

# Analiza częstości występowania proapoptycznych białek p53 i p21 w nabłonkowych guzach jajnika

Incidence of proapoptotic proteins p53 and p21 in epithelial ovarian tumors

Małgorzata Gajewska<sup>1</sup>, Mirosław Wielgoś<sup>1</sup>, Grzegorz Panek<sup>1</sup>, Janina Marczevska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii, WUM, Warszawa, Polska

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Patomorfologii WUM, Warszawa, Polska

## Streszczenie

**Cel pracy:** Celem pracy była ocena ekspresji białek p53 i p21 w gruczolakach, guzach o granicznej złośliwości oraz w rakach jajnika, a także ocena korelacji pomiędzy badanymi białkami a wybranymi parametrami guzów jajnika.

**Materiał i metody:** Analizie poddano 66 pacjentek operowanych z powodu nabłonkowego guza jajnika. Wyróżniono trzy grupy pacjentek: z gruczolakiem jajnika, z guzem o granicznej złośliwości i z rakiem jajnika. Ekspresję białek oceniano w badaniu immunohistochemicznym, wykorzystując przeciwciała anty p53 i anty p21.

**Wyniki:** Najwyższą wartość średnią dla parametru p53 stwierdzono w grupie guzów złośliwych (50,12±39,52), dla parametru p21 najwyższą średnią wartość stwierdzono w grupie guzów o granicznej złośliwości (24,41±24,43). Analiza wykazała istnienie ujemnej zależności między stopniem zaawansowania nowotworu a parametrami p21(+++), p21(++), p21(+). Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją białek p53 i p21 a typem histologicznym raka jajnika.

**Wnioski:** Ocena białek p53 i p21 może być kosztownym, ale pomocnym narzędziem w trudnych diagnostycznie sytuacjach. Pozytywna reakcja dla białka p53 może być obecna zarówno w łagodnych jak i złośliwych guzach jajnika, jednak w przypadku raka ma ona istotnie większe natężenie.

Słowa kluczowe: **p53 / p21 / gruczolak jajnika / guz graniczny / rak /**

## Abstract

**Objective:** The aim of the study was to evaluate the expression of proapoptotic proteins p53 and p21 in cystadenomas, borderline tumors and ovarian cancers. The correlation between proapoptotic proteins and selected parameters of ovarian tumors was also assessed.

**Material and methods:** The study group consisted of 66 patients operated on because of epithelial ovarian tumor. The study group was further divided into three subgroups: cystadenomas, borderline tumors and ovarian cancers.

## Adres do korespondencji:

Małgorzata Gajewska  
I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii, WUM  
Polska, 02-015 Warszawa, Pl. Starynkiewicza 1/3  
tel./fax.: 22 502 14 30  
e-mail: ma.gajewska@gmail.com

Otrzymano: 01.07.2013  
Zaakceptowano do druku: 30.10.2013

Małgorzata Gajewska et al. Analiza częstości występowania proapoptycznych białek p53 i p21 w nabłonkowych guzach jajnika.

**Results:** The average value of p53 was the highest in the ovarian cancer group ( $50.12 \pm 39.52$ ), whereas average value for p21 was the highest in patients with borderline tumors ( $24.41 \pm 24.43$ ). There was a negative correlation between tumor stage and parameters of p21(+++), p21(++), p21(+) but no correlation was found between the expression of p53, p21 and histological type of ovarian cancer.

**Conclusion:** The assessment of p53 and p21 can be expensive, but it proves to be a useful tool in difficult cases. Positive reaction to p53 can be noted in both, benign and malignant ovarian tumors, but in case of cancer its intensity is notably stronger.

Key words: **p53 / p21 / cystadenoma of ovary / borderline tumor / cancer /**

## Wstęp

Nowotwory nabłonkowe jajnika są najliczniejszą grupą pierwotnych nowotworów żeńskiej gonady. Odpowiadają za 60% wszystkich guzów jajnika [1]. Zmiany łagodne stanowią około 56% wszystkich nowotworów tej grupy, raki – 30%, 14% stanowią natomiast opisane po raz pierwszy przez Taylora w 1929 roku guzy o granicznym potencjale złośliwości [2].

