta <p>TUMORI SKVAMOZNIH STANICA</p> <ul style="list-style-type: none"> karcinom skvamoznih stanica epidermoidna cista <p>MIJEŠANI EPITELNI TUMORI</p> <p>Zloćudni</p> <ul style="list-style-type: none"> Atipično proliferativni <p>Zloćudni</p> <p>NEDIFERENCIRANI I NEKLASIFICIRANI TUMORI</p> <ul style="list-style-type: none"> nediferencirani karcinom adenokarcinom
---	---

Glavna značajka klasifikacije SZO je da epitelne tumore određenog histološkog tipa razvrstava u tri skupine prema biološkom ponašanju: dobroćudne, atipično proliferativne i zloćudne tumore. Srednja životna dob u kojoj se pojavljuju dobroćudni epitelni tumori je 45 godina, a atipično proliferativni tumori 50 godina. Zloćudni tumori jajnika većinom nastaju u perimenopauzi i postmenopauzi (50). Atipično proliferativni tumori jajnika imaju izrazitiju staničnu proliferaciju nego odgovarajući dobroćudni oblici, ali nemaju invaziju strome (51).

Da bi se tumor patohistološki označio kao atipično proliferativni, mora zadovoljavati barem dva od ovih kriterija:

- pupanje epitela – proliferacija epitela u obliku malih papila, bez vezivne strome, sa sklonošću odvajanja pojedinačnih stanica ili nakupina stanica u lumen šupljina,
- višeslojnost epitela, i na površini papila i na površini šupljina,
- mitotska aktivnost,
- atipija jezgara s poremećenim odnosom veličine jezgra/citoplazma, promijenjenim sadržajem i izgledom kromatina, te promijenjenim oblikom, veličinom i brojem jezgrića.

Važno je naglasiti da opisanim promjenama mora biti obuhvaćeno najmanje 10% pregledanog materijala da bi se tumor svrstao u atipično proliferativni. U patohistološkoj analizi tumora jajnika najkritičnija točka je procjena prisutnosti stromalne invazije koja određuje razliku između atipično proliferativnih tumora i karcinoma (48).

Atipično proliferativni tumori, seroznog tipa i rjeđe mucinoznog endocervikalnog tipa, u trećine oboljelih mogu imati implantate po potrbušnici. Dugo se vjerovalo da peritonealne promjene nastaju implantacijom tumorski stanica ili dijelova tumora jajnika. Danas prevladava mišljenje da su rezultat multicentrične neoplastične preobrazbe peritoneja. U prilog multicentričnom nastanku, tj. neoplastičnom poticaju koji zahvaća cijeli Müllerov sustav govori nalaz peritonealnih implantata uz atipično proliferativne tumore jajnika u kojih se tumorsko tkivo ne nalazi na površini jajnika, nalaz peritonealnih seroznih atipično proliferativnih i zloćudnih

tumora u kojima jajnici nisu zahvaćeni ili su zahvaćeni minimalno, nastanak tumora u žena čiji su jajnici odstranjeni i tridesetak godina prije razvoja izvanovarijskih seroznih tumora, te ponekad istovremeni nastanak karcinoma jajovoda ili endometrija (50).

1.2.1. Serozni tumori jajnika

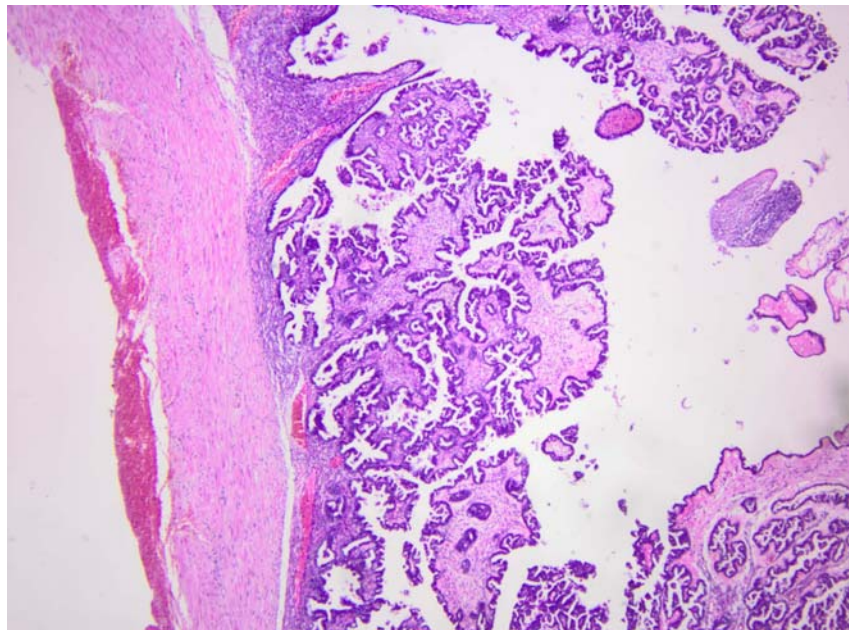
Serozni tumori jajnika čine otprilike polovicu svih epitelno-stromalnih tumora. Od ukupnog broja njih 50% je dobroćudno, trećina zloćudno, a ostali su atipično proliferativni (48).

Dobroćudni serozni tumori jajnika obično su unilokularne ciste glatke i sjajne površine. Mikroskopski su građeni od tanke vezivne stjenke obložene cilindričnim epitelom, koji podsjeća na epitel jajovoda ili niskim kubičnim epitelom koji odgovara pokrovnom epitelu jajnika. U šupljini se mogu naći i široke čvrste resice, obložene cilindričnim ili niskim kubičnim epitelom na površini. Većina dobroćudnih seroznih tumora jajnika nastaje u dobi od 40. do 60. godine. Asimptomatski su i otkriju se uglavnom slučajno pri rutinskom ultrazvučnom pregledu (51).

