

## Μελέτη της κινητικής των θυλακικών και των γεννητικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη της ωοθήκης στον αρουραίο

Μπαλλά Μ., Αγγελοπούλου Ρ., Λαβράνος Γ., Κίττας Χ.

### *Study of the kinetics of germ and granulosa cells during ovary development in the rat*

Balla M., Angelopoulou R., Lavranos G., Kittas C.

Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, Athens University

**Aim:** Study of the kinetics of germ and granulosa cells in the developing ovary of Wistar rats during fetal and neonatal life. Evaluation of the nuclear antigens Ki-67 and PCNA as markers of mitotic activity in the gonad and correlation of the findings with others taken from other studies of cell proliferation (mitotic index, BrdU labeling).

**Material and Methods:** Immunohistochemical detection of PCNA and Ki-67 proteins was performed using PC10 (Dako) and NCL-Ki-67 (Novocastra) antibodies in embryos and neonates. Estimation of reactive/total cell ratio, per cell type (germ and granulosa cells) and visual field was achieved using the Image Pro Plus Software.

**Results:** Before birth, using the PCNA antibody, the percentage of labeled/total germ cells (Labeling Index, LI) increases from 71.19 at 14.5 days post coitum (dpc) to 75.66 at 18.5 dpc. It then decreases to 28.57% at birth (22.5 dpc). Immediately after birth, the percentage of labeled/total germ cells increases, reaching 43.58% at 1 day post partum (dpp). Thereafter a further decrease in the percentage of reactive cells is observed resulting to a significant drop of the LI at 7 dpp (18.41%). Using the Ki-67 antibody, the percentage of labeled/total germ cells is generally lower although the fluctuation is similar with that observed using the first marker of cell proliferation. Using the PCNA antibody, the LI of granulosa cells in the developing ovary, increases from 0.70 (at 14.5 dpc) to 28.94 (at 18.5 dpc) and then drops to 18.03 (at 20.5 dpc). At birth, the percentage of reactive granulosa cells, reaches 27.66% and remains high thereafter, reaching a peak value of 49.22% at 7 dpp. Using the Ki-67 antibody, the percentage of labeled/total granulosa cells is generally lower although the fluctuation is similar with that observed using the first antibody.

**Discussion:** Using the PCNA antibody, the peak value of reactive/total germ

cells is observed at 18.5 dpc and the percentage drops thereafter, reaching a minimum level at 7 dpp. Accordingly, using the Ki-67 antibody, the LI is maximum at 14.5 dpc and minimum at 7 dpp. Between 18.5 and 20.5 dpc, the proliferation rate remains high. On the other hand, granulosa cell reaction ratio to both antibodies (PCNA and Ki-67) increases continuously throughout the examined period of time with a maximum value at 7 dpp.

**Key words:** ovary, gonadal development, morphogenesis, cell proliferation, mitotic index, granulosa cells

**Σκοπός:** Μελέτη της κινητικής των γεννητικών και θυλακικών κυττάρων στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη αρουραίων Wistar πριν και μετά τη γέννηση. Αξιολόγηση των πυρηνικών δεικτών Ki-67 και PCNA για τη διερεύνηση της μιτωτικής δραστηριότητας στη γονάδα και συσχέτιση των ευρημάτων με άλλες τεχνικές μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (καταμέτρηση μιτώσεων ανά οπτικό πεδίο, σήμανση με ραδιενεργό BrdU).

**Υλικό και Μέθοδος:** Ανίχνευση των πυρηνικών αντιγόνων PCNA και Ki-67 στα επιθηλιακά (θυλακικά) και τα γεννητικά κύτταρα ωοθήκης με τα αντιδραστήρια PC10 (Dako) και NCL-Ki-67 (Novocastra). Υπολογισμός του δείκτη σήμανσης, ανά κυτταρικό τύπο και οπτικό πεδίο, με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus.

**Αποτελέσματα:** Κατά την εμβρυϊκή περίοδο, το ποσοστό (%) των αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων στο PCNA αυξάνει από 71,19 στις 14,5 ημέρες πριν από τη γέννηση (ΗΠΓ) σε 75,66 στις 18,5 ΗΠΓ. Ακολουδώς ελαττώνεται σημαντικά φθάνοντας κατά τη γέννηση το 28,57% (22 ημερών/ΚΓ). Μετά τη γέννηση, παρουσιάζει μία ελαφρά ανάκαμψη την 1<sup>η</sup> ημέρα (ΗΜΓ) της τάξης του 43,58%, η οποία αναστέλλεται με αποτέλεσμα την περαιτέρω ελάττωση του ποσοστού σε 18,41% την 7<sup>η</sup> ΗΜΓ και αυτή είναι η ελάχιστη τιμή. Με το Ki-67, το ποσοστό των αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων είναι γενικά μικρότερο και η επιμέρους διακύμανση είναι παρόμοια. Ο δείκτης σήμανσης PCNA για τα θυλακικά κύτταρα, στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη, αυξάνει μεταξύ 14,5 ΗΠΓ και 18,5 ΗΠΓ από 0,70 σε 28,90 και ελαττώνεται, μέχρι τις 20,5 ΗΠΓ σε 18,03. Κατά τη γέννηση ανέρχεται σε 27,66% και παραμένει σε υψηλά επίπεδα, μετά τη γέννηση, φθάνοντας το μέγιστο 49,22% την 7<sup>η</sup> ΗΜΓ. Για το Ki-67, το ποσοστό των αντιδρώντων επιθηλιακών κυττάρων, είναι γενικά μικρότερο με παρόμοια τάση μεταβολής.

**Συμπεράσματα:** Η αντίδραση στο δείκτη PCNA είναι εντονότερη εκείνης που αφορά στο Ki-67, τόσο για τα θυλακικά κύτταρα, όσο και για τα κύτταρα της γεννητικής σειράς. Η μεγαλύτερη έκφραση του PCNA μπορεί να εκφράζει την αντίδραση των κυττάρων στα εκφυλιστικά κύματα που σημειώνονται στην ωοθήκη του αρουραίου, δεδομένης της συμμετοχής του στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Η υπεροχή στην αντίδραση των γεννητικών κυττάρων στο PCNA, σε σχέση με τα θυλακικά, αντανakλά τη συνεχή μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών, μέχρι το τέλος της περιόδου μελέτης, σε αντίθεση με τα θυλακικά, τα οποία αντιδρούν με σχετική καθυστέρηση. Η διαφορά αυτή ίσως οφείλεται σε μια τοπική επαγωγή του επιθηλίου, μετά την άφιξη των αρχέγονων βλαστικών γεννητικών κυττάρων στην περιοχή της γοναδικής καταβολής.

**Λέξεις ευρετηρίου:** ωοθήκη, γοναδική μορφογένεση, κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μιτωτικός δείκτης, γεννητικά κύτταρα, θυλακικά κύτταρα

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Κινητική των κυτταρικών πληθυσμών της αναπτυσσόμενης ωοθήκης

Η σειρά των γεννητικών κυττάρων, όπως άλλωστε και η σειρά των σωματικών κυττάρων, δημιουργείται κατά την περίοδο σχηματισμού των βλαστικών δερμάτων. Τα πρώτα γεννητικά κύτταρα ονομάζονται αρχέγονα βλαστικά γεννητικά κύτταρα (ΑΒΓΚ) και διατηρούν την ονομασία αυτή από τη στιγμή που πρωτοεμφανίζονται μέχρι την είσοδό τους στη γοναδική ακρολοφία<sup>1</sup>. Μετά την εποίκιση της γονάδας καλούνται βλαστικά γεννητικά κύτταρα (ΒΓΚ) και συνιστούν τον πλέον σημαντικό κυτταρικό πληθυσμό, καθώς καθορίζουν το δυναμικό γονιμότητας των ατόμων, μέσω της παραγωγής των ώριμων γαμετών, σπερματοζωαρίου και ωοκυττάρου<sup>2</sup>.

