

# původní práce

## APOPTOTICKÝ A MITOTICKÝ INDEX U B LYMFOMÍJ: ANALÝZA PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ U 53 PACIENTŮ SE 7LETÝM SLEDOVÁNÍM

## APOPTOTIC AND MITOTIC INDEXES IN B LYMPHOMAS: PROGNOSTIC FACTOR ANALYSIS IN 53 PATIENTS WITH 7 YEAR FOLLOW-UP

VAGUNDA V., KALABIS J., POCHMON D., PETRÁKOVÁ K., KOUKALOVÁ H., VAGUNDOVÁ M., DRBAL J., HAVRÁNKOVÁ L.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**Souhrn:** U 53 B lymfomů byly hodnoceny tyto prognostické parametry: grade (Kiel), věk, stadium, apoptotický a maximální mitotický procentní index, celularita a procento CD45RO pozitivních (T reaktivních) buněk; s pomocí obrazové analýzy systémem LUCIA-G. Dále semikvantitativně procento Bcl-2 a Ki-67 nádorových buněk a akumulace p53 a p21. Při korelační statistické analýze apoptotický index výsoce pozitivně koreloval s gradem, s mitotickým indexem, Ki-67 a p53 imunopositivitou. Negativně výrazně koreloval s Bcl-2, přičemž Bcl-2 negativně korelovala s p53. Nebyla nalezena korelace s p21, s počtem CD45RO buněk ani s přežitím, disease-free intervalem či stádiem. Výsledky ukazují, že apoptóza u B lymfomů je Bcl-2 dependentní. Potvrdilo se, že u lymfomů je při vyšší proliferaci (mitózy či Ki-67) zároveň i vyšší počet apoptóz. Komplexní regulační mechanismy jsou předmětem diskuse. Upřesnění vzájemných vztahů, i k prognóze, lze dále očekávat od multivariační analýzy. Apoptoticko-mitotický index, alterace p53 a Bcl-2 jsou velmi nadějnými prediktivními faktory pro specifické typy protinádorové terapie.

**Klíčová slova:** B lymfom, apoptóza, proliferace, Bcl-2, p53, prognóza.

**Summary:** Prognostic factors of 53 B lymphomas were evaluated: Grade (Kiel), age, stage, apoptotic and maximal mitotic indexes, cellularity and percent of CD45RO cells (T reactive); with the aid of the image analysis system LUCIA-G. Percent of Bcl-2<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup> tumor cells, and overexpression of p 53 and p 21 were evaluated semiquantitatively. For apoptotic index, statistical analysis revealed high positive correlation with grade, mitotic index, Ki-67 and p53 overexpression while a negative correlation was found with Bcl-2. No correlation appeared with p21, number of CD45RO cells, stage, disease-free interval and survival. Bcl-2 showed negative correlation with p53 overexpression. The results demonstrate dependence of apoptosis on Bcl-2. They confirm that with B lymphomas high proliferation (Ki-67 or mitoses) is associated with a high number of apoptoses. Complex regulation mechanisms are discussed. Further multivariate statistical analysis is desirable to reveal mutual interrelationships, including prognosis. Apoptotic and mitotic indexes, Bcl-2 and p53 alterations are very promising factors for predicting results of specific anti-tumor therapy.

**Key words:** B lymphoma, apoptosis, proliferation, Bcl-2, p53, prognosis.

### tvod

Mezi prognostickými a prediktivními faktory u nádorů jsou často studovány proliferací markery. I když je dobře známo, že neoplastický růst závisí na rozdílu mezi produkcí a ztrátou buněk, je v humánních nádorech překvapivě málo kvantitativních informací o zániku nádorových buněk apoptózou.

V této studii jsme se kromě hodnocení apoptózy u lymfomů také zaměřili na studium biologických markerů asociovaných s apoptotickým procesem, kde lze očekávat nejen přínos k poznání mechanismů apoptózy, ale také terapeutické implikace.

### Materiál a metodika

Z archivního materiálu M O Ú Brno bylo vybráno 53 B lymfomů, kde pacienti byli po standardní léčbě dlouhodobě sledováni. Všechny diagnózy byly ověřeny imunohistochemicky s CD20, CD45RO, kappa, lambda i širším panelem protilátek dle individuální potřeby a revidovány dle Lennerta a Felleri (A). U každého případu byly kromě věku, Kielské klasifikace a klinického stádia vyhodnoceny následující předléčebné prognostické parametry.

Mitózy, apoptózy, CD45RO buňky a celularita byly spočítány s použitím automatického systému pro analýzu obrazu LUCIA G verze 3.52, vybaveném 3 CCD kamerou Hitachi. Po

nabarvení tenkých řezů HE byl proveden předvýběr měřené plochy se zřetelem k maximální mitotické aktivitě a zde následně počítání mitotických a apoptotických figur s použitím objektivu 40x a živého okna na obrazovce počítače. Bylo hodnoceno vždy 9 přilehlých obrazovkových polí o celkové ploše 0,12635 mm. čtv. Jako apoptotická figura se hodnotila buď typická buňka s kondenzací a marginací chromatinu nebo typické tělíčko tvořené densní chromatinovou hrudkou velikosti alespoň 0,5 mikrometru. V případech vícečetných, u sebe se nacházejících tělísek, byla provedena opticky integrace podle množství a plochy, na které byla rozmístěna, do 1 či 2 apoptotických figur. V archivovaných obrazech byla následně napřahována jádra a po individuální korekci, s vyloučením nenádorových elementů, stanovena automaticky celularita a semiautomaticky počet CD45RO elementů. Průměrně bylo hodnoceno 2330 nádorových buněk najeden lymfom.