Mutacja białka p53 i zaburzenie szlaku apoptozy odpowiada za powstanie wielu nowotworów złośliwych, w tym raka jajnika. Białko to, będące produktem genu *TP53* zlokalizowanego na chromosomie 17, hamuje powstawanie fenotypu nowotworowego komórki. W przypadku wykrycia uszkodzenia DNA ma ono zdolność zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 poprzez aktywację genów *WAF1/CIP1* i *GADD 45*, a następnie bezpośrednią aktywację białek biorących udział w naprawie DNA. Jeżeli naprawa uszkodzeń jest niemożliwa białko to odgrywa główną rolę w indukcji apoptozy, pobudzając transkrypcję szeregu genów proapoptotycznych (*BAX*, *BAD*, *BID*, *NOXA*, *PUMA*) i blokując inhibitory apoptozy (*BCL2*). Cała ta kaskada aktywowanych genów i ich produktów białkowych doprowadza do wzrostu poziomu kaspaz – proteaz, które powodują degradację wnętrza komórki i jej programową śmierć [3]. W prawidłowej komórce, niepoddanej żadnemu stresowi białko p53 występuje w formie nieaktywnej, a okres jego półtrwania wynosi 10 – 20 minut [4.] W komórkach narażonych na czynniki uszkadzające DNA, w wyniku fosforylacji powstaje aktywny homotetramer („dzikie białko” - niezmutowane), który akumuluje się w jądrze komórkowym wskutek wydłużenia okresu półtrwania. Zmutowane białko przebywa w komórce do 12 godzin, dzięki temu może być wykrywane metodami immunohistochemicznymi [4].

Białko p21, produkt genu *WAF1/CIP1*, aktywowane przez białko p53, zatrzymuje cykl komórkowy głównie w fazie G1, celem naprawy uszkodzeń DNA, zanim komórka wejdzie w fazę syntezy. Białko to unieczynnia kompleks cykliny – kinaza, którego aktywna - ufosforylowana postać uwalnia czynnik transkrypcyjny E2F z jego połączenia z białkiem retinoblastomy i wprowadza komórkę w fazę syntezy [5].

## Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji białek p53 i p21 w gruczolakach, guzach o granicznej złośliwości oraz w rakach jajnika, a także ocena korelacji pomiędzy badanymi białkami a typem histologicznym guza jajnika. W przypadku raka jajnika - analiza korelacji pomiędzy poziomem ekspresji białek p53 i p21 a stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu i stopniem histologicznego zróżnicowania.

## Materiał i metody

Analizie poddano 66 pacjentek operowanych z powodu nabłonkowego guza jajnika w I Klinice Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2008 – 2011.

Zakres operacji uzależniano od śródoperacyjnego wyniku badania guza, po wcześniejszej rozmowie z pacjentką i wyrażeniu przez nią zgody na wszystkie możliwe warianty postępowania. U wszystkich pacjentek wyniki badania śródoperacyjnego były zgodne z ostatecznymi wynikami histopatologicznymi badanych guzów.

Na podstawie badania histopatologicznego wyróżniono trzy grupy pacjentek: z gruczolakiem jajnika, z guzem o granicznej złośliwości i z rakiem jajnika.

Pierwszą grupę stanowiło 20 kobiet w wieku 34-79 lat (śr.  $60,3 \pm 10,35$ ) z gruczolakiem jajnika. U jednej – 34-letniej pacjentki (5%) usunięto jednostronnie przydatki wraz z guzem, u pozostałych 19 (95%) pomenopauzalnych kobiet usunięto macicę z przydatkami. U sześciu kobiet (30%) stwierdzono obustronne występowanie zmian.

Drugą grupę stanowiło 16 pacjentek w wieku 22-83 lata (śr.  $57,06 \pm 18,02$ ) z guzem jajnika o granicznej złośliwości. U dwunastu pacjentek wycięto macicę z przydatkami i sieć. U trzech kobiet przed 40 rokiem życia, z uwagi na chęć zachowania płodności, usunięto przydatki po jednej stronie oraz sieć. U jednej, 83-letniej kobiety, po uzyskaniu wyniku badania śródoperacyjnego, ze względu na liczne obciążenia internistyczne oraz zrosty po przebytych operacjach usunięto obustronnie przydatki wraz z siecią. U dwóch pacjentek stwierdzono obustronne występowanie zmian.

Trzecią grupę – z rakiem jajnika, stanowiło 30 pacjentek w wieku 41-82 lata (śr.  $60,56 \pm 10,28$ ). U 24 kobiet (80%) przeprowadzono pierwotną optymalną cytoredukcję, bez pozostawienia makroskopowych ognisk nowotworu. We wczesnych stadiach zaawansowania nowotworu usuwano macicę z przydatkami, sieć, wykonano biopsję węzłów chłonnych biodrowo-zasłonowych, pobrano liczne wycinki z otrzewnej oraz płyn do badania cytologicznego.