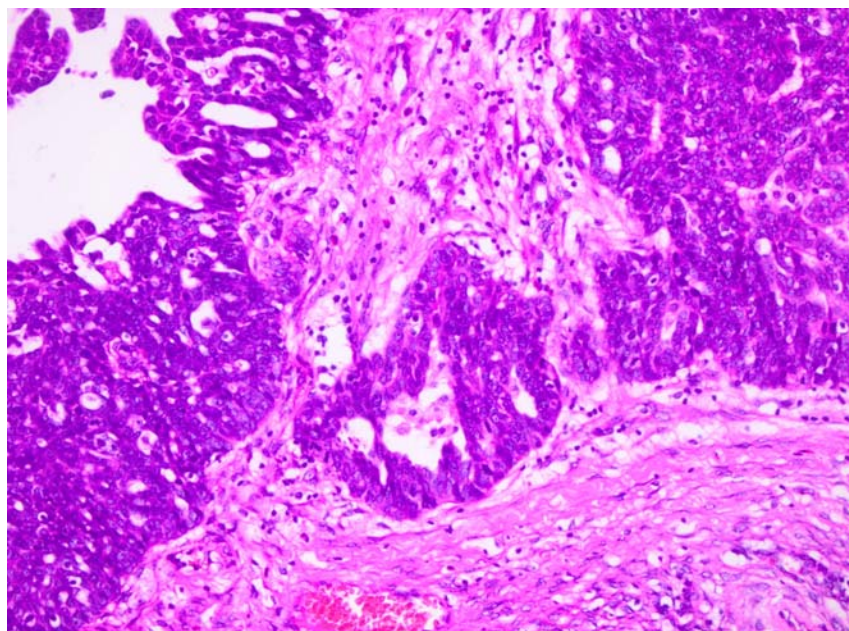
Atipično proliferativni serozni tumori jajnika (slika 1) na unutrašnjoj i/ili vanjskoj površini ciste imaju nježne, mrvljive resice. Nalaz solidnih žarišta, opsežnih područja nekroze, te prirastanje tumora uz okolne organe obilježja su moguće zloćudnosti. Osnovna histološka obilježja su atipija i proliferacija epitela, ali bez destrukcije i invazije strome. Prosječna dob pacijentica sa ovim tumorom je u prosjeku 15 godina niža od pacijentica sa seroznim karcinomom jajnika. Klinički su gotovo uvijek asimptomatski, a kod mlađih pacijentica mogu biti povezani s neplodnošću (47). Atipično proliferativni serozni tumori su u oko 30% slučajeva udruženi sa peritonealnim implantatima, koji određuju prognozu ovih tumora jajnika. Implantati se dijele u neinvazivne i invazivne, a neinvazivni u epitelne i dezmozoplastične. Uz mikropapilarne tumore, obično se nalaze invazivni implantati. Invazivni implantati smanjuju desetogodišnje preživljenje pacijentica s atipično proliferativnim seroznim tumorom jajnika na svega 35% (47).

Zloćudni serozni tumori jajnika (slika 2) u pravilu su različite veličine i mogu biti u rasponu od malih (2 do 3 cm) do izrazito velikih. Uglavnom su dijelom cistični, dijelom solidni s područjima krvarenja i nekroze. Možemo ih klasificirati kao dobro, srednje i slabo diferencirane tumore. Dobro diferencirani tumori su solidni i cistični s papilama unutar cističnih područja. Za razliku od atipično proliferativnih seroznih tumora, papile su razgranatije i celularnije sa oskudnom vezivnom stromom. U slabo diferenciranim tumorima najčešće nalazimo solidne nakupine slabo diferenciranih stanica s opsežnim područjima nekroze i krvarenja. Ukupno petogodišnje preživljenje pacijentica sa zloćudnim seroznim tumorom jajnika je oko 35% (47), a drastično opada ukoliko se tumor otkrije u uznapredovalom kliničkom stadiju (FIGO stadij III i IV), koji se ne može kirurški liječiti (49).

Istraživanja na karcinomima jajnika danas nastoje riješiti dva osnovna problema. Prvi, kako pronaći nove biljege koji bi omogućili probir pacijentica i otkrivanje bolesti u ranom stadiju. Drugi, kako otkriti nove prognostičke i prediktivne parametre kojim bi se odredili agresivni i rezistentni tipovi karcinoma, a što bi u konačnici vodilo individualnom pristupu u dijagnozi i terapiji svake pacijentice (52).



Slika 1. Atipično proliferativni serozni tumor jajnika (4x, HE).



Slika 2. Zloćudni serozni tumor jajnika (10x, HE).

1.2.2. Apoptoza u seroznim tumorima jajnika

Svrha većine istraživanja apoptoze u seroznim tumorima jajnika je unaprjeđenje terapije budući da je prognoza ovih pacijentica vrlo loša unatoč provedenoj terapiji (53).

U 50-90% uznapredovalih seroznih karcinoma jajnika mutiran je gen p53. Inaktivacija gena p53 pronađena u obiteljskom i sporadičnom karcinomu jajnika. Ekspresija proteina p53 najviše je istraživana imunohistokemijskim bojanjem u brojnim kliničkim studijama (53,54,55,56), jer se smatra da je apoptoza koju potiče neophodna za uspješnu kemoterapiju.

Također, dokazano je da u seroznim karcinomima jajnika postoji statistički značajna korelacija između apoptotskog i mitotskog indeksa, a tumori s lošijom prognozom imali su veći apoptotski indeks (56). Istraživanja na staničnim kulturama karcinoma jajnika pokazuju da je kaspazna aktivnost i apoptotski indeks značajno smanjen u rezistentnim staničnim kulturama karcinoma jajnika u odnosu na one koje su dobro reagirale na terapiju cisplatinom. Iz ovoga proizlazi da smanjena aktivnost kaspaze 3 može biti povezana sa rezistencijom ovarijskih karcinoma na tumorsku terapiju kemoterapeuticima (57).

U većini ostalih istraživanja tumori ovarija nisu bili razvrstani po histološkom tipu. Ta istraživanja su pokazala da je u tumorskim stanicama inaktiviran put apoptoze koji se odvija preko apoptosoma (58), a kaspaza 3 i p21 smatraju se neovisnim prognostičkim faktorom za preživljenje i progresiju bolesti (53). Protein p21 je inhibitor ciklin-ovisne kinaze, te dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa nakon oštećenja DNK. Kao faktor koji zaustavlja proliferaciju ima važnu ulogu tijekom razvoja tumora. Usko je povezan sa funkcijom proteina p53, te može djelovati kao inhibitor p53 ovisne apoptoze (59).

Do danas nije provedeno istraživanje apoptotskih puteva u tumorima jajnika razvrstanih prema histološkom tipu i biološkom potencijalu. Takva istraživanja doprinijela bi razumijevanju mehanizama rezistencije tumorskih stanica na lijekove koji kao glavni cilj imaju indukciju apoptoze.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1. Ciljevi istraživanja

U ovom radu cilj je bio imunohistokemijski istražiti postoje li kaspaza 3 negativne apoptotske stanice u atipično proliferativnim seroznim tumorima i invazivnim seroznim tumorima jajnika, te odrediti koliki je njihov udio u oba tipa tumora. Također, cilj je bilo usporediti aktivnost kaspaze 3 u apoptotskim stanicama tumora jajnika različitog biološkog ponašanja. Istraživanje aktivnosti kaspaze 3 i apoptoze u tumorima različitog biološkog ponašanja omogućilo bi bolje razumijevanje apoptotskih puteva u kancerogenezi ovih tumora i tako doprinijelo preciznijoj klasifikaciji tumora, te razvoju i primjeni ciljanih antitumorskih lijekova. U cilju ostvarenja gore navedenog:

1. istražena je aktivnost kaspaze 3 u apoptotskim stanicama atipično proliferativnih seroznih tumora i invazivnih seroznih tumora jajnika, i određen je njihov broj na 1000 tumorskih stanica,
2. istraženo je postojanje kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica u atipično proliferativnim seroznim tumorima i invazivnim seroznim tumorima jajnika, i određen je njihov broj na 1000 tumorskih stanica,
3. uspoređen je broj kaspaza 3 pozitivnih i kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica u atipično proliferativnim seroznim tumorima i invazivnim seroznim tumorima jajnika.