Κατά την περίοδο της γαμετογένεσης παρατηρούνται δύο αντίθετες διεργασίες στον πληθυσμό των βλαστικών γεννητικών κυττάρων. Έντονος πολλαπλασιασμός, αφ' ενός και σημαντική εκφύλιση, αφ' ετέρου. Μετρήσεις στις γονάδες των δηλυκών εμβρύων έδειξαν ότι, ο αριθμός των ΒΓΚ μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης αλλά και μετά τη γέννηση. Όταν σταματήσει η μιτωτική δραστηριότητα, η τύχη των γεννητικών κυττάρων είναι διαφορετική στα δύο φύλα. Συγκεκριμένα, στο δηλυκό αρχίζει η πρόφαση της μείωσης I για τη μετατροπή των ΒΓΚ σε πρωτογενή ωοκύτταρα<sup>3</sup>.

Για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη του αρουραίου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένες εμβρυϊκές ηλικίες, κατά τις οποίες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Beaumont και Mandl και τις παρατηρήσεις του Prepin<sup>4,6</sup>, παρουσιάζονται μετρήσιμες μεταβολές στην κινητική των γεννητικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, στις δηλυκές γονάδες μετρούνται, κατά την ηλικία των 14,5 ημερών της κύησης,  $11,5 \times 10^3$  βλαστικά γεννητικά κύτταρα. Ακολουθεί έντονη μιτωτική δραστηριότητα έως τις 18,5 ημέρες, οπότε μετρούνται  $75 \times 10^3$  ωογόνα (μέγιστος αριθμός). Στο στάδιο αυτό, η μιτωτική δραστηριότητα σταματά. Ακριβώς την ίδια περίοδο συμβαίνουν δύο γεγονότα εξαιρετικής σημασίας για την αναπαραγωγική ζωή του δηλυκού: η έναρξη της πρόφασης της μείωσης I<sup>4,6</sup>, οπότε τα ΒΓΚ μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα και η ενεργοποίηση της αποπτωτικής διεργασίας. Το αποπτωτικό κύμα που

παρατηρείται στο δηλυκό, κατά την περιγεννητική περίοδο, ελαττώνει τον αριθμό των γεννητικών κυττάρων, ώστε, 2 ημέρες μετά τη γέννηση, να διατηρείται μόνο το 1/3 του αριθμού αιχμής/μεγίστου ( $27 \times 10^3$ ).

Οι ερευνητές που μελέτησαν την ωογένεση στον άνθρωπο παρατήρησαν ότι, περίπου 10% των γεννητικών κυττάρων χάνονται μεταξύ της 18<sup>ης</sup> και 20<sup>ης</sup> εβδομάδας της εμβρυϊκής ζωής. Αυτός ο "κυτταρικός θάνατος" θεωρείται ως ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης των γεννητικών κυττάρων και περιλαμβάνει διαφορετικούς παράγοντες από αυτούς που εμπλέκονται στην ατρησία των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων<sup>7,8</sup>. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των γεννητικών κυττάρων είναι της τάξης των  $5-7 \times 10^6$ , κατά τον 5<sup>ο</sup> μήνα της κύησης ενώ, κατά τη γέννηση, ο αριθμός αυτός έχει ελαττωθεί σε  $7 \times 10^5$ . Όμως, μόνο 400-500 ωοκύτταρα πρόκειται να απελευθερωθούν κατά τη διάρκεια των ωορρηκτικών κύκλων. Η μαζική απώλεια των γεννητικών κυττάρων γίνεται, κυρίως, κατά την ωογένεση, αλλά συνεχίζεται και μετά τη γέννηση, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης.

Στα δηλαστικά και στα υπόλοιπα σπονδυλωτά, τα δηλυκά γεννητικά κύτταρα περιβάλλονται από το διαφοροποιημένο σωματικό στοιχείο, τα θυλακικά κύτταρα. Ο ρόλος των τελευταίων στη φυσιολογία των γεννητικών κυττάρων είναι σπουδαίος. Συγκεκριμένα, ελέγχουν την έναρξη της μείωσης και την εξέλιξή της. Το γεγονός αυτό, ενισχύει την υποψία συσχέτισης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των δύο κυτταρικών τύπων κατά την ωοθηκική ανάπτυξη.

Στην παρούσα εργασία, εκτιμάται η μιτωτική δραστηριότητα των γεννητικών και θυλακικών (σωματικών) κυττάρων σε έμβρυα και νεογνά αρουραίου, ηλικίας 14,5 ημερών πριν από τη γέννηση (ΗΠΓ) έως και 7 ημερών μετά τη γέννηση (ΗΜΓ).

### 2. Μέθοδοι Εκτίμησης του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού - PCNA και Ki-67

Στο παρελθόν, για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων κατά οπτικό πεδίο. Άλλες μέθοδοι εκτίμησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού βασίζονται στη σήμανση νουκλεοτιδίων με <sup>3</sup>H-θυμιδίνη και βρωμοδεσοξουριδίνη (BrdU) και έχουν ήδη εφαρμοστεί στη μελέτη της μιτωτικής δραστηριότη-

τας σε ποικιλία οργάνων, με συγκρίσιμα μεταξύ τους αποτελέσματα<sup>9</sup>. Ωστόσο, η εισαγωγή μοριακών δεικτών επιτρέπει τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, και επομένως και της μιτωτικής δραστηριότητας με εξαιρετική ευαισθησία. Δύο τέτοιοι δείκτες είναι τα πυρηνικά αντιγόνα PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) και Ki-67.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα PC10 που χρησιμοποιείται για την εντόπιση του PCNA κατά τη μελέτη της μιτωτικής δραστηριότητας σε όγκους, αλλά και σε αναπτυσσόμενους ιστούς, παρασκευάστηκε από τους Wassein και Lane το 1990. Το PCNA απαντάται σε ποικίλες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με μέγιστη συγκέντρωση κατά τη διάρκεια της S φάσης. PCNA δετικοί πυρήνες, ωστόσο, παρατηρήθηκαν και κατά τη διάρκεια των G<sub>1</sub>, S και G<sub>2</sub> φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, το Ki-67 εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τη φάση ηρεμίας G<sub>0</sub> και την αρχή της φάσης G<sub>1</sub>. Εμφανίζει μέγιστη τιμή στη G<sub>2</sub> και στο τέλος της M φάσης<sup>10-12</sup>.

Στην παρούσα εργασία, διερευνάται η κινητική των γεννητικών κυττάρων στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης αλλά και αμέσως μετά τη γέννηση. Παράλληλα, εξετάζεται ο πολλαπλασιασμός των θυλακικών κυττάρων, τα οποία ελέγχουν την έναρξη της μείωσης και την εξέλιξή της. Εφαρμόζεται η μέθοδος της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης των πυρηνικών αντιγόνων PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) και Ki-67 και εκτιμάται ο αριθμός των αντιδρώντων κυττάρων, στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν, με κάθε αντιγόνο-δείκτη, συγκρίνονται μεταξύ τους, αλλά και με ευρήματα παλαιότερων μελετών, στον ίδιο ή άλλους ιστούς, που βασίζονται σε διαφορετικές τεχνικές, προσδιορισμού κυττάρων στη φάση S και στη μίτωση.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται αρουραίοι στελέχους Wistar από την αποικία πειραματόζων του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur. Τα πειραματόζωα χωρίζονται σε ομάδες αρσενικών και θηλυκών και διατηρούνται σε ειδικά πλαστικά κλουβιά, σε κλιματιζόμενο χώρο του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρι-

κής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο φωτισμός ρυθμίζεται σε 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι και η θερμοκρασία στους 22°C. Τα πειραματόζωα πίνουν νερό βρύσης και τρέφονται κατά βούληση με τυποποιημένη τροφή που παρασκευάζεται και διατίθεται από την εταιρεία Αφοί Κεραμάρη και Σία ΟΕ.