W przypadkach wyższego zaawansowania nowotworu usuwano macicę z przydatkami, sieć i wykonywano optymalną cytoredukcję. U 6 (20%) kobiet ze względu na zaawansowanie procesu nowotworowego i brak możliwości przeprowadzenia optymalnej operacji, zabieg ograniczono do jednostronnego usunięcia przydatków z guzem (5 pacjentek) lub pobrania wycinków (1 pacjentka). U 14 (46,7%) chorych stwierdzono pierwszy stopień klinicznego zaawansowania raka jajnika, u 2 (6,6%) – II, u 14 (46,7%) – III. U dwóch chorych rozpoznano współwystępowanie

Małgorzata Gajewska et al. Analiza częstości występowania proapoptycznych białek p53 i p21 w nabłonkowych guzach jajnika.

wysokozróżnicowanego gruczolakoraka endometrioidalnego jajnika i endometrium.

Ze względu na obustronne występowanie zmian do analizy włączono 18 guzów w grupie 16 kobiet ze zmianami o granicznej złośliwości oraz 26 guzów u 20 kobiet z gruczolakiem jajnika. W grupie chorych z rakiem jajnika ze względu na znaczne zaawansowanie procesu nowotworowego oraz brak możliwości przeprowadzenia u wszystkich pacjentek optymalnej cytoredukcji, badano tkanki jednego (większego) jajnika.

Materiał operacyjny do badań histopatologicznych był utrwalany w 10%, zbuforowanej formalinie. W zależności od wielkości guza nowotworowego pobierano od 3 do 6 wycinków. Wycinki przeprowadzono do bloczków parafinowych w sposób typowy. Uzyskane następnie skrawki grubości 4 mikronów barwiono: hematoksyliną z eoźną, mucykarminem oraz poddano badaniu immunohistochemicznemu.

Ocena stopnia złośliwości nowotworów została ustalona na podstawie ich cech morfologicznych i cytologicznych rekomendowanych przez WHO:

- Polimorfizm komórkowy.
- Proliferacja i nawarstwianie się komórek.
- Osłabienie więzi międzykomórkowych.
- Stosunek komórek nowotworu do podścieliska.

W oparciu o te cechy guzy zostały podzielone na nowotwory: łagodne, o granicznym stopniu złośliwości i złośliwe.

Dodatkowo wykonano także badania immunohistochemiczne z przeciwciałami anty-p53 i anty-p21.

### Reakcje peroksydazowe

Reakcje przeprowadzono na skrawkach odparafinowanych w sposób rutynowy, które następnie poddano procedurze odzyskiwania antygenów przez działanie wysokiej temperatury (kuchenka mikrofalowa 2x 5 minut, 750W) w buforze cytrynianowym o pH 6. Endogenną aktywność peroksydazową inaktywowano w 0,3% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) pH 7,4, natomiast miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał blokowano 1,0% roztworem albuminy wołowej (BSA) (SIGMA) w PBS – obydwie etapy przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym rozcieńczonym 1,0% BSA przez noc w temperaturze 4°C w komorze wilgotnej. Po wypłukaniu skrawków 3 razy przez 5 minut w PBS przeprowadzono 30 minutową inkubację z przeciwciałem II-rzędowym, którym było świńskie biotylinowane przeciwciało rozpoznające immunoglobuliny mysie, królicze i kozie (odczynnik gotowy, niewymagający rozcieńczeń – LSAB, DAKO).

Po kolejnej serii płukan skrawki inkubowano przez 30 minut ze streptowidyną znakowaną peroksydazą chrzanową (odczynnik gotowy, nie wymagający rozcieńczeń – LSAB, DAKO). Reakcję wywoływano roztworem diaminobenzydyny (DAB) w buforze imidazolowym (DAKO). Skrawki podbarwiano hematoksyliną i po odwodnieniu zamykano w medium (DPX) (Merck).

Oceniając reakcję immunohistochemiczną na białko p53 i p21 brano pod uwagę odsetek komórek o wybarwionych jądrach i stopień nasilenia reakcji z przeciwciałem (ocena wykonana przez trzech, niezależnych diagnostów).

Liczbę komórek dodatnich wyrażono w procentach oceniając 500 komórek nowotworowych po 100 komórek w pięciu polach widzenia ( przy powiększeniu 400x).

Nasilenie reakcji z białkiem p53 i p21 oceniono półilościowo w czterostopniowej skali:

0 brak reakcji, + oznacza reakcję o słabej intensywności, ++ reakcję o umiarkowanym nasileniu, +++ o dużej intensywności.

Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując testy: t-Studenta, test Manna-Whitneya, Kruskala-Wallisa oraz Fishera.

## Wyniki

Zanalizowano obraz histopatologiczny nabłonkowych guzów jajnika. W grupach kobiet z gruczolakiem jajnika i z guzem o granicznej złośliwości stwierdzono wyłącznie typ surowicy i śluzowy nowotworu. U chorych z rakiem jajnika najczęściej występował typ surowicy i endometrioidalny. (Tabela I.)

### I. Białko p53

Dokonano porównania średnich wartości procentowych wybarwionych jąder przeciwciałem anty p53 między trzema analizowanymi grupami.