2.2. Hipoteza

Temeljna pretpostavka predloženog istraživanja je da u seroznim tumorima jajnika pronalazimo kaspaza 3 negativne apoptotske stanice, te da je njihov udio veći kod invazivnih seroznih tumora nego kod atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika. Moguće objašnjenje ove pretpostavke

je što tijekom tumorske progresije dolazi do poremećaja u apoptotskim putevima što za posljedicu ima izbjegavanje kaspaza 3 ovisne apoptoze kako bi tumorska stanica izbjegla smrt.

3. SADRŽAJ I METODE

3.1. Prikupljanje materijala

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split primjenom imunohistokemijske metode istraživanja na parafinskim presjecima seroznih tumora jajnika pacijentica operiranih na Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split u razdoblju od 1989.-2005. godine.

U svrhu istraživanja:

1. pregledana je arhiva patohistoloških nalaza i prema njihovom broju iz arhive su izdvojena stakalca s uzorcima tkiva bojena hemalaun eozinom, mikroskopskim pregledom uzoraka tkiva odabrani su presjeci tumorskog tkiva, a prema odabranom presjeku izdvojene su parafinske kocke,
2. tumori su podijeljeni po biološkom ponašanju na atipično proliferativne serozne tumore i invazivne serozne tumore jajnika prema SZO klasifikaciji (47),
3. parafinski rezovi odabranih tumora bojeni su primarnim protutijelom za aktivni oblik kaspaze 3, a kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo tonzile,
4. svjetlosnim mikroskopom analizirane su kaspaza 3 pozitivne i kaspaza 3 negativne apoptotske stanice, te je semikvantitativnim putem određen njihov broj (broj apoptotskih stanica na 1000 tumorskih stanica).

3.2. Materijali

Materijal za analizu u ovoj studiji bili su parafinski presjeci seroznih tumora jajnika pacijentica operiranih na Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split u razdoblju od 1989-2005. godine. Nakon revizije patohistoloških nalaza određene su dvije skupine seroznih tumora jajnika prema njihovom biološkom ponašanju prema SZO (47). U skupini atipično proliferativnih

seroznih tumora jajnika bilo je 24 pacijentice, a u skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika 26 pacijentica. Komadići tkiva u parafinskim kockama uzeti su iz seroznih tumora jajnika bolesnica operiranih na Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split. Tumorsko tkivo je fiksirano u 4%-tnom paraformaldehidu tijekom 24 sata, a potom ispirano u 0,1 M fosfatnom puferu. Nakon dehidracije u uzlaznim koncentracijama alkohola i ksilolu, materijali su uklopljeni u parafin na 56°C.

Parafinske kocke su izrezane na rezove debljine od 4-6 µm i priliječljene na silanizirana predmetna stakalca (Adheesion Microscope Slides, Marlenfeld GmbH&Co.KG. Germany).

3.3. Metoda imunohistokemije

Parafinski rezovi seroznih tumora jajnika debljine 3-4 µm su nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije kroz alkohole silazne koncentracije, kuhani u natrij citratu tijekom 10-30 min. Inkubacijom u 3 %-tnom H₂O₂ (30 min na sobnoj temperaturi) inaktivirana je endogena peroksidaza. Nakon toga presjeci su isprani u otopini fosfatnog pufera (PBS) i inkubirani primarnim protutijelom za aktivni oblik kaspaze-3 u razrjeđenju 1:700 (AF835, R&D Systems, Minneapolis, USA), u vlažnoj atmosferi preko noći na 4°C. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani s odgovarajućim biotiniziranim sekundarnim protutijelom 35 minuta na sobnoj temperaturi (Anti-Rabbit K4003, DAKO Envision HRP, Denmark). Kao pozitivna kontrola koristilo se tkivo tonzile. Obojeni uzorci analizirani su svjetlosnim mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokio, Japan). Na 1000 tumorskih stanica izbrojane su kaspaza 3 pozitivne i kaspaza 3 negativne apoptotske stanice. Kaspaza 3 izražaj procijenjen je nalazom smeđe citoplazmatske i perinuklearne obojenosti apoptotskih stanica. Svako bojenje apoptotske stanice interpretirano je kao pozitivno bez obzira na intenzitet, dok je nedostatak obojenosti u apoptotskim stanicama opisivane kao kaspaza 3 negativna apoptotska stanica. Za svaki preparat izbrojeno je najmanje

1000 tumorskih stanica na velikom povećanju (x40), te je izračunat postotak kaspaza 3 pozitivnih i negativnih apoptotskih stanica.

3.4. Statistički postupci

U testiranju rezultata korišten je Spearmanov korelacijski test i Mann-Whitneyev test. Statistička značajnost određena je s vrijednošću $p < 0.05$. Za analizu navedenih rezultata korišten je Statistički paket za društvene znanosti, verzija 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL USA).

Analizirana je:

1. Povezanost broja kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica i kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica u atipično proliferativnim seroznim tumorima (Spearmanov test).
2. Povezanost broja kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica i kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica u invazivnim seroznim tumorima (Spearmanov test).
3. Usporedba broja kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica između dvije skupine tumora (Mann-Whitneyev test).
4. Usporedba broja kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica između dvije skupine tumora (Mann-Whitneyev test).
5. Usporedba apoptotskog indeksa između dvije skupine tumora (Mann-Whitneyev test).

4. REZULTATI

4.1. Opće karakteristike uzoraka

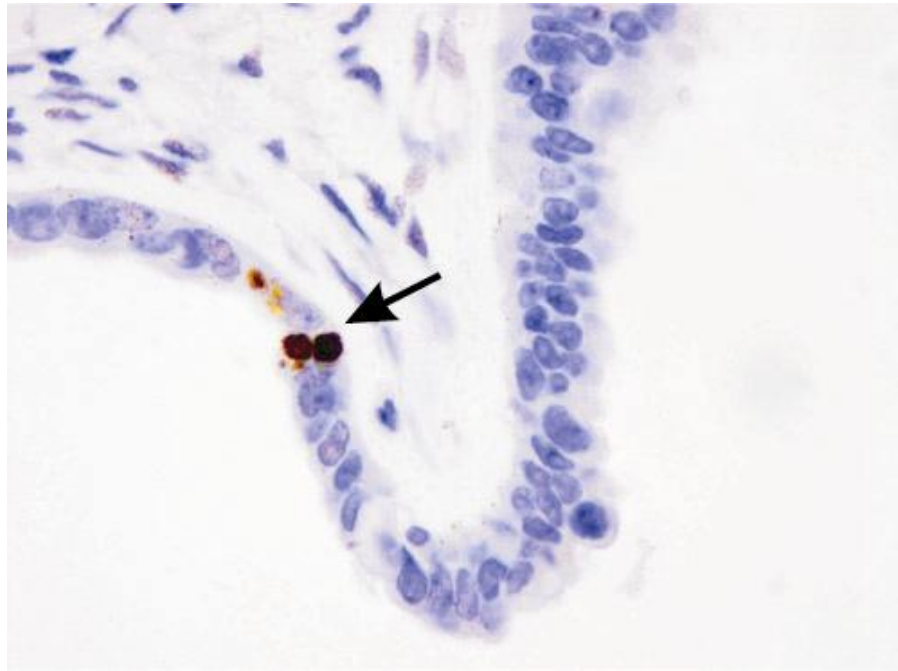
U ovo istraživanje uključeno je 50 pacijentica sa seroznim tumorom jajnika. Pacijentice su operirane u KB Split od 1995.-2005. godine.

