

# STANOVENÍ APOPTOTICKÉHO A MITOTICKÉHO INDEXU U NON-HODGKINSKÝCH MALIGNÍCH LYMFOMŮ: METODICKÁ STUDIE

## ASSESSMENT OF APOPTOTIC AND MITOTIC INDICES IN MALIGNANT NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS: A METHODOLOGICAL STUDY

VAGUNDA V., VESELÝ K., POCHMON D.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV V BRNĚ

**Souhrn:** Na archivním formol-parafinovém materiálu 54 non-Hodgkinských maligních lymfomů (NHL) byly testovány dvě varianty stanovení celularity, apoptotického (AI) a mitotického indexu (MI) s použitím systému analýzy obrazu LUCIA G. V první variantě byla hodnocena místa s maximální mitotickou aktivitou, v druhé byl výběr hodnocené plochy náhodný. Celularita byla průměrně 2608 buněk na 0,126 mm<sup>2</sup>, resp. 2954 u náhodné selekce, MI průměrně 1,61 %; resp. 0,28 %, AI průměrně 0,97 %; resp. 0,56 %. Statisticky nebyly nalezeny významné rozdíly v hodnotách celularity a AI, ale významně se lišily absolutní hodnoty MI. MI a AI přitom významně pozitivně korelovaly v obou metodách i mezi sebou navzájem (všechna p < 0,0001). Kromě výborné reprodukovatelnosti stanovení nádorové celularity studie ukazuje, že obě metody stanovení AI a MI jsou vhodné pro další prognostické resp. prediktivní studie. Obě varianty metody potvrdily kladnou závislost MI a AI u NHL. Nově bylo nalezeno, že apoptóza u NHL je difúznější proces v protikladu k fokálně akcentované proliferací aktivítě. Závěrem je poukázáno na nutnost zlepšení dosud relativně značné interpersonální variability stanovení AI.

**Klíčová slova:** nádorová celularita, apoptotický index, mitotický index, non-Hodgkinské lymfomy

**Summary:** We tested two variants of assessment of tumour cellularity, apoptotic (AI) and mitotic indices (MI) in paraffin-embedded tissues from 54 malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL), by using an image analysis system LUCIA G. Areas with maximal mitotic activity were evaluated in the first variation of the method. In the second variant, selection of examined areas was random. The average tumour cellularity was 2608 cells per 0.126 mm<sup>2</sup>, 2954 with random selection; of MI 1.61%, 0.28%; of AI 0.97%, 0.56%, respectively. Significant differences were not found between values of cellularity and AI, but absolute values of MI were significantly different in statistical analysis. MI and AI positively correlated in both variants (all p < 0.0001). In addition to excellent reproducibility of tumour cellularity estimation, the study shows that both variations of assessment of MI and AI are suitable for further prognostic and predictive studies. Both variants confirmed a positive interrelationship between AI and MI in NHLs. The study newly revealed that apoptosis in NHLs is a diffuse phenomenon in contrast to focally accentuated proliferation activity. Finally, the relatively high interpersonal variability needs to be improved.

**Keywords:** tumour cellularity, apoptotic index, mitotic index, non-Hodgkin's lymphomas

### Úvod

Mezi prognostické parametry nádorů, studované v posledních letech, patří mitotický (MI) a apoptotický (AI) index, u některých typů též celularita. (1) U non-Hodgkinských maligních lymfomů (NHL) bylo opakovaně prokázáno, že MI je, spolu s dalšími proliferací markery, významným prognostickým parametrem (2,3), přičemž je zjišťována signifikantní pozitivní korelace mezi proliferací indexy a AI (4,5,6,7). Některé studie ukazují, že vysoký AI může být nepříznivým prognostickým faktorem, nezávisle na histologickém gradu (4,8). Protože se jedná o relativně nově zavedené metody, je nezbytné ověření jejich reprodukovatelnosti a klinické validity. Cílem naší studie bylo srovnání výsledků dvou variant detekce MI a AI a zhodnocení jejich předností resp. nevýhod.

### Materiál a metody

Byl použit archivní formol-parafinový materiál, bloky se vzorky od 54 pacientů s B-NHL, ze kterých byly zhotoveny řezy o tloušťce 7 μm a nabarveny Mayerovým hematoxylinem. Při morfologické identifikaci a počítání mitotických a apoptotických figur byl využit systém analýzy obrazu LUCIA G. Detekce apoptotických buněk je prováděna na základě těchto morfologických charakteristik: kondenzace chromatinu, marginace chromatinu při jaderné membráně, tvorba apoptotických tělísek, ztráta kontaktu apoptotické buňky s okolím. Použití zvětšení optického mikroskopu bylo 400x. U každého případu byly mitotické a apoptotické figury odečítány na devíti

polích o celkové ploše 0,126 mm<sup>2</sup>, přičemž jedno pole odpovídalo cca 1/14 zorného pole mikroskopu o ploše 0,014 mm<sup>2</sup>, zvětšené systémem analýzy obrazu na velikost obrazovky monitoru počítače. Každé snímané pole bylo archivováno pro pozdější stanovení celularity.