Pozytywny wynik reakcji w barwieniu przeciwciałem anty p53 uzyskano u 27 (90%) pacjentek z rakiem jajnika, u 15 (93,75%) w grupie guzów granicznych i u wszystkich pacjentek z guzami łagodnymi jajnika. (Tabela II). Najwyższą średnią wartość parametru p53 (odsetek wybarwionych jąder) stwierdzono w grupie guzów złośliwych (50,12±39,52), najniższą w grupie guzów granicznych (16,06±16,02). Analiza wykazała, że pomiędzy tymi grupami występują istotne statystycznie różnice (p=0,0178). Nie ma różnic istotnych statystycznie między średnimi dla guzów złośliwych i łagodnych (50,12±39,52 vs 20,80±17,54) oraz dla guzów łagodnych i granicznych (20,80±17,54 vs 16,06±16,02).

Przeanalizowano natężenie reakcji dla białka p53 w trzech grupach badanych. Średni odsetek intensywnie wysyconych jąder, p53 (+++) w grupie guzów złośliwych, był istotnie wyższy w porównaniu do grupy guzów łagodnych, (27,36±34,60 vs 0,55±0,83, p=0,006437). Wyższy był również w porównaniu do grupy guzów granicznych, wartości nie były jednak istotne statystycznie (27,36±34,60 vs 0,61±0,85).

Dla parametru p53(++) różnice istotne statystycznie występowały tylko między guzami złośliwymi i granicznymi (12,26±14,85 vs 2,74±3,79, p=0,038346). Nie było istotnych różnic dla średnich wartości parametru p53(+) pomiędzy trzema badanymi grupami. (Tabela III).

### II. Białko p21

Dokonano porównania średnich wartości procentowych wybarwionych jąder przeciwciałem anty p21 w trzech grupach badanych.

Pozytywny wynik reakcji na barwienie przeciwciałem anty p21 uzyskano u 22 (73%) pacjentek z rakiem jajnika, u 15 (93,75%) w grupie guzów granicznych i u wszystkich pacjentek z guzami łagodnymi jajnika. (Tabela IV.) Najwyższe, średnie wartości parametru p21 (odsetek wybarwionych jąder) uzyskano w grupie guzów granicznych, najniższe w grupie guzów złośliwych, różnica jest istotna statystycznie (24,41±24,43 vs 7,70±8,59, p=0,027327). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między średnimi wartościami parametru p21 dla guzów złośliwych i łagodnych (7,70±8,59 vs 8,61±9,01) oraz dla guzów łagodnych i granicznych (8,61±9,01 vs 24,41±24,43), chociaż różnica między guzami łagodnymi i granicznymi była bliska wartości granicznej 0,05.

Małgorzata Gajewska et al. Analiza częstości występowania proapoptycznych białek p53 i p21 w nabłonkowych guzach jajnika.

Tabela I. Typy histopatologiczne guzów jajnika w badanych grupach.

| Typ histopatologiczny guza | gruczolak n (%) | guz graniczny n (%) | rak n (%) |
|----------------------------|-----------------|---------------------|-----------|
| surowiczy                  | 20 (77)         | 14 (78)             | 12 (40)   |
| Śluzowy                    | 6 (23)          | 4 (22)              | 2 (6,7)   |
| Typ szyjkowy               | 6               | 3                   | 1         |
| Typ jelitowy               | ---             | 1                   | 1         |
| endometrioidalny           | ---             | ---                 | 9 (30)    |
| jasnokomórkowy             | ---             | ---                 | 3 (10)    |
| transitional               | ---             | ---                 | 1 (3,3)   |
| złośliwy guz Brennera      | ---             | ---                 | 1 (3,3)   |
| anaplastyczny              | ---             | ---                 | 2 (6,7)   |

Tabela II. Średnie odsetki wybarwionych komórek dla p53 w trzech grupach badanych.

|           | >50% komórek | 10-49% komórek | <10% komórek | 0 | razem |
|-----------|--------------|----------------|--------------|---|-------|
| złośliwe  | 16           | 9              | 2            | 3 | 30    |
| graniczne | 1            | 12             | 5            | 1 | 18    |
| łagodne   | 3            | 13             | 10           | 0 | 26    |

Tabela III. Ocena natężenia reakcji dla p53 w trzech grupach badanych.

|           | P53+++ | P53++ | P53+  |
|-----------|--------|-------|-------|
| złośliwe  | 27,36  | 12,26 | 10,65 |
| graniczne | 0,61   | 2,74  | 13,26 |
| łagodne   | 0,55   | 7,63  | 12,68 |

Tabela IV. Średnie odsetki wybarwionych komórek dla p21 w trzech grupach badanych.