Raspodjela pacijentica sa seroznim tumorima jajnika napravljena je na osnovi patohistološke revizije HE preparata seroznih tumora jajnika odabranih pacijentica.

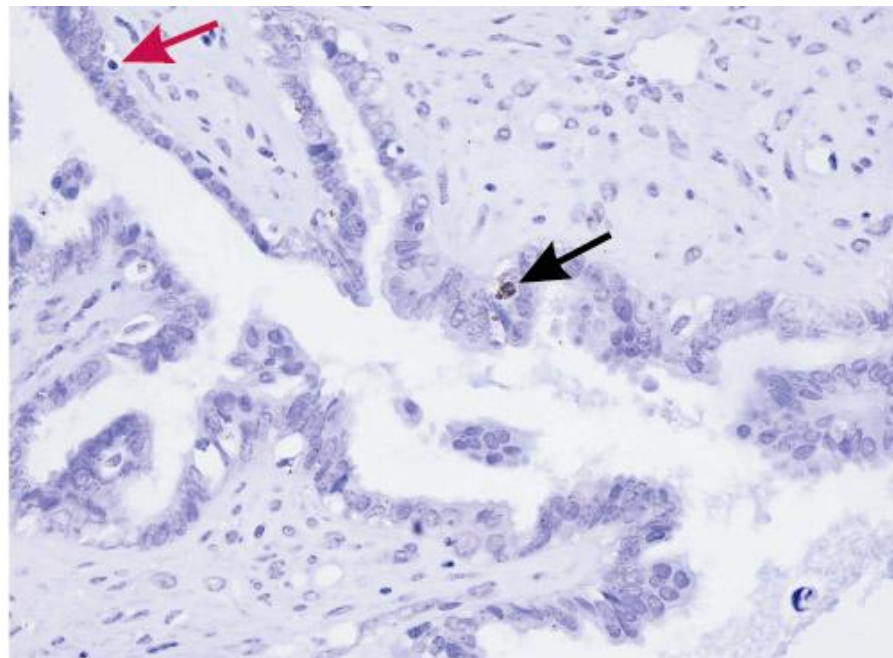
U skupini atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika bilo je 24 pacijentice, a u skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika 26 pacijentica.

U obje skupine seroznih tumora jajnika pronađene su kaspaza 3 pozitivne i kaspaza 3 negativne apoptotske stanice (slika 3-6).

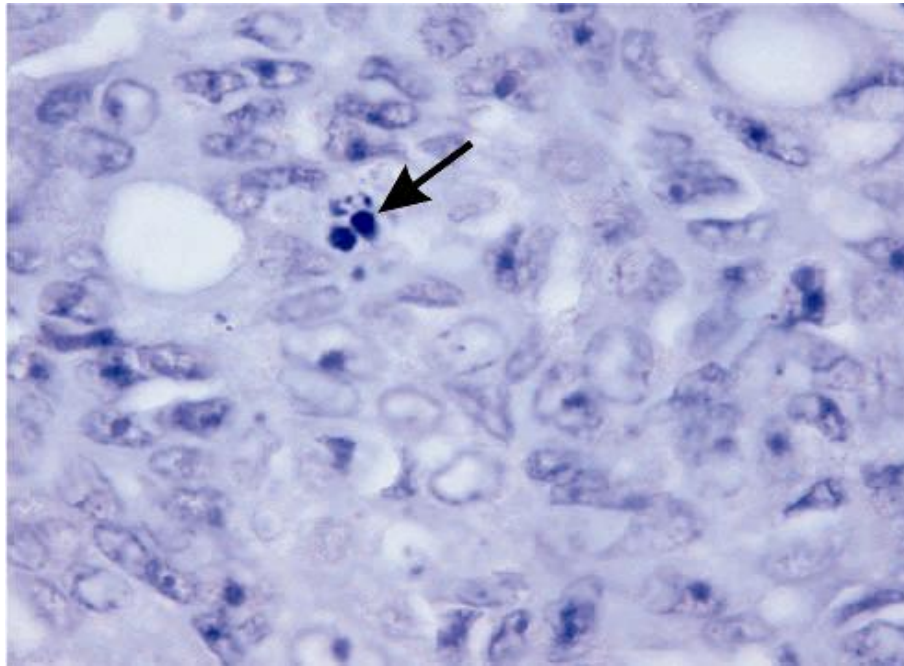
U jednom zloćudnom seroznom tumoru nije pronađena niti jedna apoptotska stanica, među pregledanim i izbrojenim tumorskim stanicama.



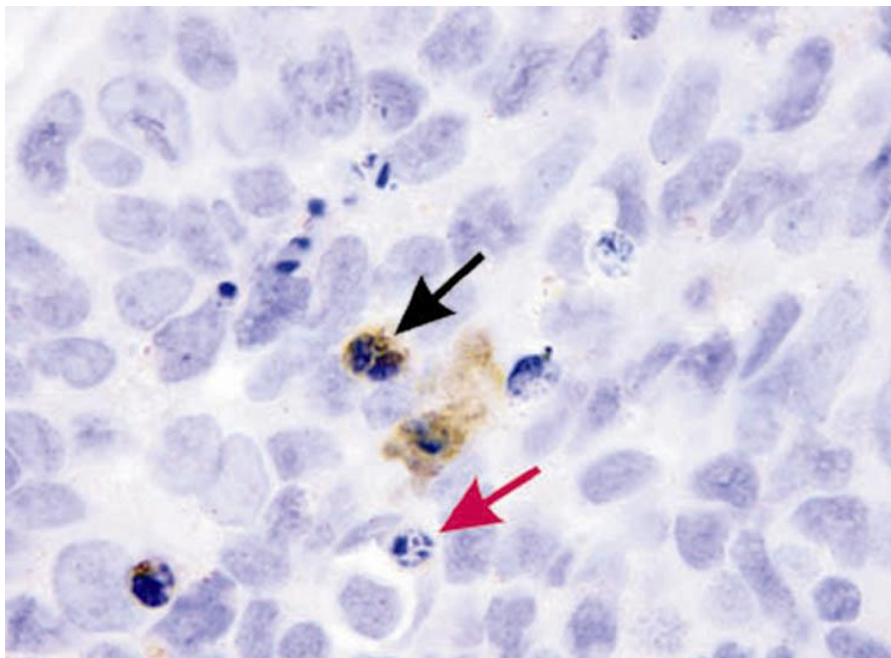
Slika 3. Atipično proliferativni serozni tumor jajnika. Imunohistokemijsko bojanje s protutijelom za aktivnu kaspazu 3. Kaspaza 3 pozitivna apoptotska stanica (crna strelica) (100x).