### 2. Αναπαραγωγή

Για την προετοιμασία ομάδων πειραματόζων συγκεκριμένης ηλικίας, αρσενικοί αρουραίοι (επιβήτορες) τοποθετούνται ανά ένας σε κλουβί 5-6 θηλυκών για μία νύχτα (17:00 έως 9:00). Την επομένη, ο αρσενικός αποσύρεται και λαμβάνονται κολπικά επιχρίσματα από τα θηλυκά για να διαπιστωθεί, στην περίπτωση που παρατηρούνται σπερματοζώαρια, η γονιμοποίηση. Εκτιμάται ότι, η έναρξη της κύησης γίνεται την 2:00 ώρα, τη νύχτα της συνύπαρξης του αρσενικού με τα θηλυκά, επειδή τότε συμβαίνει η ωορρηξία και η γονιμοποίηση<sup>13</sup>. Η ηλικία των εμβρύων αρουραίων υπολογίζεται από τη στιγμή της γονιμοποίησης (ΗΠΓ) (χρόνος μηδέν) και εκφράζεται σε ημέρες και κλάσματα ημέρας. Ο τοκετός στον αρουραίο γίνεται στις 22,5 ημέρες και η ηλικία των νεογνών, μετά τη γέννηση (ΗΜΓ), υπολογίζεται κατ' αύξοντα αριθμό ημερών, δηλαδή 1, 3, 5 και 7<sup>14,15</sup>.

### 3. Λήψη εμβρύων

Τα κυοφορούντα θηλυκά, αναισθητοποιούνται με αιθέρα (Diethylether, MERCK). Κατόπιν διατομής του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος, αποκαλύπτεται κάθε κέρας της μήτρας, διανοίγεται άσηπτα και αφαιρούνται τα έμβρυα, περιβαλλόμενα από τις μεμβράνες τους. Σε έμβρυα ηλικίας μικρότερης των 14,5 ΗΠΓ, το φύλο του εμβρύου διαπιστώνεται με την τεχνική της φυλετικής χρωματίνης (σωμάτιο Barr)<sup>16,17</sup>.

### 4. Μικροχειρουργική αφαίρεση γονάδων

Τα έμβρυα και τα νεογνά αναισθητοποιούνται με αιθέρα (Diethylether, MERCK). Η αφαίρεση των γονάδων γίνεται στο στερεομικροσκόπιο (Zeiss Stemi SV 11). Επιλέγονται οι εμβρυϊκές ηλικίες των 14,5 ΗΠΓ (37 ζώα), 18,5 ΗΠΓ (14 ζώα), 20,5 ΗΠΓ (15 ζώα) και 22,5/γέννηση (19 ζώα). Μετά τη γέννηση, επιλέγονται οι ηλικίες 1 (12 ζώα), 3 (12 ζώα), 5 (14 ζώα) και 7 ΗΜΓ (30 ζώα), που αποτελεί τη μεγαλύτερη ηλικία μελέτης στο πειραματικό

πρωτόκολλο.

### 5. Ιστολογία

Οι ιστοί μετά την αφαίρεση και την έκπλυσή τους σε ρυθμιστικό διάλυμα PB (0,1 mol/L, pH 7,4) μονιμοποιούνται σε διάλυμα παραφορμαλδεϋδης 4% σε PB για 1 ώρα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την ανοσοϊστοχημεία. Η σκλήνωση γίνεται σε παραφίνη και οι τομές, πάχους 5  $\mu\text{m}$ , κόβονται σε σειρά και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες που αριθμούνται κατάύξοντα αριθμό. Λαμβάνεται μία στις 5 ή μία στις 10 αντικειμενοφόρες πλάκες και οι τομές του ιστού χρωματίζονται με διαλύματα αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Οι ενδιάμεσες τομές χρησιμοποιούνται για την ανοσοϊστοχημεία. Η αποπαραφίνωση γίνεται σε ξυλόλη και η ενυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης. Η παρατήρηση γίνεται σε φωτομικροσκόπιο Carl Zeiss, Oberkochen, Germany.

### 6. Ανοσοϊστοχημεία

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που φέρουν τις τομές του ιστού πάχους 5  $\mu\text{m}$  είναι επιστρωμένες με poly-L-lysine (poly-L-lysine, Sigma Chemical Co). Μετά την αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των ιστικών τομών γίνεται η αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με επεξεργασία σε διάλυμα κιτρικού οξέος 10 mM, pH 6.0 και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 10 min. Ακολουθεί η αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης, για την εξουδετέρωση της μη ειδικής χρώσης και η επώαση με 10% normal horse serum σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (120 mM/L NaCl, 11,5 mM/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 31,3 mM/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) σε υγρή ατμόσφαιρα και θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση του ιστού με το πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα (PC10, Dako), και τον πολυκλωνικό ορό (NCL-Ki-67, Novocastra) για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση των πυρηνικών αντιγόνων PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) και Ki-67, γίνεται σε αραιώση 1:200 και 1:100 αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 37°C για 60 min. Μετά την έκπλυση σε PBS ακολουθεί η επώαση με το βιοπινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα και εν συνεχεία, με το διάλυμα στρεπταβιδίνης σε PBS. Η αποκάλυψη των δέσεων δέσμευσης του αντισώματος γίνεται με 3,3'διαμινοβενζιδίνη (DAB)/ $\text{H}_2\text{O}_2$  και η αντίδραση αναδεικνύεται με χρώση των μη αντιδρώντων πυρήνων με αιματοξυλίνη. Η

κατάλληλη αραιώση του πρωτογενούς αντισώματος ελέγχεται με δοκιμασία διαφορετικών αραιώσεων και επιλογή εκείνης που δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα, χωρίς αντίδραση του υποστρώματος.

### 7. Μορφομετρική ανάλυση εικόνας

Για τα PCNA και Ki67 η χρώση είναι πυρηνική και οι αντιδρώντες πυρήνες χρωματίζονται καφέ. Ως δετικοί, χαρακτηρίζονται οι πυρήνες που προσλαμβάνουν το χρωμογόνο σε επιφάνεια μεγαλύτερη ή ίση του 1/3 της συνολικής. Οι πυρήνες που δεν αντιδρούν βάφονται με την αιματοξυλίνη μπλέ. Εξετάζονται τομές σε σειρά από ωοθήκη εμβρύων και νεογνών αρουραίων Wistar. Οι τομές κάθε γονάδας, για όλες τις ηλικίες, παρατηρούνται στο μικροσκόπιο Zeiss Axiolab από δύο ανεξάρτητους ερευνητές και μετρώνται τα δετικά γεννητικά και θυλακικά κύτταρα. Η αντίδραση αξιολογείται με το λογισμικό Image Pro Plus με βάση μακρο-εντολή αναγνώρισης των σημασμένων με 3,3'διαμινοβενζιδίνη (DAB)/ $\text{H}_2\text{O}_2$  κυττάρων, που παρέιχε ο κατασκευαστής. Η ίδια μακρο-εντολή επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ γεννητικών και θυλακικών κυττάρων, με βάση το μέγεθος και την αναλογία των διαστάσεών τους. Τα ευρήματα που προκύπτουν συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της άμεσης καταμέτρησης των αντιδρώντων κυττάρων από τους δύο ανεξάρτητους ερευνητές. Ως αποδεκτό μέτρο απόκλισης μεταξύ των ερευνητών, αλλά και μεταξύ μακρο-εντολής και ερευνητών, ορίζεται το 5% του απόλυτου αριθμού των κυττάρων. Σε περίπτωση μη αποδεκτής απόκλισης γίνεται επανάληψη της μέτρησης. Ως τελική τιμή θεωρείται ο μέσος όρος των επιμέρους μετρήσεων για κάθε οπτικό πεδίο.

Για τον προσδιορισμό του δείκτη σήμανσης [Labeling Index, LI = αριθμός κυττάρων (γεννητικών, θυλακικών) που αντιδρούν, προς το σύνολο των κυττάρων επί τοις %], σε κάθε ηλικία εξετάζονται 10 οπτικά πεδία με μέσο όρο κυττάρων της τάξης των 1000.

### 8. Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιείται η δοκιμασία του student (t test) για σύγκριση δύο μέσων τιμών με 158 βαθμούς ελευθερίας. Για τη σχέση των αποτελεσμάτων ως προς το χρόνο υπολογίζεται ο συντελεστής απλής γραμμικής εξάρτησης  $\beta$  που αξιολογείται με t test σε 6 βαθμούς ελευθε-

ρίας. Τέλος, υπολογίζεται ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης για τους 2 δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους 2 κυτταρικούς πληθυσμούς που εξετάζονται, χρησιμοποιώντας το γραμμικό συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Pearson.