|           | >50(%) | 10-49(%) | <10(%) | 0 | razem |
|-----------|--------|----------|--------|---|-------|
| złośliwe  | 0      | 12       | 10     | 8 | 30    |
| graniczne | 2      | 11       | 4      | 1 | 18    |
| łagodne   | 0      | 10       | 16     | 0 | 26    |

Zanalizowano natężenie reakcji białka p21 w trzech grupach badanych. Analiza porównań wielokrotnych dla parametru p21 (+++) wykazała istotne różnice między średnimi wartościami tego parametru jedynie dla guzów granicznych i łagodnych ( $5,07 \pm 6,71$  vs  $1,27 \pm 1,95$ ,  $p=0,031613$ ). W grupie guzów złośliwych wartość tego parametru wyniosła  $1,66 \pm 2,57$  i nie różniła się istotnie od średnich wartości dla guzów granicznych i łagodnych. Dla pozostałych parametrów p21 analiza testem Kruskala-Wallisa nie wykazała istotnych różnic między średnimi wartościami w trzech badanych grupach.

### III. Ocena zależności między typem histologicznym nowotworu a średnimi wartościami parametrów p53(+++), p53(++), p53(+) oraz p21(+++), p21(++), p21(+) w trzech grupach badanych.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy typem histologicznym nowotworu w grupie guzów złośliwych, granicznych i łagodnych a średnimi wartościami dla parametrów p53(+++), p53(++), p53(+) oraz p21(+++), p21(++), p21(+).

### IV. Ocena zależności między stopniem histologicznego zróżnicowania i stopniem zaawansowania nowotworu a średnimi wartościami parametrów p53(+++), p53(++), p53(+) oraz p21(+++), p21(++), p21(+) w grupie raków jajnika.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem histologicznego zróżnicowania a średnimi wartościami badanych parametrów.

Analiza wykazała istnienie ujemnej zależności między stopniem zaawansowania nowotworu a parametrami p21(+++), p21(++), p21(+). Dla parametrów tych współczynniki korelacji wyniosły odpowiednio 0,49; 0,68 i 0,63, co świadczy o silnej zależności.

### V. Ocena zależności między średnimi wartościami parametru p53 oraz p21.

Nie stwierdzono korelacji między średnimi wartościami parametrów p53 i p21 w grupie gruczolaków, w grupie guzów o granicznej złośliwości i w grupie raków jajnika.

## Dyskusja

Wraz z rozwojem biologii molekularnej, od wielu lat trwają badania nad oceną ekspresji białka p53 w nabłonkowych nowotworach jajnika, w których mutacja tego białka jest stwierdzana najczęściej. Niewiele miejsca w literaturze poświęcone jest mutacji białka p21, jako czynniki odpowiedzialnemu za proces karcinogenezy w jajniku.

W pracy naszej zanalizowaliśmy wyniki uzyskane z immunohistochemicznych barwień dla białek p53 i p21 w tkankach raków jajnika, guzów granicznych i gruczolakach. Wciąż badana jest przydatność oznaczania tych parametrów w trudnych diagnostycznie przypadkach guzów jajnika a także ich wartość prognostyczna w rakach jajnika.

Najwyższe, średnie odsetki wybarwionych jąder komórkowych oraz największe natężenie reakcji dla białka p53 stwierdzono w tkankach raka jajnika, dla białka p21 w tkankach guzów granicznych. Biorąc pod uwagę ilość pacjentek, u których uzyskano pozytywną reakcję dla tych białek, wyniki nasze zdecydowanie różnią się od tych, uzyskanych przez innych autorów. W grupie guzów łagodnych, wszystkie reakcje były dla białka



Małgorzata Gajewska et al. Analiza częstości występowania proapoptycznych białek p53 i p21 w nabłonkowych guzach jajnika.

p53 pozytywne. Wielu autorów u żadnej pacjentki ze zmianą łagodną jajnika nie uzyskało pozytywnego barwienia dla tego białka [2, 6, 7, 8]. Zbliżone wyniki otrzymano w grupie guzów granicznych (93,75% reakcji p53 – pozytywnych).

Chan i wsp. opisuje znaczne odsetki pozytywnych reakcji dla białka p53 w tkankach guzów łagodnych, granicznych i w zdrowym jajniku. Autor zaznacza jednak, że były to reakcje o bardzo słabym natężeniu. Są one związane z niewielką ekspresją białka p53, wynikającą ze zwiększonej jego stabilizacji, w sytuacji np. nasilonej naprawy DNA, ale nie mutacji. Również w naszej pracy średnie odsetki wybarwionych jąder komórkowych w grupach guzów łagodnych i granicznych nie przekraczały 20 i w większości były to reakcje o niewielkim natężeniu. Istotnie, ocena natężenia reakcji jest oceną bardzo subiektywną i być może wielu autorów niewielkie wybarwienie uznaje za reakcję negatywną, stąd taka rozbieżność w uzyskiwanych wynikach. Duże znaczenie ma również technika utrwalenia materiału, używane enzymy, rodzaj zastosowanej metody i typ użytego przeciwciała [9].