Slika 4. Atipično proliferativni serozni tumor jajnika. Imunohistokemijsko bojanje s protutijelom za aktivnu kaspazu 3. Kaspaza 3 pozitivna apoptotska stanica (crna strelica) i kaspaza 3 negativna apoptotska stanica (crvena strelica) (20x).



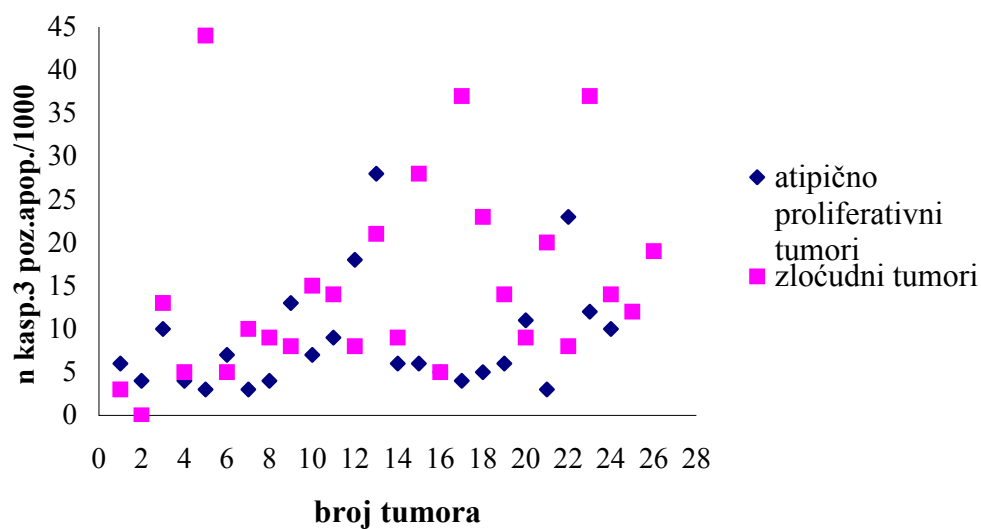
Slika 5. Zloćudni serozni tumor jajnika. Imunohistokemijsko bojanje s protutijelom za aktivnu kaspazu 3. Kaspaza 3 negativna apoptotska stanica (crna strelica) (100x).



Slika 6. Zloćudni serozni tumor jajnika. Imunohistokemijsko bojanje s protutijelom za aktivnu kaspazu 3. Kaspaza 3 pozitivna apoptotska stanica (crna strelica) i kaspaza 3 negativna apoptotska stanica (crvena strelica) (100x).

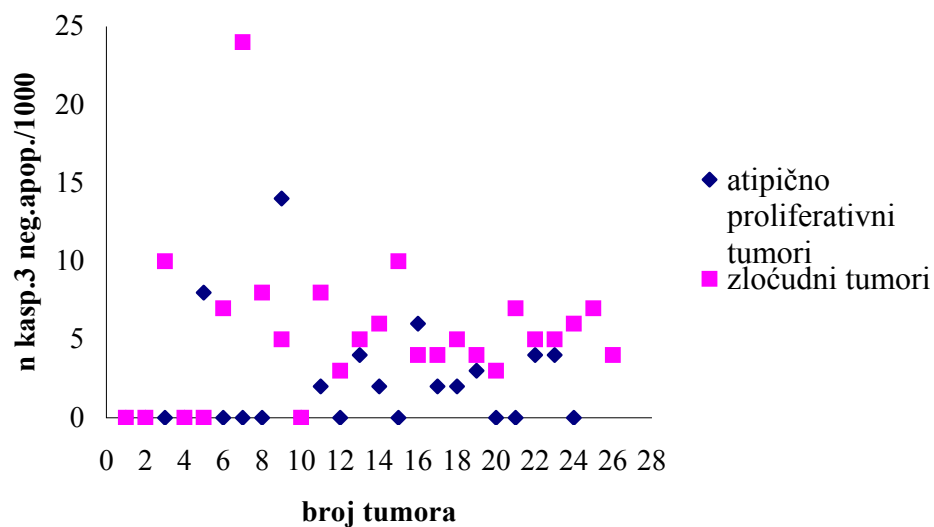
4.2. Izražaj kaspaze 3 u apoptotskim stanicama atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika

Raspon broja kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica na 1000 izbrojenih tumorskih stanica u 24 atipično proliferativna serozna tumora jajnika bio je od 3 do 28 što ukazuje na činjenicu da su svi tumori imali kaspaza 3 pozitivne apoptotske stanice (slika 7).



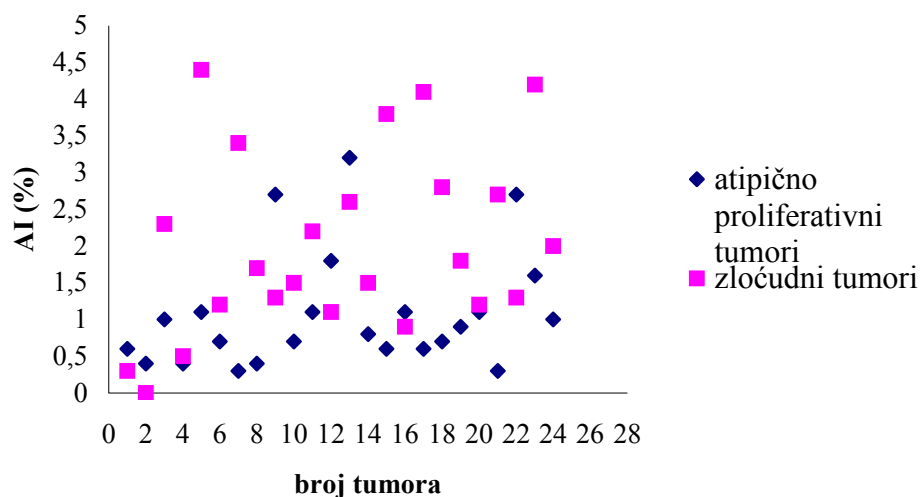
Slika 7. Dijagram prikazuje broj kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica u atipično proliferativnim seroznim tumorima i zloćudnim seroznim tumorima jajnika.

Raspon broja kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica na 1000 izbrojenih tumorskih stanica u 24 atipično proliferativna serozna tumora jajnika bio je od 0 do 14 (slika 8).



Slika 8. Dijagram prikazuje broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica u atipično proliferativnim seroznim tumorima i zloćudnim seroznim tumorima jajnika.