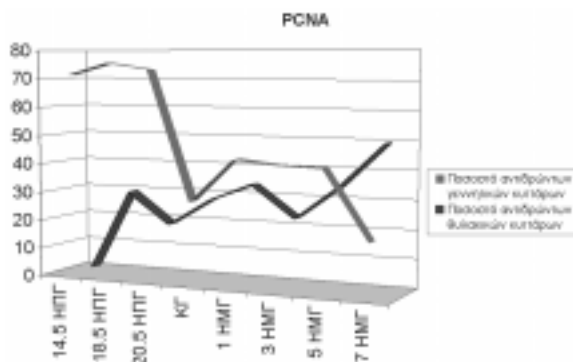
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1, αναγράφονται τα ποσοστά (%) των αντιδρώντων (ανοσοθετικών) κυττάρων (γεννητικών, θυλακικών) για το δείκτη PCNA. Όσον αφορά στα γεννητικά κύτταρα, παρατηρείται έντονη μιτωτική δραστηριότητα μεταξύ 14,5 ΗΠΓ και 18,5 ΗΠΓ. Εν συνεχεία, η αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού διακόπτεται μέχρι τις 22,5 ΗΠΓ (κατά τη γέννηση) (28,57%).

Μετά τη γέννηση, παρατηρείται πρόσκαιρη επαναδραστηριοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι την 1<sup>η</sup> ΗΜΓ (43,58%) η οποία αναστέλλεται μετά την ηλικία αυτή. Κατά συνέπεια, στο διάστημα μεταξύ 3<sup>ης</sup> και 7<sup>ης</sup> ΗΜΓ, το ποσοστό των αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων φθίνει σημαντικά, φθάνοντας το ελάχιστο (18,41%) την τελευταία ημέρα της περιόδου μελέτης (Διάγραμμα 1).

Στην περίπτωση των θυλακικών κυττάρων διαπιστώνεται έντονη μιτωτική δραστηριότητα κατά την εμβρυϊκή περίοδο, στα διαστήματα 14,5 ΗΠΓ - 18,5 ΗΠΓ και 20,5 ΗΠΓ - 22,5 ΗΠΓ, οπότε, ακριβώς πριν από τη γέννηση, το ποσοστό των αντιδρώντων κυττάρων ισούται με 27,66%. Η διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρείται μεταξύ της 18<sup>ης</sup> και της 20<sup>ης</sup> ημέρας της εμβρυϊκής ζωής είναι περιορισμένης διάρκειας και έκτασης. Στη νεογνική ωοθήκη, τα ποσοστά των ανοσοθετικών κυττάρων κυμαίνονται σε σχετικά υψηλά επίπεδα, δεν μεταβάλλονται σημαντικά και στις 7 ΗΜΓ καταγράφεται η μέγιστη τιμή (49,22%) (Διάγραμμα 1).

Στον πίνακα 2, αναγράφονται τα ποσοστά (%) των αντιδρώντων κυττάρων (γεννητικών, θυλακικών) για το δείκτη Ki-67. Όσον αφορά στα γεννητικά κύτταρα, πριν από τη γέννηση, παρατηρείται σημαντική πτώση του δείκτη σήμανσης μέχρι τις 18,5 ΗΠΓ, οπότε το ποσο-



**Διάγραμμα 1.** Ποσοστό (%) αντιδρώντων κυττάρων [γεννητικών, θυλακικών (σωματικών)] για το δείκτη PCNA.

στό των αντιδρώντων κυττάρων μειώνεται από 43,67% (14,5 ΗΠΓ) σε 27,09% (18,5 ΗΠΓ). Στη συνέχεια, η διακύμανση του ποσοστού των ανοσοθετικών/αντιδρώντων κυττάρων είναι μικρή (32,11% στις 20,5 ΗΠΓ, 28,62% στις 22,5 ΗΠΓ) μέχρι τη γέννηση. Συνεπώς, μετά τις 14,5 ΗΠΓ, επαναδραστηριοποίηση της μιτωτικής δραστηριότητας παρατηρείται μόνο στο διάστημα μεταξύ 18,5 ΗΠΓ και 20,5 ΗΠΓ.

Μετά τη γέννηση, ο μιτωτικός μηχανισμός παραμένει ανενεργός μέχρι το τέλος της περιόδου μελέτης (7 ΗΜΓ) και το ποσοστό των αντιδρώντων κυττάρων πέφτει στο 9,42%, που αποτελεί την ελάχιστη τιμή (Διάγραμμα 2).

Στα θυλακικά κύτταρα, παρατηρείται σημαντική αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι τη γέννηση (από 0,87% στις 14,5 ΗΠΓ, το ποσοστό των αντιδρώντων κυττάρων φθάνει στις 22,5 ΗΠΓ το 24,96%). Η μιτωτική δραστηριότητα συνεχίζει και μετά τη γέννηση, σε μικρότερο όμως βαθμό, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο ποσοστό αντιδρώντων κυττάρων να παρατηρείται, όπως και στην περίπτωση του PCNA, την 7<sup>η</sup> ΗΜΓ (44,28%) (Διάγραμμα 2).

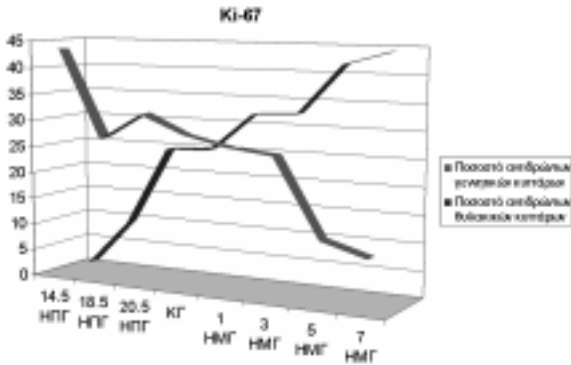
Διαπιστώνεται, επίσης, ότι, η ηλικία στην οποία παρατηρείται η αιχμή της μιτωτικής δραστηριότητας διαφέρει και είναι ανάλογη του κυτταρικού τύπου. Στα γεννητικά κύτταρα, παρατηρείται στις 18,5 ΗΠΓ (στην περίπτωση του PCNA) και στις 14,5 ΗΠΓ (στην περίπτω-

**Πίνακας 1.** Ποσοστό (%) αντιδρώντων κυττάρων [γεννητικών, θυλακικών (σωματικών)] για το δείκτη PCNA.

PCNA	14,5 ΗΠΓ	18,5 ΗΠΓ	20,5 ΗΠΓ	22,5 ΗΠΓ	1 ΗΜΓ	3 ΗΜΓ	5 ΗΜΓ	7 ΗΜΓ
Γεννητικά κύτταρα	71,19	75,66	73,26	28,57	43,58	42,17	41,71	18,41
Θυλακικά κύτταρα	0,70	28,90	18,03	27,66	33,69	22,88	34,25	49,22

**Πίνακας 2.** Ποσοστό (%) αντιδρώντων κυττάρων [γεννητικών, θυλακικών (σωματικών)] για το δείκτη Ki-67.

Ki-67	14,5 ΗΠΓ	18,5 ΗΠΓ	20,5 ΗΠΓ	22,5 ΗΠΓ	1 ΗΜΓ	3 ΗΜΓ	5 ΗΜΓ	7 ΗΜΓ
Γεννητικά κύτταρα	43,67	27,09	32,11	28,62	26,83	25,99	11,88	9,42
Θυλακικά κύτταρα	0,87	9,74	24,57	24,96	32,12	32,53	41,92	44,28

**Διάγραμμα 2.** Ποσοστό (%) αντιδρώντων κυττάρων [γεννητικών, θυλακικών (σωματικών)] για το δείκτη Ki-67.

ση του Ki-67), ενώ, στα θυλακικά κύτταρα, το μέγιστο ποσοστό αντιδρώντων κυττάρων, παρατηρείται την 7<sup>η</sup> ΗΜΓ (και για τους δύο δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού).