Przeciwciała anty p53 nie odróżnia prawidłowej, dzikiej formy białka p53 od produktu zmutowanego genu [10]. Istotnym zagadnieniem, jest nie tylko ogólny odsetek komórek reagujących z przeciwciałem, ale natężenie tej reakcji. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane przez nas i przez wymienionych wyżej autorów, komórki prawidłowego nabłonka jajnika i gruczolaków w jajniku mogą dawać pozytywne reakcje na obecność białka p53, jednak są to reakcje o słabym natężeniu.

Mutacja genu *TP53* jest najczęstszą mutacją stwierdzaną u chorych z rakiem jajnika. Podzielone są zdania w literaturze na temat pozytywnej korelacji między obecnością mutacji w białku p53 stwierdzonej w badaniu PCR, a intensywnością reakcji w barwieniu przeciwciałem. Wyniki własne potwierdziły, że największe natężenie reakcji występuje w jądrach komórek raków jajnika, czyli w podgrupie, o której wiadomo, że odsetek mutacji jest najwyższy. Określanie obecności mutacji białka p53 na podstawie jego reakcji z przeciwciałem powinno być bardzo ostrożne, ponieważ jest zbyt mało czułe i swoiste, ale pewną korelację można zauważyć [10, 11, 12, 13, 14]. Nieprawidłowe białko p53, będące produktem zmutowanego genu występuje najczęściej, ale nie zawsze, kiedy reakcja na przeciwciała anty p53 jest intensywna i dotyczy znacznego odsetka komórek nowotworowych (>90%) [12].

W pracy naszej, u 16 (53%) pacjentek z rakiem jajnika, reakcję pozytywną na obecność białka p53 stwierdzano w ponad 50% jąder komórkowych, a średni odsetek jąder, w których stwierdzono intensywne natężenie reakcji (p53+++), wyniósł 27. Po wieloczynnikowej analizie statystycznej nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy natężeniem reakcji a m.in. stopniem zróżnicowania histologicznego, co pośrednio mogłoby wskazywać na obecność mutacji *TP53* w niskozróżnicowanych rakach. Podobne wyniki – brak zależności uzyskał również Arik i wsp. [8]. Interesujące wyniki, które mogą być wytłumaczeniem tego problemu przedstawia Chan i wsp. [6]. Wśród raków jajnika wykazujących nadekspresję białka p53 w badaniu immunohistochemicznym, u 37% nie stwierdzono mutacji w badaniu PCR, a spośród raków z mutacją *TP53*, 29% nie wykazało pozytywnej reakcji. W przypadku ujemnej reakcji prawdopodobieństwo mutacji jest niewielkie, ale na podstawie przedstawionych badań, nie można jej wykluczyć [11]. W wynikach uzyskanych przez Wen i wsp. korelacja pomiędzy nadekspresją białka p53 a obecnością

mutacji jest jednak istotna statystycznie [15]. W przedstawionej przez nas pracy nie stwierdziliśmy również zależności pomiędzy nadekspresją białka p53 a stopniem zaawansowania raka jajnika. Podobne wyniki – brak korelacji uzyskał Arik i wsp. [8]. Nie jest to zgodne z wynikami innych autorów, którzy podają, że kumulacja białka p53 jest ściśle związana ze stopniem zaawansowania i zróżnicowania nowotworu, ilością pozostawionych resztek nowotworu po pierwotnej operacji oraz z wielkością frakcji proliferacyjnej guza [10, 16]. Należy jednak zaznaczyć, że ocena natężenia reakcji, jest oceną bardzo subiektywną i stąd mogą wynikać rozbieżności w uzyskiwanych wynikach.

Nie stwierdziliśmy zależności pomiędzy nadekspresją białka p53 a typem histologicznym guza jajnika we wszystkich trzech badanych grupach - jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Fauvet i wsp. [2] i Viale i wsp. [10].

Białko p21, proapoptotyczne białko, indukowane przez dziką formę białka p53, uczestniczy w wewnątrzkomórkowym mechanizmie zatrzymania cyklu komórkowego i zahamowania podziału komórki w fazie G1/S. Zaburzenia funkcji białka p21 *WAF1/CIP1* odgrywają istotne znaczenie w rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca czy raka krtani. Wpływ nieprawidłowej regulacji stężenia tego białka na proces karcinogenezy w jajniku nie jest tak szeroko poznany jak wpływ mutacji białka p53. W przedstawionej przez nas pracy zanalizowaliśmy obecność oraz natężenie reakcji dla białka p21 we wszystkich trzech podgrupach. Ekspresja tego białka była najwyższa w grupie guzów granicznych i różniła się istotnie od wartości uzyskanych w pozostałych podgrupach. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [2, 17, 18].