U 13 tumora od ukupno 24 (54%) nisu pronađene kaspaza 3 negativne apoptotske stanice. Apoptotski indeks atipično proliferativnih seroznih tumora bio je od 0.3 % do 3.2 % (slika 9). Medijani izmjerenih varijabli prikazani su u Tablici 2.



Slika 9. Dijagram prikazuje AI (%) u atipično proliferativnim seroznim tumorima i zloćudnim seroznim tumorima jajnika.

Tablica 2. U tablici su prikazani medijani mjerenih varijabli za atipično proliferativne i zloćudne serozne tumore jajnika.

tip tumora	MEDIJANI		
	kaspaza 3 poz. apopt.	kaspaza 3 neg. apopt.	AI
atipično proliferativni	6	0	0.850
zloćudni	12.5	5	1.850

4.3. Izražaj kaspaze 3 u apoptotskim stanicama zloćudnih seroznih tumora jajnika

Zloćudni serozni tumori jajnika imali su raspon od 0 do 44 kaspaza 3 pozitivne apoptotske stanice na 1000 izbrojenih tumorskih stanica. (slika 7)

Raspon broja kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica na 1000 izbrojenih tumorskih stanica u 26 zloćudnih seroznih tumora jajnika bio je od 0 do 24 (slika 8), od čega pet tumora (19%) nije imalo kaspaza 3 negativne apoptotske stanice. Apoptotski indeks zloćudnih seroznih tumora jajnika bio je od 0% do 4,4% (slika 9). Medijani izmjerenih varijabli prikazani su u Tablici 2.

4.4. Statistička analiza izmjerenih varijabli

Povezanost broja kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica i kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica unutar pojedine skupine tumora nije pokazao statistički značajnu korelaciju (Spearmanov test, $p > 0.05$).

Broj kaspaza 3 pozitivnih apoptotskih stanica veći je u skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika, nego u skupini atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika što je pokazao Mann-Whitney-ev test usporedbe dvije skupine tumora sa statističkom značajnošću $p = 0.011$.

Broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica statistički je značajno veći u skupini zloćudnih seroznih tumora što je također pokazao Mann-Whitney-ev test usporedbe dvije skupine tumora sa statističkom značajnošću $p = 0.001$.

Apoptotski indeks zloćudnih seroznih tumora jajnika pokazao je statistički značajnu razliku u odnosu na atipično proliferativne serozne tumore jajnika (Mann-Whitney test, $p = 0.001$).

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je apoptotski indeks seroznih zloćudnih tumora jajnika statistički značajno veći u odnosu na apoptotski indeks seroznih atipično proliferativnih tumora, što je u skladu s dosadašnjim studijama koje su istraživale apoptozu u tumorima jajnika različitog biološkog potencijala (60,61).

U apoptozi tumora kaspaza 3 se smatra najznačajnijom kaspazom i najviše je istraživana. (62). Materna i sur. su pokazali da pacijentice u čijim tumorima nije dokazana aktivna kaspaza 3 imaju bolju prognozu i ukupno preživljenje. Zaključili su da manje agresivni tumori imaju manji broj apoptotskih stanica. Kod pacijentica koje su primile kemoterapiju njih 47% imalo je izražaj kaspaze 3 u više od 50% tumorskih stanica, što je statistički značajno utjecalo na bolju prognozu i ukupno preživljenje ovih pacijentica, a autori su zaključili da su kemoterapeutici potakli kaspaza ovisnu apoptotsku smrt tumorskih stanica (53).

Međutim, Devarajan i sur u istraživanjima karcinoma dojke u 75% slučajeva nisu dokazali kaspazu 3 što smatraju jednim od značajnih razloga za rezistenciju ovih tumora na citostatike koji potiču staničnu smrt apoptozom (63). I druge studije na staničnim kulturama različitih tumora pokazale su da je inaktivacija kaspaze 3 povezana s rezistencijom na tumorsku terapiju (57,63,64), pa su najnovija istraživanja usmjerena na neke druge molekule koje u stanici mogu izazvati apoptozu kaspaza-neovisnim putem (65).

U ovom istraživanju u obje skupine tumora pronađene su kaspaza 3 negativne apoptotske stanice i to u 81% zloćudnih seroznih tumora jajnika (21 od 26 tumora) i 46% atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika (11 od 24 tumora). Ova činjenica upućuje na prisutnost kaspaza 3 neovisnog puta apoptoze u oba tipa tumora, što je važno ako se uzme u obzir da je cilj terapijskog pristupa poticanje samo kaspaza ovisne apoptoze. Broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica bio je statistički značajno veći (Mann-Whitney test, $p=0.001$) u zloćudnim

seroznim tumorima jajnika (medijan-6) u odnosu na atipično proliferativne serozne tumore jajnika (medijan-0). Prisutnost kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica u dijelu atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika (46% od ukupnog broja tumora) je značajna, jer bi mogla barem dijelom objasniti dosadašnja saznanja o ovim tumorima koji se u literaturi opisuju kao homogena skupina tumora iako se s obzirom na prognozu i odgovor na terapiju ponašaju različito (47).

Važno je spomenuti da u ovom istraživanju kaspaza 3 pozitivne i kaspaza 3 negativne apoptotske stanice unutar pojedine skupine nisu u korelaciji jer su rezultati imunohistokemijskog bojenja pokazali da pojedini tumori mogu imati kaspaza 3 pozitivnu apoptozu i kaspaza 3 negativnu apoptozu istovremeno, te da ovi procesi ne isključuju jedan drugoga. U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da iako kaspaza ovisni i kaspaza neovisni put djeluju istovremeno, kaspaza ovisni put može biti manje učinkovit tijekom kemoterapije koja za cilj ima indukciju apoptoze ovisne o kaspazama (66). Analizom naših rezultata može se zaključiti da u tumorima jajnika koegzistiraju oba puta apoptoze .

U ovom radu dokazano je da kaspaza neovisni put postoji u seroznim tumorima jajnika, te da je izraženiji u zloćudnim seroznim tumorima jajnika što bi upućivalo na činjenicu da se u progresiji tumora jajnika događaju promjene u apoptotski putevima. Atipično proliferativni serozni tumori su heterogena skupina s obzirom na pojavu kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica. Kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica ima značajno manje u atipično proliferativnim seroznim tumorima jajnika u odnosu na zloćudne serozne tumore jajnika što je sukladno do sada provedenim istraživanjima da određeni putevi apoptoze mogu biti inaktivirani u različitim stadijima tumora (67).

U daljnjim istraživanjima bilo bi važno istražiti povezanost kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica s prognozom i terapijskim odgovorom u ovih pacijentica u obje skupine

tumora jajnika, jer bi dobiveni rezultati o promjenama u apoptotskim putevima mogli doprinijeti istraživanju tumorske terapije i reklasifikaciji atipično proliferativnih tumora jajnika.