Για τη στατιστική αξιολόγηση των μετρήσεων πραγματοποιούνται συγκρίσεις ανάμεσα στις μέσες τιμές αντίδρασης των γεννητικών και των θυλακικών κυττάρων, προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Οι συγκρίσεις γίνονται με βάση τη δοκιμασία *t test* για 158 βαθμούς ελευθερίας (από τον τύπο  $n_1+n_2-2$ , με  $n_1=n_2=80$  μετρήσεις για κάθε κυτταρικό τύπο) και τα

αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 3.

Όπως προκύπτει από τα προαναφερθέντα, η αντίδραση των γεννητικών κυττάρων στο δείκτη PCNA διαφέρει σε στατιστικά πολύ σημαντικό βαθμό ( $p < 0,001$ ), σε σχέση με την αντίδραση των ιδίων κυττάρων στο Ki-67, αλλά και σε σχέση με την αντίδραση των θυλακικών κυττάρων στο PCNA. Αντίθετα, δεν τεκμηριώνεται κάποια διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκρίσεις, δηλαδή ανάμεσα στην αντίδραση γεννητικών και θυλακικών κυττάρων στο Ki-67 και ανάμεσα στην αντίδραση των θυλακικών κυττάρων στους δύο δείκτες.

Επιπλέον, εξετάζεται η πιθανή παρουσία γραμμικής εξάρτησης της αντίδρασης των κυττάρων στα πυρηνικά αντιγόνα από την ηλικία του πειραματοζώου κατά τη λήψη του δείγματος. Ως δείκτης ελέγχου της σχέσης αυτής χρησιμοποιείται ο συντελεστής απλής γραμμικής εξάρτησης, θεωρώντας ως ανεξάρτητη μεταβλητή το χρόνο-ηλικία του αρουραίου (σε ημέρες, με τη μικρότερη ηλικία δειγματοληψίας να αντιστοιχεί στην τιμή μηδέν) και εξαρτημένη μεταβλητή το ποσοστό αντίδρασης σε κάθε αντιγόνο, για τους δύο κυτταρικούς τύπους που μελετώνται (αντίδραση γεννητικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67, αντίδραση θυλακικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67, αντίδραση γεννητικών κυττάρων στο δείκτη PCNA και αντίδραση θυλακικών κυττάρων στο δείκτη

**Πίνακας 3.** Σύγκριση μέσου όρου αντιδρώντων κυττάρων (γεννητικών - GC, θυλακικών - GrC) ανά δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικό πληθυσμό (βαθμοί ελευθερίας=158)

	Ποσοστό αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων-GC στο Ki-67	Ποσοστό αντιδρώντων θυλακικών κυττάρων-GrC στο Ki-67	Ποσοστό αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων-GC στο PCNA	Ποσοστό αντιδρώντων θυλακικών κυττάρων-GrC στο PCNA
Μέσος όρος	25,9725	26,5715	49,12613	26,6605
Τυπική απόκλιση	12,88715	15,88987	22,02427	15,6758
Σύγκριση μέσων τιμών	Αντίδραση GC-GrC στο δείκτη Ki-67	Αντίδραση GC στους δείκτες Ki-67/PCNA	Αντίδραση GC-GrC στο δείκτη PCNA	Αντίδραση GrC στους δείκτες Ki-67/PCNA
Τιμή T-test	0,261872	8,115672	7,433006	0,035664
P	Όχι στατιστικά σημαντικό	<0,001	<0,001	Όχι στατιστικά σημαντικό

PCNA). Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον πίνακα 4.

Από την εκτίμηση του συντελεστή γραμμικής εξάρτησης, στις τέσσερις σειρές πειραματικών δεδομένων που προαναφέρθηκαν, προκύπτει σαφώς στατιστικά σημαντική εξάρτηση ανάμεσα στην ηλικία του πειραματοζώου και το δείκτη πολλαπλασιασμού των δύο τύπων κυττάρων (γεννητικά και θυλακικά) ανεξάρτητα από το αντιγόνο που χρησιμοποιείται ως δείκτης. Η εξάρτηση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 99% για τα γεννητικά κύτταρα που σημάνθηκαν με Ki-67 και στο επίπεδο του 95% στα γεννητικά κύτταρα που σημάνθηκαν με PCNA και υποδηλώνει σταθερή ελάττωση της αντίδρασης με την πάροδο του χρόνου. Για τα θυλακικά κύτταρα, η εξάρτηση της αντίδρασης από το χρόνο είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 99,9% με το Ki-67 και στο επίπεδο του 99% με το PCNA, αλλά εδώ η αντίδραση αυξάνεται σταθερά με το χρόνο.

Τέλος, εξετάζεται ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Pearson, ως δείκτης συμμεταβολής/συσχέτισης της αντίδρασης του ενός κυτταρικού πληθυσμού σε ένα αντιγόνο σε σχέση με το δεύτερο κυτταρικό πληθυσμό, καθώς και σε σχέση με την αντίδραση του ίδιου κυτταρικού πληθυσμού στο δεύτερο αντιγόνο της μελέτης. Οι υπολογισμοί αυτοί αξιολογήθηκαν στους 78 βαθμούς ελευθερίας (n-2, με n=80 πειραματικές μετρήσεις) και τα ευρήματα παρατίθενται στον πίνακα 5.

Από τον πίνακα σημειώνεται ότι η αντίδραση των γεννητικών κυττάρων στο Ki-67 και το PCNA συσχετίζεται γραμμικά, με βεβαιότητα 99,9%, με την αντίδραση των θυλακικών κυττάρων στους ίδιους δείκτες. Ακόμη, στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 99,9% εκτιμάται η γραμμική συσχέτιση της αντίδρασης των γεννητικών κυττάρων στο Ki-67, σε σχέση με το PCNA, ενώ ανάλογης βεβαιότητας είναι και η συσχέτιση της αντίδρασης των θυλακικών κυττάρων στα ίδια αντιγόνα.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Αξιολόγηση των πυρηνικών δεικτών Ki-67 και PCNA και συσχέτιση των ευρημάτων με άλλες τεχνικές μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (καταμέτρηση μιτώσεων ανά οπτικό πεδίο, σήμανση με ραδιενεργό BrdU)

Στην παρούσα εργασία, διερευνάται η κινητική των γεννητικών και των θυλακικών κυττάρων, κατά την εμβρυϊκή και νεογνική περίοδο, με εκτίμηση της μεταβολής του ποσοστού των αντιδρώντων κυττάρων σε δύο δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συγκρίνεται με προηγούμε-

**Πίνακας 4.** Εκτίμηση συντελεστή γραμμικής εξάρτησης ( $\beta$ ) της αντίδρασης των κυττάρων (γεννητικών - GC, θυλακικών - GrC) από την ηλικία (βαθμοί ελευθερίας=6)

	Ποσοστό αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67	Ποσοστό αντιδρώντων θυλακικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67	Ποσοστό αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων στο δείκτη PCNA	Ποσοστό αντιδρώντων θυλακικών κυττάρων στο δείκτη PCNA
Τιμή B	-2,0487912	2,9938225	-3,64094	2,430037
T-test B	-5,7246162	11,82454	-3,55698	3,876858
P	<0,01	<0,001	<0,05	<0,01

**Πίνακας 5.** Εκτίμηση συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Pearson ( $r$ ) των αντιδρώντων κυττάρων (γεννητικών - GC, θυλακικών - GrC) ανά δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικό πληθυσμό (βαθμοί ελευθερίας=78)

	Ποσοστό αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67	Ποσοστό αντιδρώντων θυλακικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67	Ποσοστό αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων στο δείκτη PCNA	Ποσοστό αντιδρώντων θυλακικών κυττάρων στο δείκτη PCNA
Συντελεστής r	-0,8719308	0,6800933	-0,70694	0,800187
Συγκρινόμενες μέσες τιμές	Αντίδραση GC-GrC στο δείκτη Ki-67	Αντίδραση GC στους δείκτες Ki-67/PCNA	Αντίδραση GC-GrC στο δείκτη PCNA	Αντίδραση GrC στους δείκτες Ki-67/PCNA
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

νες τεχνικές (μέτρηση μιτώσεων κατά οπτικό πεδίο, σήμανση νουκλεοτιδίων με  $^3\text{H}$ -θυμιδίνη, ενσωμάτωση βρωμοδεσοξουριδίνης κατά το διπλασιασμό του πυρηνικού γονιδιώματος) προσδιορισμού κυττάρων στη φάση S και στη μίτωση.