U varianty metody A byla provedena preselektce na plochu s maximální mitotickou aktivitou, u varianty B byl výběr plochy náhodný.

Nádorová celularita byla stanovována jako počet jader nádorových buněk semiautomaticky s použitím systému analýzy obrazu u každého případu na všech 9 polích, totožných s lokalitami, na kterých byly odečítány apoptotické i mitotické figury. Pomocí automatického nastavení prahů v binární masce obrazu, kombinovaného s manuální korekcí binární masky, byly systémem analýzy obrazu spočítány nádorové buňky. Nenádorové (reaktivní) buňky byly vyloučeny, opět manuální korekcí.

Po stanovení nádorové celularity byly u každého případu vypočítány AI a MI v procentech.

Pro statistické hodnocení získaných dat byl využit Wilcoxonův párový test se stanovením Spearmanova korelačního koeficientu. U srovnávaných dat, jevících normální rozložení, byl stanoven Pearsonův korelační koeficient.

### Výsledky

Histologicky s využitím systému analýzy obrazu byl určen celkový počet nádorových jader u metody A průměrně 2608,1 +/- 972,3, u metody B průměrně 2954,8 +/- 1036,0. Mitotický

index stanovený jako procento mitotických figur z celkového počtu jader nádorových buněk byl při metodě A průměrně 1,61 +/- 1,50 a při metodě B 0,28 +/- 0,14. Apoptotický index byl průměrně 0,97 +/- 1,84, respektive 0,56 +/- 0,84.

Počty nádorových jader stanovených oběma metodami nevykazují statisticky významný rozdíl ( $r=0,92$ ;  $p<0,0001$  /Pearson/), stejně jako počty apoptotických figur ( $r=0,63$ ;  $p<0,0001$ ).

Počty mitóz získané oběma metodikami se značně liší, ale je mezi nimi závislost při stanovení Spearmanova korelačního koeficientu ( $r=0,57$ ;  $p<0,0001$ ).

Při srovnání hodnot MI získaných metodou A a B byla zjištěna statisticky významná korelace ( $r=0,72$ ;  $p<0,0001$ ). Totéž platí pro hodnoty AI ( $r=0,75$ ;  $p<0,0001$ ).

Dále byla prokázána statistická závislost mezi hodnotami MI a AI v rámci obou metod, u metody A:  $r=0,85$ ;  $p<0,0001$ , u metody B:  $r=0,75$ ;  $p<0,0001$ .

## Diskuse

Standardizace měření vyžaduje znalost možných zdrojů chyb. Lze je hledat v těchto oblastech: zpracování bioptického materiálu - fixace a parafinová procedura, varírující síla řezů. Zde by se výhodně uplatnily polosilné řezy z materiálu zalitého v syntetických pryskyřicích. Největší problémy lze ovšem očekávat z hlediska selekce měřené plochy a intra a interpersonální variability při detekci apoptotických a mitotických figur, stejně tak při stanovení nádorové celularity.

Studie překvapivě ukázala, že stanovení nádorové celularity s využitím systému analýzy obrazu poskytl nezávisle na typu selekce hodnocené plochy výborně reprodukovatelné výsledky, vyjádřené velmi těsnou korelací. Srovnání s literárními údaji není snadné, neboť variabilita hodnocení celularity na lymfomech není studována.

Co se týká interpersonální variability při stanovení AI opticky, z nečetných literárních pramenů je patrné, že je poměrně vysoká. Podle práce Hawkinse et al. (9), srovnávající detekci apoptózy metodou ISEL (obdoba TUNELu z hlediska koncové detekce) s počítáním apoptotických figur u kolorektálních karcinomů, byla variabilita vyjadřována jako rozdíl mezi průměrnými hodnotami AI zjištěné dvěma pozorovateli, vztahenými k větší hodnotě průměrného AI, a byla v rozmezí 24 - 70 %. Pokud bychom obdobně vyjádřili variabilitu mezi námi provedenými metodikami, její hodnota by byla 42,3 %. Poněvadž z této hodnoty jde v naší práci jen část na vrub interpersonální variability, lze u nás předpokládat menší interpersonální variabilitu a větší reprodukovatelnost.

Co se týká výše hodnot AI, ze srovnání se studií na lymfomech, provedenou flow cytometricky (10), kde byl stanoven medián frakce apoptotických nádorových buněk 1,1 %, vyplývá, že této hodnotě se blíží spíše údaj zjištěný metodou se selekcí na místa nejvyšší mitotickou aktivitou (průměr 0,97%). Tato diference může být částečně připsána metodě značení apoptotických buněk ve

výše zmíněné studii, kdy byl k detekci použit TUNEL. Tato technika je běžně užívána, ovšem není zcela specifická, neboť jsou slabě barveny i buňky zanikající nekrozou. Dalším zdrojem rozdílů je schopnost této techniky značit buňky v časné fázi apoptózy, které dosud nejeví její klasické morfologické rysy. Podle studie provedené na našem ústavu (11) byl počet apoptotických buněk detekovaných TUNELem cca o 20 % vyšší než opticky.