6. ZAKLJUČCI

- Apoptotski indeks zloćudnih seroznih tumora jajnika (med (AI (%))-1.850) je statistički značajno veći u odnosu na apoptotski indeks atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika (med (AI (%))- 0.850) što potvrđuje pretpostavku da tumori benignijeg biološkog ponašanja imaju manji broj apoptotskih stanica.
- U skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika i u skupini atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika pronađene su kaspaza 3 negativne apoptotske stanice što potvrđuje pretpostavku da u tumorima jajnika postoji kaspaza neovisni put apoptoze.
- Broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica određen je u 81% zloćudnih seroznih tumora jajnika i 46% atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika. Ukupni broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica statistički je značajno veći u skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika u odnosu na skupinu atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika (Mann Whitney test, $p=0.001$).
- Unutar jedne skupine tumora broj kaspaza 3 pozitivnih i kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica nije u korelaciji što upućuje na mogućnost da u pojedinim tumorima može biti istovremeno aktivan kaspaza ovisni i kaspaza neovisni put apoptoze.

7. SAŽETAK

Cilj: Cilj istraživanja bio je imunohistokemijski istražiti postoje li kaspaza 3 negativne apoptotske stanice u atipično proliferativnim seroznim tumorima i invazivnim seroznim tumorima jajnika, te odrediti koliki je njihov udio u oba tipa tumora.

Metode: Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split primjenom imunohistokemijske metode istraživanja na parafinskim presjecima seroznih tumora jajnika pacijentica operiranih na Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split u razdoblju od 1989.-2005. godine. Nakon revizije patohistoloških nalaza tumori su podijeljeni po biološkom ponašanju na atipično proliferativne serozne tumore i invazivne serozne tumore jajnika prema SZO klasifikaciji. U skupini atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika bilo je 24 pacijentice, a u skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika 26 pacijentica. Parafinski rezovi odabranih tumora bojeni su primarnim protutijelom za aktivni oblik kaspaze 3, a kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo tonzile. Svjetlosnim mikroskopom analizirane su kaspaza 3 pozitivne i kaspaza 3 negativne apoptotske stanice, te je semikvantitativnim putem određen njihov broj (broj apoptotskih stanica na 1000 tumorskih stanica). Svako bojenje apoptotske stanice interpretirano je kao pozitivno bez obzira na intenzitet, dok je nedostatak obojenosti u apoptotskim stanicama opisivao kao kaspaza 3 negativna apoptotska stanica. Za analizu navedenih rezultata korišten je Statistički paket za društvene znanosti, verzija 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL USA). Statistička značajnost određena je s vrijednošću $p < 0.05$.

Rezultati: Rezultati istraživanja utvrdili su da u obje skupine seroznih tumora jajnika pronalazimo kaspaza 3 negativne apoptotske stanice.

Apoptotski indeks zloćudnih seroznih tumora jajnika (med (AI (%))-1.850) je statistički značajno veći u odnosu na apoptotski indeks atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika (med (AI (%))- 0.850).

Broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica određen je u 81% zloćudnih seroznih tumora jajnika i 46% atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika. Ukupni broj kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica statistički je značajno veći u skupini zloćudnih seroznih tumora jajnika u odnosu na skupinu atipično proliferativnih seroznih tumora jajnika (Mann Whitney test, $p=0.001$).

Unutar jedne skupine tumora broj kaspaza 3 pozitivnih i kaspaza 3 negativnih apoptotskih stanica nije u korelaciji što upućuje na mogućnost da u pojedinim tumorima može biti istovremeno aktivan kaspaza ovisni i kaspaza neovisni put apoptoze.

Zaključak: U ovom radu dokazano je da kaspaza neovisni put postoji u seroznim tumorima jajnika, te da je izraženiji u zloćudnim seroznim tumorima jajnika što bi upućivalo na činjenicu da se u progresiji tumora jajnika događaju promjene u apoptotski putevima. Također je važno spomenuti da kaspaza 3 pozitivne i kaspaza 3 negativne apoptotske stanice unutar pojedine skupine tumora nisu u korelaciji iz čega možemo zaključiti da u tumorima jajnika koegzistiraju oba puta apoptoze.

8. SUMMARY

Aim: The aim of this study was to determine the immunohistochemical expression of active caspase 3 in borderline and invasive serous ovarian tumors and to define their proportion in both types of ovarian tumors.

Methods: This investigation was conducted in Department of Pathology, University Hospital of Split. Immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded tissue samples of serous ovarian tumors from patients operated between 1989 and 2005 at Clinic of Gynaecology and Obstetrics, University Hospital of Split.

After revision of pathohistological findings tumors were divided by biological behavior into the borderline and invasive serous ovarian tumors by WHO classification. Borderline tumor group had 24 patients while invasive tumor group had 26 patients.

Paraffin-embedded tissue samples of selected tumors were stained by active caspase 3 primary antibody; tonsillar tissue was used as positive control.

Apoptotic cells were detected by light microscopy and determined as caspase positive or negative cells. Immunohistochemical results were scored semi-quantitatively (the number of apoptotic cells on 1000 tumors cells). Each staining of apoptotic cells was considered positive regardless the intensity of staining itself. Lack of staining in apoptotic cells was determined as caspase 3 negative apoptotic cells. Data were analyzed using SPSS version 11.0 and statistical significance was determined as $p < 0.05$.

Results: In both groups of serous ovarian tumors we ascertain caspase 3 negative apoptotic cells.

Apoptotic index of invasive serous ovarian tumors (med (AI (%))-1.850) was significantly higher than apoptotic index of borderline serous ovarian tumors (med (AI (%))-0.850).

In a group of invasive serous ovarian tumors 81 % of them expressed caspase 3 negative cells in comparison with 46% of borderline serous ovarian tumors.

The total number of caspase 3 negative apoptotic cells was significantly higher in a group of invasive serous ovarian tumors comparing to group of borderline serous ovarian tumors (Mann Whitney test, $p=0.001$).

Among one group of tumors the number of caspase 3 positive and caspase 3 negative apoptotic cells was not in correlation. This finding implies the possibility of caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathway in the same tumor.

Conclusion: This study proves that caspase-independent pathway exists in serous ovarian tumors with higher expression among invasive serous ovarian tumors. This finding implies that during tumor progression changes in apoptotic pathways appears.

Caspase 3 positive and caspase 3 negative apoptotic cells within each group of tumors are not in correlation proving that both apoptotic pathways coexist in serous ovarian tumors.

9. LITERATURA

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
2. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:97-104.
3. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2003;171:4672-9.
4. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-8.
5. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:5-17.
6. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
7. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415-30.
8. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367-401.
9. Vermes IHC, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-90.
10. Davis AM, Ryan HD. Review article Apoptosis in the kidney. *Toxicol Pathol* 1998;26:810-25.
11. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 2000;7:2-15.
12. Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-16.
13. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
14. Cör A, Pižem J, Gale N. Immunohistochemical analysis of pro- and active-caspase 3 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2004;444:439-46.