Το PCNA είναι μία όξινη πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 36 kDa, επικουρική της DNA πολυμεράσης δ. Επίσης, αλληλεπιδρά με την DNA πολυμεράση ε η οποία συμμετέχει στην επιδιόρθωση. Το PCNA απαντάται σε ποικίλες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με μέγιστη συγκέντρωση στην S φάση. PCNA δετικοί πυρήνες, ωστόσο, παρατηρήθηκαν και κατά τη διάρκεια των  $G_1$ , S και  $G_2$  φάσεων, αλλά και σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία<sup>10</sup>.

Το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 είναι ένας δεύτερος δείκτης πολλαπλασιασμού. Υπάρχει σε δύο μορφές μοριακού βάρους 359 και 320 kDa. Εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τη φάση ηρεμίας  $G_0$  και την αρχή της φάσης  $G_1$ , με μέγιστη τιμή στη  $G_2$  και στο τέλος της M φάσης και ελάχιστο αμέσως μετά τη μίτωση. Κατά τη φάση  $G_1$ , το αντιγόνο Ki-67 εντοπίζεται στο πυρήνιο ενώ στις υπόλοιπες φάσεις ανιχνεύεται και στην πυρηνική θεμέλια ουσία. Ο βιολογικός χρόνος υποδιπλασιασμού του αντιγόνου είναι λιγότερος από μία ώρα. Δεν λαμβάνει μέρος στην επιδιόρθωση του DNA<sup>18</sup>.

Συγκρίνοντας τα ποσοστά των αντιδρώντων κυττάρων στις διάφορες ηλικίες για κάθε κυτταρικό πληθυσμό και δείκτη πολλαπλασιασμού, διαπιστώνεται ότι, η αντίδραση στο δείκτη PCNA είναι εντονότερη εκείνης που αφορά στο Ki-67, τόσο για τα θυλακικά κύτταρα, όσο και για τα κύτταρα της γεννητικής σειράς. Η διαφορά που παρατηρείται στην έκφραση των δύο αυτών πυρηνικών αντιγόνων δικαιολογείται αν ληφθούν υπόψη οι διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις οποίες τα τελευταία εκφράζονται. Η μεγαλύτερη έκφραση του PCNA μπορεί να εκφράζει την αντίδραση των κυττάρων στα εκφυλιστικά κύματα που σημειώνονται στην ωοθήκη του αρουραίου. Δηλαδή, επειδή κατά τη διαδικασία αυτή κερματίζεται το DNA σε νουκλεοσωματικά ολιγομερή είναι πιθανόν το PCNA να εμπλέκεται και σε διεργασίες επιδιόρθωσης της βλάβης στα, υπό εξέταση, κύτταρα.

Εξετάζοντας την αξιοπιστία της μεθόδου, γίνεται προσπάθεια σύγκρισης των αποτελε-

σμάτων της παρούσας εργασίας με αντίστοιχα που έχουν ληφθεί από την εφαρμογή άλλων τεχνικών. Στο παρελθόν, για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων κατά οπτικό πεδίο. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χαρακτηριστική μορφολογία που λαμβάνει ο πυρήνας κατά τη μετάφαση και ανάφαση της μίτωσης, οπότε και διακρίνονται τα διαχωρισμένα χρωμοσώματα πάνω στην άτρακτο. Ωστόσο, η αξιοπιστία της μεθόδου περιορίζεται από το γεγονός ότι, αξιοποιούνται μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μιτωτικού κυττάρου, των οποίων ο εντοπισμός εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την εμπειρία του ερευνητή και τις συνθήκες επεξεργασίας του ιστού. Επιπλέον, η μέθοδος εμφανίζει μικρή ευαισθησία, αν και η ειδικότητά της είναι ικανοποιητική. Ειδικά σε σχέση με την αναπτυσσόμενη ωοθήκη αρουραίου, η καταμέτρηση των μιτώσεων από τους Beaumont και Mandl έδειξε υψηλό μιτωτικό δείκτη έως τις 18 ημέρες πριν από τη γέννηση και ακολούθως απουσία μιτώσεων μετά τη γέννηση<sup>4</sup>.

Άλλη μέθοδος εκτίμησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού βασίζεται στη σήμανση νουκλεοτιδίων με  $^3\text{H}$ -θυμιδίνη και βρωμοδεσοξουριδίνη (BrdU)<sup>9</sup>. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει την ενσωμάτωση των σημασμένων νουκλεοτιδίων κατά την αντιγραφή. Η χρήση ραδιενέργειας στα αρχικά πρωτόκολλα της μεθόδου ενσωμάτωσης  $^3\text{H}$ -θυμιδίνης και BrdU, συνιστούσε έναν επιπλέον κίνδυνο για το ερευνητικό προσωπικό, με αναπόφευκτη την κάποιου βαθμού αλλοίωση του μορίου-στόχου, δηλαδή του DNA. Επιπλέον, η μέθοδος δεν απέκλειε τη σήμανση μονόκλωνων αλύσων και εντομών στο DNA, όπως αυτές που προκύπτουν κατά τις διεργασίες επιδιόρθωσης, αλλά και κατά την απόπτωση. Τέλος, παρά την τεχνολογική εξέλιξη, η ευαισθησία των συσκευών ποσοτικοποίησης του σήματος ποικίλει σημαντικά. Για όλους τους προαναφερθέντες λόγους, η μέθοδος αυτή τείνει σήμερα να αντικατασταθεί από τεχνικές προσδιορισμού μοριακών δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA και Ki-67), οι οποίες προτιμήθηκαν και στην παρούσα μελέτη.

Στις περισσότερες ποσοτικές μεθόδους ανίχνευσης του PCNA εφαρμόζεται ο υπολογισμός του δείκτη σήμανσης (LI). Σε παγκρεατικά κυψελιδικά κύτταρα αρουραίου η απόλυτη τιμή των PCNA δετικών κυττάρων σε σχέση με αυτή που μετρήθηκε με αυτοραδιογραφία

με  $^3\text{H}$ -θυμιδίνη, ήταν 10 φορές υψηλότερη. Το ίδιο παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα μετρήθηκαν με τις δύο μεθόδους, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή κατά τη διάρκεια της αναγέννησης<sup>11</sup>. Επίσης, ανάλογο αποτέλεσμα έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα από το κόλον αρουραίου, σε κύτταρα καλλιέργειας και σε ορισμένους νεοπλασματικούς ιστούς.

Η εξήγηση για την τελευταία παρατήρηση βασίζεται στο χρόνο υποδιπλασιασμού του PCNA, ο οποίος είναι, περίπου, 20 h. Σύμφωνα με αυτό, τα PCNA θετικά κύτταρα δεν αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση σε μία ορισμένη χρονική στιγμή αλλά το σύνολο των κυττάρων που πέρασαν από την S φάση<sup>11</sup>. Οι M. Connolly et al., μελέτησαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο ήπαρ ενήλικου αρουραίου με το PCNA και τη βρωμοδεσοξουριδίνη. Μεταξύ των δύο μετρήσεων δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά, αν και για το PCNA οι μετρήσεις αφορούσαν κύτταρα της S και του τέλους της G<sub>1</sub> φάσης, ενώ για τη βρωμοδεσοξουριδίνη, κύτταρα που πραγματοποιούσαν αντιγραφή του DNA.