Białko p21 jest proapoptotycznym białkiem, zatrzymującym komórkę w fazie G1. Być może w guzach granicznych, nadmierna proliferacja nabłonka, jest przyczyną wzrostu poziomu białka p21, a utrata funkcji tego białka, może być natomiast przyczyną progresji procesu nowotworowego [18]. Wzrost poziomu białka p21 w nabłonkowych guzach jajnika o granicznej złośliwości może być dowodem na sprawne funkcjonowanie wewnątrzkomórkowych sygnałów apoptozy. Palazzo i wsp. opisuje nadekspresję białka p21 we wszystkich jedenastu wszczepach otrzewnowych surowiczych guzów granicznych jajnika [19]. Według Fauvet i wsp. nadekspresja proapoptotycznego białka p21 jest szczególnie charakterystyczna dla surowiczych granicznych guzów jajnika [2]. Dowodem na tę niekorzystną sytuację, jest uzyskana przez nas ujemna korelacja między spadkiem ekspresji białka p21 a wzrostem stopnia zaawansowania raka jajnika. Podobne wnioski przedstawia Werness i wsp. [20].

## Wnioski

Przedstawione przez nas wyniki mają pewne ograniczenia, przede wszystkim niewielka liczebność grup badanych, co jest związane z kosztami w przypadku badań immunohistochemicznych. Ocena białek p53 i p21 może być jednak kosztownym, ale pomocnym narzędziem w trudnych diagnostycznie sytuacjach. Pozytywna reakcja w barwieniu przeciwciałem anty p53 może być obecna zarówno w łagodnych jak i złośliwych guzach jajnika, jednak w przypadku raka ma ona istotne statystycznie większe natężenie. Konieczne są dalsze badania zachowania się badanych przez nas parametrów w guzach jajnika na większych grupach pacjentek, ponieważ wciąż rozbieżne są wyniki badań uzyskane przez wielu autorów.

Małgorzata Gajewska et al. Analiza częstości występowania proapoptycznych białek p53 i p21 w nabłonkowych guzach jajnika.

#### Oświadczenie autorów

1. Małgorzata Gajewska – zebranie materiału, opracowanie i interpretacja wyników badań, współautor tekstu pracy – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Mirosław Wielgoś – autor koncepcji pracy, uzyskanie funduszy na realizację badań, ostateczna akceptacja manuskryptu.
3. Grzegorz Panek – korekta merytoryczna i ostateczna akceptacja manuskryptu.
4. Janina Marczevska – współautor tekstu pracy, wykonywanie badań laboratoryjnych, analiza wyników.

#### Źródło finansowania:

Badania statutowe I Kliniki Położnictwa i Ginekologii WUM – 1W51/N/2013.

#### Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

#### Piśmiennictwo

1. Bręborowicz J, Bręborowicz D. Patologia nowotworów jajnika wywodzących się z nabłonka pokrywającego i z podścieliska. W: Ginekologia Onkologiczna t.2. Red. Markowska J. Wrocław: Urban&Partner. 2006, 856-866.
2. Fauvet R, Dufournet C, Poncelet C, [et al.]. Expression of pro-apoptotic (p53, p21, bax, bak and fas) and anti-apoptotic (bcl-2 and bcl-x) proteins in serous versus mucinous borderline ovarian tumors. J Surg Oncol. 2005, 92 (4), 337-343.
3. Szarkowska A, Olszewski R, Zawacka-Pankau J. Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów. Postępy Hig Med Dosw. 2010, 64, 396-407.
4. Gryczyński M, Pietruszewska W. Wybrane aspekty apoptozy i proliferacji komórkowej raka krtani. Otolaryngologia. 2002, 1 (3), 151-160.
5. Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1:contemporary view on its role in Senescence and oncogenesis. Biochemistry (Moscow). 2012, 77 (6):575-584.
6. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, [et al.]. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. Am J Pathol. 2000, 156 (2), 409-417.
7. Sylvia MT, Kumar S, Dasari P. The expression of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her -2-neu, p53 and Ki-67 in epithelial ovarian tumors and its correlation with clinicopathologic variables. Indian J Pathol Microbiol. 2012, 55, 33-37.
8. Arik D, Kulacoglu S. p53, bcl-2 and nm23 expressions in serous ovarian tumors: correlation with the clinical and histopathological parameters. Turk Patoloji Derg. 2011, 27 (1), 38-45.
9. Skomedal H, Kristensen GB, Abeler VM, [et al.]. TP53 protein accumulation and gene mutation in relation to overexpression of MDM2 protein in ovarian borderline tumours and stage I carcinomas. J Pathol. 1997, 181 (2), 158-165.
10. Viale G, Maisonneuve E, Bonoldi E, [et al.]. The combined evaluation of p53 accumulation and Ki-67 (MIB1) labelling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. Ann Oncol. 1997, 8 (5), 469-476.
11. Singer G, Stohr R, Cope L, [et al.]. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis. Am J Surg Pathol. 2005, 29 (2), 218-224.
12. O Neil CJ, Deavers MT, Malpica A, [et al.]. An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005, 29 (8), 1034-1041.
13. Waggoner SE, Anderson SA, Luce MC, Takahashi H. p53 protein expression and gene analysis in clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. Gynecol Oncol. 1996, 60 (3), 339-344.
14. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res. 1994, 54 (18), 4855-4878.
15. Wen WH, Reles A, Runnebaum IB, [et al.]. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. Int J Gynecol Pathol. 1999, 18 (1), 29-41.
16. Kiyokawa T. Alteration of p53 in ovarian cancer: its occurrence and maintenance in tumor progression. Int J Gynecol Pathol. 1994, 13 (4), 311-318.
17. Forma E, Wójcik-Krowiranda K, Bienkiewicz A, Bryś M. Molekularne podstawy ginekologii onkologicznej-białko TopBP1 i jego udział w procesie transkrypcji. Ginekol Pol. 2012, 83, 363-367.
18. Cao L, Yang Z, Li X. Expression and significance of tumor suppressor gene WAF1 in epithelial ovarian neoplasms. Hunan Yi Ke Da Xue Bao. 1998, 23 (6), 602-604.
19. Palazzo JP, Mozon F, Burke M, [et al.]. Overexpression of p21WAF1/CIP1 and MDM2 characterizes serous borderline ovarian tumors. Hum Pathol. 2000, 31 (6), 698-704.
20. Werness BA, Freedman AN, Piver MS, [et al.]. Prognostic significance of p53 and p21(waf1/cip1) immunoreactivity in epithelial cancers of the ovary. Gynecol Oncol. 1999, 75, 413-418.

KOMUNIKAT

## Sekcja Ultrasonografii Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego

Stowarzyszenie na Rzecz Zdrowia Matki i Dziecka



### Zapraszają na NOWY CYKL kursów i zajęć praktycznych (warsztaty)

w zakresie

#### diagnostyki ultrasonograficznej w położnictwie i ginekologii

#### Luty 2014 Poznań

- 20.02.2014 Warsztaty praktyczne
- 21.02.2014 Kurs do Certyfikatu Badań Dopplerowskich Sekcji USG PTG
- 22.02.2014 Kurs do Certyfikatu Podstawowego Sekcji USG PTG

#### Kwiecień 2014 Poznań

- 03.04.2014 Warsztaty praktyczne
- 04.04.2014 Kurs do Certyfikatu oceny serca płodu Sekcji USG PTG
- 05.04.2014 Kurs do Certyfikatu Badań Prenatalnych Sekcji USG PTG

#### Czerwiec 2014 Nowy Targ/Zakopane

- 05.06.2014 Warsztaty praktyczne - Nowy Targ
- 06-07.06.2014 IV Praktyczna Ultrasonografia w Ginekologii i Położnictwie - Zakopane

#### Wrzesień 2014 Poznań

- 11.09.2014 Warsztaty praktyczne
- 12.09.2014 Kurs do Certyfikatu Podstawowego Sekcji USG PTG

#### Listopad 2014 Poznań

- 27.11.2014 Warsztaty praktyczne
- 28.11.2014 Diagnostyka Ultrasonograficzna w niepłodności, onkologii ginekologicznej i uroginekologii (kurs do Certyfikatu Podstawowego Sekcji USG PTG)
- 29.11.2014 Kurs do Certyfikatu Badań Dopplerowskich Sekcji USG PTG

Programy szczegółowe kursów dostępne na stronie internetowej:

[www.usgptg.pl](http://www.usgptg.pl)

Kursy premiowane są 30 pkt akredytacyjnymi  
Sekcji USG PTG.

Zgłoszenia listownie, faksem lub e-mailem:  
Klinika Położnictwa i Chorób Kobietych UM w Poznaniu  
60-535 Poznań, ul. Polna 33  
fax. (61) 8419-647,  
tel. (61) 8419-334, 8419-441

**e-mail: [kpichk@gpsk.am.poznan.pl](mailto:kpichk@gpsk.am.poznan.pl)**

Proszę przy zgłoszeniu podać nr NIP oraz dane do faktury  
Nie pośredniczymy w rezerwacji hoteli.