111 Sledování exprese genu pro cyklin D1 v korelaci s proliferační aktivitou u pacientů s lymfomem z buněk pláště.

Břízová H., Mrhalová M., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

helena.brizova@fnmotol.cz

Lymfom z buněk pláště (mantle cell lymphoma, MCL) zahrnuje 3-10% B buněčných non-Hodgkinovských lymfomů (B-NHL). Jedná se o onemocnění starších nemocných vyznačující se nepříznivou prognosou s relativně agresivním klinickým průběhem, rychlou progresí a odolností ke konvenční terapii používané k léčbě B-NHL. Medián přežití se pohybuje do 3 let, ale klinický průběh onemocnění je často variabilní.

Klinicko-terapeutický význam má nejen včasná a správná diferenciální diagnosa MCL, ale rovněž stanovení markerů v asociaci s nepříznivou prognosou onemocnění.

U MCL dochází k transkripční deregulaci genu CCND1 vedoucí k patologické expresi cyklinu D1 vlivem translokace t(11;14). Exprese cyklinu D1 nebo detekce t(11;14) je podle současných WHO kriterií nezbytnou součástí diferenciální diagnosy MCL. Hlavním prognostickým faktorem pro pacienty s MCL je up-regulace genů, které jsou asociovány s proliferační aktivitou buněk. Rozsáhlá klinickopatologická analýza European MCL Network potvrdila významnou prognostickou roli buněčné proliferace, která je lepším prognostickým parametrem nadřazeným všem ostatním histomorfologickým a klinickým kritériím. V asociaci se špatnou prognosou je u pacientů s MCL popsána exprese Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2.

Cílem práce je 1. kvantitativní stanovení exprese molekulárního markeru MCL, cyklinu D1 a 2. zavedení kvantitativní detekce mRNA proliferačních markerů Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2, jejichž exprese je popsána jako negativní prognostický faktor u pacientů s MCL.

Pomocí reverzně transkriptázové řetězové reakce v reálném čase (RT-RQ-PCR) jsme vyšetřili expresi mRNA cyklinu D1, Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 u 79 kryostatových a/nebo parafinových vzorků MCL diagnostikovaných v době záchytu onemocnění.

Pro stanovení spolehlivého hraničního limitu pro diferenciální diagnosu MCL jsme dále vyšetřili expresi cyklinu D1 u 50 vzorků jiných B-NHL. Kontrolními vzorky byly odběry od 5 pacientů s reaktivní lymfadenopatií. Hladinu cyklinu D1 jsme rovněž analyzovali u 112 aspirátů kostní dřeně (KD) odebraných v době diagnosy a/nebo v průběhu onemocnění od pacientů s B-NHL (72x se jednalo o KD od pacientů s MCL, z nichž 36 mělo zaznamenanou infiltraci KD lymfomem). Jako kontrolní skupinu jsme vyšetřili 10 vzorků KD od zdravých dárců.

Při analýze proliferační aktivity nádorů jsme vyšetřili expresi Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 u 37 bioptických vzorků NHL a u 4 vzorků od pacientů s reaktivní lymfadenopatií. V 7/37 případech NHL se jednalo o Burkittův lymfom (BL). BL je vysoce proliferativní onemocnění, které jsme použili jako positivní kontrolu vyšetření.

Kvantitativní vyšetření hladiny mRNA cyklinu D1 poskytlo spolehlivý nástroj diferenciální diagnostiky lymfomů. U 78/79 vyšetřených MCL jsme prokázali overexpresi cyklinu D1. U žádného z testovaných jiných B-NHL ani kontrolních vzorků jsme vysokou expresi cyklinu D1 nezaznamenali. Sledování hladiny exprese cyklinu D1 má význam pro detekci choroby v kostní dřeni, neboť jsme detekovali zvýšenou hladinu cyklinu D1 u aspirátů KD s infiltrací MCL. Navíc sledování úbytku případně nárůstu hladiny cyklinu D1 je vhodné pro sledování dynamiky onemocnění. U žádného vzorku KD z kontrolní skupiny ani ostatních B-NHL jsme nezjistili zvýšenou hladinu exprese cyklinu D1.

Zavedli jsme nový přístup objektivního hodnocení proliferační aktivity nádorů na kvantitativní úrovni pomocí RT-RQ-PCR analýzy mRNA Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2. Hladina exprese vyšetřených proliferačních markerů vzájemně silně korelovala u všech analyzovaných vzorků. Potvrdili jsme roli Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 pro stanovení proliferační aktivity nádoru. Buněčná proliferace byla u jednotlivých nádorů v testovaném souboru pacientů variabilní. Ve skupině pacientů s MCL, jinými B-NHL i BL jsme zaznamenali nádory s vysokou, střední i nízkou proliferační aktivitou. Variabilita exprese proliferačního markeru Ki67 může odrážet heterogenní klinický obraz onemocnění jednotlivých pacientů. Celkově jsme zaznamenali rozdílnou proliferační aktivitu stanovenou pomocí kvantitativní analýzy pro jednotlivé skupiny pacientů. Podle očekávání nejvíce proliferovala skupina pacientů s BL, nejméně kontrolní skupina pacientů s reaktivní lymfadenopatií. Skupina ostatních NHL a MCL ukázala střední míru proliferace, která se statisticky významně lišila od proliferace vzorků s BL a reaktivní lymfadenopatií.

Hladina mRNA cyklinu D1 je vyšší u pacientů s vyšší proliferační aktivitou stanovenou pomocí topoisomerasyIIα a TPX2 (markery S, G2 a M fáze buněčného cyklu). Nezaznamenali jsme statisticky významnou korelaci hladiny exprese cyklinu D1 s expresí Ki67 (markerem G1, S, G2 a M fáze buněčného cyklu). Cyklin D1 má zásadní vliv během pozdní G1 fáze a v přechodu do S fáze buněčného cyklu. Korelační analýza nepotvrdila asociaci Ki67 a cyklinu D1, neboť hladina Ki67 je zkreslena frakcí buněk v G1 fázi. Cyklin D1 je v přímém vztahu k expresi molekul specifických v S, G2 a M fázi. Nalezený vztah podporuje kvantitativní model pro řízení G1/S transice.

Metoda RT-RQ-PCR umožňuje sledovat pacienty s MCL na molekulární úrovni. Z dosažených výsledků je patrné, že kvantitativní stanovení hladiny cyklinu D1 je vhodným nástrojem diferenciální diagnostiky MCL. Jak vyplývá z korelační analýzy hladiny cyklinu D1 a proliferační aktivity MCL, regulace buněčného cyklu prostřednictvím cyklinu D1 pravděpodobně probíhá více na kvantitativní než kvalitativní úrovni. Proliferace má přímý dopad na určení charakteru onemocnění MCL a napomáhá stratifi-

kaci pacientů z hlediska individuální prognosy onemocnění před zahájením léčby. Rutinní kvantitativní detekce proliferačních aktivity umožní sledovat prognostický význam proliferačních markerů na rozvoj onemocnění a zlepšit porozumění vlivu exprese proliferačních markerů v patogenezi nejen MCL. Hladina exprese Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 umožňuje stanovit proliferační aktivitu nádoru, kterou lze využít k predikci klinického vývoje onemocnění a individualizaci terapie podle rizika.

Projekt je podporován grantem GAUK 200055, 46/2006/C/2. LF a výzkumným záměrem MZO 00064203/6704