## 2. Γεννητικά κύτταρα

Όσον αφορά στη διερεύνηση της μεταβολής του ποσοστού των αντιδρώντων γεννητικών κυττάρων στους δύο δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αξιολογούνται βάσει προγενέστερων ευρημάτων. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις των Beaumont και Mandl και οι μεταγενέστερες παρατηρήσεις του Prepin<sup>4,6</sup>, αναδεικνύουν αξιολογήσιμες μεταβολές στην κινητική των γεννητικών κυττάρων. Κατόπιν, δηλαδή, μέτρησης του αριθμού των μιτώσεων διαπιστώνεται ότι, στις 14,5 ΗΠΓ, στις δηλυκές γονάδες του αρουραίου, μετρούνται  $11,5 \times 10^3$  ΒΓΚ. Ακολουθεί έντονη μιτωτική δραστηριότητα έως τις 18,5 ημέρες οπότε μετρούνται  $75 \times 10^3$  ωογόνια (μέγιστος αριθμός), ενώ το αποπτωτικό κύμα που παρατηρείται κατά την περιγεννητική περίοδο προκαλεί σημαντική πτώση του αριθμού των γεννητικών κυττάρων μετά τη γέννηση. Συγκεκριμένα, στις 2 ημέρες μετά τη γέννηση, μόνο το 1/3 του αριθμού αιχμής/μέγιστου των γεννητικών κυττάρων διατηρείται ( $27 \times 10^3$ ).

Στην παρούσα εργασία, στην περίπτωση του PCNA, τα ευρήματα συμφωνούν με τα αντίστοιχα των προαναφερθέντων ερευνητών καθώς, μετά την ηλικία των 14,5 ΗΠΓ (71,20%)

παρατηρείται έντονη μιτωτική δραστηριότητα μέχρι τις 18,5 ΗΠΓ οπότε ο δείκτης σήμανσης ανέρχεται στο 75,66, που αποτελεί τη μέγιστη τιμή. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται διακοπή της μιτωτικής δραστηριότητας και έναρξη της πρόφασης της μείωσης I. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική πτώση του αριθμού των γεννητικών κυττάρων τόσο κατά την περιγεννητική περίοδο όσο και μετά τη γέννηση. Μάλιστα, το ποσοστό των αντιδρώντων κυττάρων (18,41%), στις 7 ημέρες μετά τη γέννηση, είναι μικρότερο του 1/4 του ποσοστού αιχμής/μέγιστου (75,66%).

Στα γεννητικά κύτταρα που αντιδρούν στο αντιγόνο Ki-67, παρατηρείται έντονη μιτωτική δραστηριότητα στις 14,5 ΗΠΓ (43,67%). Το ποσοστό αυτό διατηρείται υψηλό μέχρι και τις 20,5 ΗΠΓ (32,11%), με εξαίρεση τη διακύμανση που παρατηρείται στις 18,5 ΗΠΓ. Έκτοτε, όπως και στην περίπτωση του PCNA, σημειώνεται σημαντική πτώση του αριθμού των γεννητικών κυττάρων μέχρι και τις 7 ΗΜΓ (9,42%). Η παρατηρούμενη, αιχμή αντίδρασης στο Ki-67, δεν συμφωνεί με τα ευρήματα από την εκτίμηση της αντίδρασης για το PCNA ή με την καμπύλη των Beaumont και Mandl. Πιθανολογείται ότι, αυτή η διαφορά οφείλεται στην αυξημένη ειδικότητα του αντιγόνου, λόγω της μη συμμετοχής του σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, σε αντίθεση με το PCNA, αλλά και στις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δύο δεικτών πολλαπλασιασμού ως προς το χρόνο υποδιπλασιασμού και τη μέγιστη έκφραση αυτών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

## 3. Θυλακικά (σωματικά) κύτταρα

Το ποσοστό των θυλακικών κυττάρων που αντιδρά στο PCNA, εμφανίζει διακυμάνσεις, τόσο πριν όσο και μετά τη γέννηση. Παρατηρείται δηλαδή ότι τα σωματικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη, μετά τις 14,5 ΗΠΓ. Έκτοτε, ο αριθμός των αντιδρώντων κυττάρων διατηρείται σχεδόν σταθερός και φθάνει το μέγιστο (49,22%) στις 7 ΗΜΓ. Σε γενικές γραμμές, τα σωματικά κύτταρα στην ωοθήκη των εμβρύων και των νεογνών αντιδρούν σε μικρότερο βαθμό στο PCNA σε σχέση με τα γεννητικά κύτταρα. Ανάλογα αντιδρούν τα θυλακικά κύτταρα στο Ki-67, καθώς αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται μετά τις 14,5 ΗΠΓ. Το ποσοστό των αντιδρώντων κυττάρων αυξάνει καθ'όλη τη διάρ-

κεια της περιόδου που εξετάζεται κατά ένα συνεχές πρότυπο. Όπως και στην περίπτωση του PCNA, ο μέγιστος αριθμός μιτωτικών σωματικών κυττάρων παρατηρείται στις 7 ΗΜΓ (44,28%).

#### 4. Στατιστική αξιολόγηση

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αντίδραση των γεννητικών και των θυλακικών κυττάρων στο Ki-67. Επίσης, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αντίδραση των θυλακικών κυττάρων στο δείκτη Ki-67, σε σχέση με το δείκτη PCNA. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν στο σύνολο των μετρήσεων και, επομένως, αποτυπώνουν μόνο το μέσο όρο αντίδρασης των κυττάρων και όχι τη διαχρονική τάση της μεταβολής. Πάντως, ακόμη και η απλή παρατήρηση των διαγραμμάτων κυτταρικής αντίδρασης - χρόνου (Διαγράμματα 1-2) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, για τα θυλακικά κύτταρα, η αντίδραση στο Ki-67 συμπίπτει αδρά με την αντίδραση στο PCNA, για όλη την περίοδο μελέτης και το ίδιο συμβαίνει για τα γεννητικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, η σύγκριση των αποτελεσμάτων για τους δύο κυτταρικούς τύπους στο Ki-67 αποκαλύπτει ότι, οι τάσεις είναι αντίθετες (φθίνουσα και αύξουσα, αντίστοιχα) με μία μέση τιμή και για τις δύο καμπύλες περί το 26%. Αυτή ακριβώς η μέση τιμή αντίδρασης είναι το μέτρο σύγκρισης στο t-test, με αποτέλεσμα να μην κατοχυρώνεται η διαφορά στις δύο σειρές αποτελεσμάτων.

Σε σχέση με τη σήμανση των γεννητικών κυττάρων στο PCNA, παρατηρείται ένα ποσοστό αντίδρασης της τάξης του 49%, το οποίο διαφέρει με βαθμό βεβαιότητας 99,9%, τόσο από την αντίδραση των ίδιων κυττάρων στο Ki-67, όσο και από την αντίδραση των θυλακικών κυττάρων στον ίδιο δείκτη. Για τη διαφορά σήμανσης ανάμεσα στους δύο δείκτες φαίνεται ότι ευθύνεται η κυμαινόμενη ευαισθησία στην έκφραση του Ki-67 και του PCNA σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου. Επιπρόσθετα, τα μικρότερα ποσοστά που παρατηρούνται στην περίπτωση του Ki-67 δικαιολογούνται αν ληφθεί υπόψη ότι το PCNA είναι πρωτεΐνη επικουρική των πολυμερασών δ και ε<sup>19,20</sup> και, κατά συνέπεια, είναι πιθανό να εμπλέκεται στις διεργασίες επιδιόρθωσης του DNA μετά τη βλάβη. Η μεγαλύτερη έκφραση του PCNA μπορεί να εκφράζει την αντίδραση των

κυττάρων στο αποπτωτικό κύμα που σημειώνεται στην ωοθήκη του αρουραίου κατά την περιγεννητική περίοδο.