Dále je zřejmé, že ačkoli se absolutní počty mitóz získané oběma variantami liší, což vyplývá ze samotné podstaty metod, četnost mitotických figur po korekci na celularity vykazuje statisticky významnou korelaci. To naznačuje, že by mohlo být z hlediska výpočtu MI lhostejné, který způsob výběru hodnocené plochy bude použit. V literatuře jsou uváděny obě možnosti stanovení markerů proliferace, tedy jak stanovení z náhodně vybraných polí histologických řezů, tak určování z míst nejvyšší proliferativní aktivity (4, 5, 12). Je vhodné ověření tohoto nálezu v rozsáhlejší studii.

Naše studie potvrdila opakovaně prokazovanou pozitivní korelaci AI a MI (4, 5, 6, 7). Tyto nálezy podporují hypotézu, že mechanismy regulující apoptózu a mitózu jsou aktivovány v průběhu buněčného cyklu společně. Osud buňky je nakonec dán komplexní, dosud detailně neznámou interakcí prouřstových a supresorových signálních faktorů.

Dalším výsledkem studie je zjištění, že apoptóza u NHL je v podstatě difúzní proces. Lze předpokládat velmi komplexní řídicí mechanismus, v terminálních stádiích odlišný od regulace proliferace. V případě alterace apoptotického mechanismu (např. p53) není tato selektována na proliferující partie nádoru. Naopak mitotická aktivita je fokálně akcentována lokálními faktory nebo vlivem mutační klonální selekce.

Při hodnocení časové efektivity obou našich metodik se jeví z hlediska rychlosti provedení výhodnější varianta bez nutnosti selekce na místa s nejvyšší proliferativní aktivitou. To je dáno časově náročným vyhledáváním oblastí s maximální mitotickou aktivitou v celém preparátu.

Závěrem je možno konstatovat, že metody užívající ke stanovení kvantitativních parametrů buněčné kinetiky optickou detekci, jsou sice subjektivní, zatíženy intra i interpersonální variabilitou, ale jiné postupy se nejeví přesnější (7, 9). Důraz na standardizaci a získání metodické praxe variabilitu snižuje. Do budoucna je perspektivní testování biologického významu odlišností AI a MI, získaných různými variantami metodik, ve vztahu ke klinickým prognostickým ukazatelům.

**Studie byla provedena v rámci grantového projektu GAČR No. 301/96/K047 a podpořena darem Kanadského velvyslanectví v Praze z výtežku Běhu Terryho Foxe a firmou Ferring-Léciva a. s. Praha.**

**Autoři děkují paní Libuši Rašovské za spolupráci při hodnocení celularity obrazovou analýzou LUCIA G.**

## Reference:

1. Kerr J. F. R., Winterford C. M., Harmon B. V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:201-326.
2. Donhuijsen K. Mitoses in non-Hodgkin's lymphomas. Frequency and prognostic relevance. *Pathol. Res. Pract.* 1987;182(3):352-357.
3. Akerman M., Brandt L., Johnson A., Olsson H. Mitotic activity in non-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to prognosis. *Br. J. Cancer* 1987;55(2):219-223.
4. Leoncini L., Del Vecchio M. T., Megha T., Barbini P., Galieni P., Pileri S., Sabattini E., Gherlinzoni F., Tosi P., Kraft R. et al. Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1993; 142(3):755-763.
5. Gisbertz I. A. M., Schouten H. C., Bot F. J., Arends J.-W. Cell turnover parameters in small and large cell varieties of primary intestinal Non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1988; 83(1):158-65.
6. Vagunda V., Kalabis J., Pochmon D., Petráková K., Koukalová H., Vagundová M., Drbal J., Havránková L. Apoptotický a mitotický index u B lymfómů: Analýza prognostických faktorů u 53 pacientů se 7-letým sledováním. V tisku *Klinická onkologie* 1998.
7. Gisbertz I. A. M., Schouten H. C., Bot F. J., Arends J.-W. Proliferation and apoptosis in primary gastric B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1997;30(2):152-159.
8. Takano Y., Saegusa M., Ikenaga M., Okayasu I. Apoptosis and proliferative activity of non-Hodgkin's lymphomas: comparison with expression of bcl-2, p53 and c-myc proteins. *Pathol Int* 1997;47(2-3):90-94.
9. Hawkins N. J., Lees J., Ward R. L. Detection of apoptosis in colorectal carcinoma by light microscopy and in situ end labelling. *Analyt Quant Cytol Histol* 1997;19(3):227-232.
10. Stokke T., Holte H., Smedshammer L., Smeland E. B., Kaalhus O., Steen H. B. Proliferation and apoptosis in malignant and normal cells in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 1998 Jun;77(11):1832-1838.
11. Vagunda V., Kalabis J., Pochmon D. Detection of apoptosis: good correlation between the apoptotic figure counting and the TUNEL technique. V tisku *Analyt Quant Cytol Histol* 1998.
12. del Vecchio M. T., Leoncini L., Buerki K., Kraft R., Megha T., Barbini P., Tosi P., Cottier H. Diffuse centrocytic and/or centroblastic malignant non-Hodgkin's lymphomas: comparison of mitotic and pyknotic (apoptotic) indices. *Int J Cancer* 1991;47:38-43.