15. Žlender V. Apoptosis-programmed cell death. *Arh Hig Rada Toksikol* 2003;54:267-74.
16. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-12.
17. Vaux DL. Apoptosis and toxicology-what relevance? *Toxicology* 2002;181-182:3-7.
18. Faubion W, Gores G. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4.
19. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, i sur. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849-52.
20. Komarova AE, Gudkov VA. Chemoprotection from p53- dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001;62:657-67.
21. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-74.
22. Labar B. Molekularna genetika – budućnost onkologije. *Medicus* 2001;10:141-5.
23. Zimmermn KC, Douglas RG. How cells die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immuno* 2001;108:99-103.
24. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinvasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, i sur. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
25. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Aeing Dev* 2002;123:245-60.
26. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, i sur. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410:549-54.
27. Widlak P, Li YL, Wang X, Garrard TW. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem* 2001;276:48404-09.

28. Susin AS, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, i sur. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192:571-9.
29. Castedo M, Ferri K, Roumier T, Me'tivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:39-47.
30. Martinvalent D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005;22:355-70.
31. Qi R, Liu XY. New advance in caspase-independent programmed cell death and its potential in cancer therapy. *IJBS* 2006;2:211-6.
32. Jones BE, Lo CR, Liu H, Srinivasan A, Streetz K, Valentino KL, i sur. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* 2000;275:705-12.
33. Guo Y, Chen C, Zheng Y, Zhang J, Tao X, Liu S, i sur. A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2005;280:41940-52.
34. Lockshine RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 2004;23:2766-73.
35. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, i sur. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297:259-63.
36. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:259-64.
37. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia. In: Robbins and Cotran. *Pathologic Basis of Disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2005;p.269-343.
38. Soini Y, Pääkkö P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 1998;153:1041-53.

39. Shinohara T, Ohshima K, Murayama H, Kikuchi M, Yamashita Y, Shirakusa T. Apoptosis and proliferation in gastric carcinoma: the association with histological type. *Histopathology* 1996;29:123-9.
40. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V-M, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994;30:2068-73.
41. Cohen GM. Caspase: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-6.
42. Mashima T, Tsuruo T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. *Drug Resist Update* 2005;8:339-43.
43. Lowe WS, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485-95.
44. Tewari M, Dixit VM. Fas-and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 1995;270:3255-60.
45. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, et al. Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 1998;9:267-76.
46. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14559-63.
47. Lee KR, Tavassoli FA, Prat J, Dietel M, Gersell DJ, Karseladze AI, et al. Surface epithelial-stromal tumours. In: Tavassoli FA, Devilee P, ed. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press: Lyon 2003; p. 113-24.
48. Jukić S. Tumori jajnika-patologija. U: Ćorušić A, Babić D, Šamija M, Šobat H, ur. *Ginekološka onkologija*. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2005: str. 295-311.

49. Čorušić A. Dijagnostika, staging i kirurško liječenje raka jajnika i jajovoda. U: Čorušić A, Babić D, Šamija M, Šobat H, ur. Ginekološka onkologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2005: str. 329-52.
50. Russel P. Surface Epithelial-Stromal Tumors of the Ovary. U: Kurman JR ur. Blaustein's Pathology of the Female Genitale Tract. 4. izd. New York: Springer-Verlag, 1994: str. 705-82.
51. Jukić S, Babić D, Ilić-Forko J, Nola M. Bolesti ženskog spolnog sustava. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, ur. Patologija 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada 2008; str. 580-82.
52. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Suchocki S, Kedzia W, i sur. Decreased expression of p16 in ovarian cancers represents an unfavourable prognostic factor. *Histol Histopathol* 2008;23:531-8.
53. Materna V, Surowiak P, Markwitz E, Spaczynski M, Drag-Zalesinska M, Zabel M, i sur. Expression of factors involved in regulation of DNA mismatch repair- and apoptosis pathways in ovarian cancer patients. *Oncol Rep* 2007;17:505-16.
54. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53 and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5168-77.
55. Tachibana M, Watanabe J, Matsushima Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fujimura M, i sur. Independence of the prognostic value of tumor suppressor protein expression in ovarian adenocarcinomas: a multivariate analysis of expression of p53, retinoblastoma and related proteins. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:598-606.
56. McMenamin ME, O'Neill AJ, Gaffney EF. Extent of apoptosis in ovarian serous carcinoma: relation to mitotic and proliferative indices, p53 expression and survival. *J Clin Pathol:Mol Pathol* 1997;50:242-6.

57. Yang X, Zheng F, Xing H, Gao Q, Wei W, Lu Y, i sur. Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:423-8.
58. Wolf BB, Schuler M, Li W, Eggers-Sedlet B, Lee W, Taylor P, i sur. Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J Biol Chem* 2001;276:34244-51.
59. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:639-49.
60. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell A, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000; 156:409-417.
61. De la Torre FJ, Garcia A, Gil-Moreno A, Planaguma J, Reventos J, Cajal SR, i sur. Apoptosis in epithelial ovarian tumours Prognostic significance of clinical and histopathologic factors and its association with the immunohistochemical expression of apoptotic regulatory proteins (p53, bcl-2 and bax). 2007;130:121-8.
62. Krajewska M, Wong H, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Goscoyne R, i sur. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase 3), a cell death protease. *Cancer Res* 1997;57:1605-13.
63. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, i sur. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002;21:8843-51.
64. Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cell to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001;61:348-54.

65. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002;115:4727-34.
66. Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 2005; 103:1551-60.
67. Mashima T, Tsuruo T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. *Drug Resist Update* 2005;8:339-43.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

ime i prezime: Ana Čarić
datum rođenja: 15. rujna 1976.
mjesto rođenja: Split
adresa na poslu: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju
KBC Split, PAK, Spinčičeva 1
telefon na poslu: +38521556528
mobitel: +385(0)992141983
e-mail: anacacic@mefst.hr

OBRAZOVANJE

1991. – 1995. III. Gimnazija Split
1995. – 2001. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2001. diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu
2003. položila državni ispit
2002. – 2004. Poslijediplomski znanstveni studij Temeljne i kliničke medicinske znanosti, smjer Klinička medicina

RADNO ISKUSTVO

2001. – 2002. pripravnički staž u KBC Split
2003. – 2006. Oktal Pharma d. o. o., Zagreb, stručni suradnik
2007. – 10. mjeseca 2007. Astra Zeneca d.o.o., Zagreb, stručni suradnik
od 10. mjeseca 2007. Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, suradničko zvanje asistenta

KONGRESI

16th EUROCONFERENCE ON APOPTOSIS and 5th SWISS APOPTOSIS
MEETING & 5th Training course on " Concepts and Methods in Programmed Cell
Death" ; Bern, Switzerland, September 6-9, 2008.

- poster "**Caspase 3 immunohistochemical expression in borderline and
invasive serous ovarian tumors**" Ana Čarić, Ana Poljičanin, Vana Košta,
Ivana Prović, Snježana Tomić, Katarina Vilović

OSTALE AKTIVNOSTI I VJEŠTINE

- aktivno služenje engleskim i talijanskim jezikom
- poznavanje rada na PC-u