Πάντως, πρέπει να επισημανθεί ότι η διαφορά ευαισθησίας των δύο αντιγόνων επηρεάζει, κυρίως, τη σήμανση των γεννητικών κυττάρων, ενώ στα θυλακικά κύτταρα είναι πολύ περιορισμένη (26,7 έναντι 26,6%) και δεν οδηγεί σε στατιστικά σημαντικό εύρημα. Η υπεροχή στην αντίδραση των γεννητικών κυττάρων στο PCNA, σε σχέση με τα θυλακικά, αντανακλά τη συνεχή μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών, μέχρι το τέλος της περιόδου μελέτης, σε αντίθεση με τα θυλακικά, τα οποία αντιδρούν με σχετική καθυστέρηση και φθάνουν σε υψηλή σήμανση μόνο στις μεγαλύτερες ηλικίες. Η διαφορά αυτή οφείλεται ίσως στην επαγόμενη αντίδραση του επιθηλίου, μετά το σχηματισμό της γοναδικής καταβολής και την υποδοχή των γεννητικών κυττάρων, τα οποία αντιδρούν με ένα συνεχή ρυθμό, μέχρι να φτάσουν στην αναστολή της ανάπτυξής τους, με τη δράση των OMI's (Oocyte Meiosis Inhibitors).

Από τη μελέτη συσχέτισης ηλικίας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού αναδεικνύεται γραμμική εξάρτηση της αντίδρασης των θυλακικών κυττάρων (και στα δύο αντιγόνα του πειράματος) με την ηλικία των πειραματοζώων. Φαίνεται πως τα κύτταρα αυτά δεν εμφανίζουν εξεσημασμένες αποπτωτικές αιχμές, με αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός τους να εντείνεται κατά ομαλό τρόπο με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα, τα γεννητικά κύτταρα, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αρνητική γραμμική εξάρτηση του δείκτη σήμανσης από το χρόνο και με τους δύο αντιγονικούς δείκτες. Τα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται με ένα ισχυρό μιτωτικό δυναμικό στην αρχή της μελέτης, το οποίο όμως εξαντλείται βαθμιαία με το σχηματισμό και την ωρίμανση των ωοθυλακίων, για να καταλήξει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού κατά τη νεογονική ηλικία. Σε αντίθεση με τα γεννητικά κύτταρα στον αναπτυσσόμενο όρχι, η ωοθήκη δεν εμφανίζει διαδοχικά αποπτωτικά κύματα, τα οποία θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν ένα παλμικό, μη γραμμικό πρότυπο αντίδρασης-χρόνου<sup>21</sup>.

Τέλος, οι δείκτες γραμμικής συσχέτισης κατά Pearson δίνουν τη δυνατότητα ελέγχου της εσωτερικής συμφωνίας των δεδομένων του πειράματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση υπάρ-

χει ανάμεσα στις μετρήσεις α) των γεννητικών κυττάρων για το Ki-67 και το PCNA και β) των θυλακικών κυττάρων για το Ki-67 και το PCNA. Οι συσχετίσεις αυτές ενισχύουν την αξιοπιστία των μετρήσεων, αφού ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τεκμηριώνεται σε κάθε ηλικία και από τους δύο δείκτες που χρησιμοποιούνται, χωρίς αξιοσημείωτες αποκλίσεις. Αντίθετα, με βεβαιότητα 99,9% προκύπτει αρνητική γραμμική συσχέτιση της αντίδρασης του ενός κυτταρικού τύπου σε σχέση με τον άλλο, ανεξάρτητα από το αντιγόνο που χρησιμοποιείται για τη σήμανση. Αυτή η διαπίστωση ενισχύει την υποψία για την ύπαρξη ενός είδους ανταγωνιστικής σχέσης γεννητικών και θυλακικών κυττάρων (τροφική αλληλεξάρτηση, παρακρινής σηματοδότηση), κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός των γεννητικών κυττάρων επάγει την αντίδραση του επιθηλίου, το οποίο με τη σειρά του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των γεννητικών κυττάρων. Αυτή η αλληλεπίδραση γίνεται αντιληπτή με το βαθμιαίο περιορισμό στον αριθμό των μιτώσεων των γεννητικών κυττάρων και την παράλληλη επαγωγή της μίωσης των θυλακικών.

Από την εργασία αυτή προκύπτει ένας αυστηρά καθορισμένος μηχανισμός ανάπτυξης της ωοθήκης, που επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τα θυλακικά και τα γεννητικά κύτταρα. Ο αριθμός των πρώτων αυξάνει συνεχώς ενώ τα δεύτερα παρουσιάζουν αποπτωτική δραστηριότητα που οδηγεί στην ελάττωση του αριθμού τους μετά τη γέννηση. Αυτό υποδηλώνει ότι, στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη σχηματίζεται μία δεξαμενή ωοκυττάρων που διατηρείται μέχρι την έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου και φθίνει, ακολούθως, μέχρι τη γήρανση. Περαιτέρω πειραματικά δεδομένα απαιτούνται για τη διευκρίνιση των παραγόντων που ρυθμίζουν αυτές τις σχέσεις και το μηχανισμό με τον οποίο εκτρέπονται κατά την εκδήλωση των διαφόρων παθολογικών φαινοτύπων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McLaren A. Primordial germ cells in mammals. In: Organization of the early vertebrate embryo. Zagris N, Duprat AM, Durston A eds, Plenum Press, N.Y., 1-9, 1995.
2. Modi DN, Sane S, Bhartiya D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod* 9(4):219-225, 2003.
3. Byscov A. Regulation of meiosis in mammals. *Ann Biol Anim Biochem Biophys*, 19:1251-1261, 1979.
4. Beaumont HM, Mandl AM. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc Roy Soc London Ser B* 155:557-579, 1962.
5. Prepin J, Gibello-Kervran C, Charpentier G. Number of germ cells and meiotic prophase stages in fetal rat ovaries cultured in vitro. *J Reprod Fert* 73:579-583, 1985.
6. Prepin J, Charpentier G, Jost A. Action du testicule foetal sur le nombre de cellules germinales de l'ovaire du foetus de rat, in vitro. *C R Acad Sci* 300:43-47, 1985.
7. DePol A, Vaccina F, Forabosco A. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod* 12:2235-2241, 1997.
8. Monniaux D, Mandon-Pepin B, Monget P. L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. *Med Sci* 15:157-166, 1999.
9. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 27:339-369, 1995.
10. Hall PA, Levison DA, Woods AL. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-294, 1990.
11. Steger K, Aleithe I, Behre. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 4:227-233, 1998.
12. Duchrow M, Gerdes J, Schlter C. The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell Prolif* 27:235-242, 1994.
13. Everett WJ, Young WC. The mammalian female cycle and its controlling mechanisms. In: Sex and internal secretions. The Williams and Wilkins CO, Baltimore 1:497-555, 1961.
14. Jost A, Picon L. Hormonal control of fetal development and metabolism. In: Advances in metabolic disorders. Academic Press Inc 4:123-184, 1970.
15. Agelopoulos M, Magre S, Patsavoudi E. Initial phases of the rat testis differentiation in vitro. *J Embryol Exp Morph* 83:15-31, 1984.
16. Barr ML, Carr DH. Correlations between sex chromatin and sex chromosomes. *Acta Cytol* 6:34-45, 1961.
17. Jost A. Données préliminaires sur les stades initiaux de la différenciation du testicule chez le rat. *Arch Anat microsc Morphol Exper*

- 61:415-438, 1972.
18. Gerdes J, Lemke H, Baisch H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715, 1984.
  19. Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96:121-129, 1990.
  20. Dantzer F, De Murcia G. Quelles sont les ADN polymerases requises pour la replication et la reparation de l'ADN chez les eucaryotes? *Med Sci* 14:704-712, 1998.
  21. Αγγελοπούλου Ρ, Καραγιάννη Β. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση των γεννητικών κυττάρων. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 17:1-14, 2000.

---

**Corresponding Author:**

Roxani Angelopoulou,  
54 Anagnostopoulou Str,  
GR-10672, Athens  
Greece  
Phone: 210 7462347  
e-mail: [rangelop@med.uoa.gr](mailto:rangelop@med.uoa.gr)

---

**Υπεύθυνη αλληλογραφίας:**

Ρωξάνη Αγγελοπούλου,  
Αναγνωστοπούλου 54,  
GR 106 72, Αθήνα  
Τηλ.: 210 7462347  
e-mail: [rangelop@med.uoa.gr](mailto:rangelop@med.uoa.gr)