Imunoreakce byly provedeny obvyklým způsobem s použitím protilátek Novocastra, pouze pro Ki67 byla použita MIB-1 Biogenex a pro p21 WA1 (MÓÚ). Kromě Bcl-2 a protilátek proti CD a lehkým řetězcům, byla použita metodika revitalizace antigenů ve speciální mikrovlnné troubě microMED BASIC - pro Ki67, p53 (DO1, DO11) a p21. Imunopositivita nádorových buněk byly hodnoceny semikvantitativně v pro-

centech, vždy nejméně dvěma patologi. Pro akumulaci (overexpresi) p53 a p21 byla zvolena prahová hodnota 5%, u p53 detekovaná alespoň jednou z obou použitých protilátek. Při statistickém hodnocení byl použit Spearmanův pořadový korelační koeficient, systém STATA.

### Výsledky

Dle Kielské klasifikace bylo v sestavě 41% high grade lymfomů a 59% low grade lymfomů. Průměrný věk pacientů byl 53,7 let. Celkové přežití bylo 34% při průměru 51,3 měsíců, s bezpříznakovým přežitím v průměru 29,8 měsíců.

Apoptotický procentní index kolísá v rozsahu 0,01 - 11,75% při průměru 0,97%. Maximální mitotický index byl 0,12 - 5,57%, s průměrem 1,61%. Obrazovou analýzou bylo vyhodnoceno průměrně 2330 buněk na jeden lymfom, celularita byla od 4662 do 35773 buněk na čtver. mm. Procentní rozsahy imunopositivity byly: CD45RO 0,2 - 51%, Bcl-2: 0 - 95%, Ki 67: 5 - 85%. Akumulaci p53 vykazovalo 15% lymfomů, u p21 jen 4%.

Při korelační analýze apoptotický index vysoce pozitivně koreloval s gradem dle Kielské klasifikace ( $r=0,72$ ,  $p<0,001$ ), s mitotickým indexem (obr.č. 1,  $r=0,837$ ,  $p<0,001$ ), Ki-67 ( $r=0,724$ ,  $p<0,001$ ) a p53 ( $r=0,350$ ,  $p=0,01$ ) akumulací. Negativně výrazně koreloval s Bcl-2 (obr.č. 2,  $r=-0,663$ ,  $p<0,001$ ), přičemž Bcl-2 negativně korelovala s p53 ( $r=-0,341$ ,  $p=0,012$ ). Nebyla nalezena korelace s p21, s počtem CD45RO buněk ani s přežitím, disease-free intervalem či stádiem.

Dále byly nalezeny statisticky významné negativní korelace mezi Bcl-2 a gradem ( $r=-0,603$ ,  $p<0,001$ ), Ki-67 ( $r=-0,668$ ,  $p<0,001$ ) a mitotickým indexem ( $r=-0,644$ ,  $p<0,001$ ). Mitotický index pozitivně koreloval s Ki-67 ( $r=0,713$ ,  $p<0,001$ ), gradem ( $r=0,70$ ,  $p<0,001$ ) a p53 akumulací ( $r=0,437$ ,  $p=0,001$ ), tato také pozitivně s Ki-67 ( $r=0,308$ ,  $p=0,023$ ). Procento CD45RO ( $r=0,335$ ,  $p=0,016$ ) buněk korelovalo pozitivně pouze s mitotickou aktivitou. Celularita korelovala negativně pouze s p53 ( $r=-0,380$ ,  $p=0,005$ ).

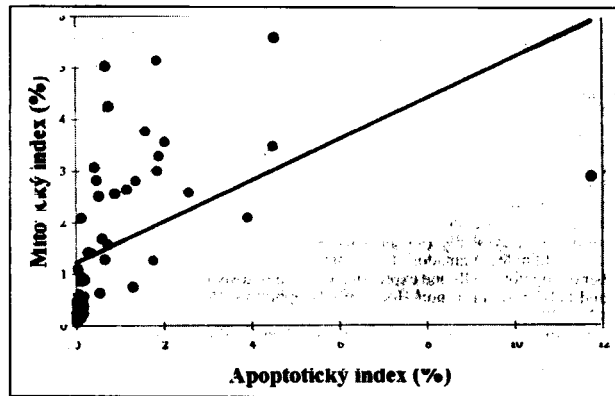
### Diskuse

Potvrdilo se, že u B lymfomů výborně mezi sebou korelují grade a proliferace (2,3), ať již stanovená mitotickým indexem či Ki-67. Tyto tři kladně korelují s apoptotickým indexem. Tento náleží může být specifický pro lymfomy. Nález zároveň podporuje hypotézu, že mechanismy kontrolující apoptózu a proliferaci jsou zde společně aktivovány v průběhu buněčného cyklu (4). Zda buňka nakonec přejde do mitózy či podlehne apoptóze závisí na dalších regulačních faktorech. Vysoká spontánní apoptóza u lymfomů tedy není prognosticky příznivým faktorem, ukazuje na vysoký buněčný obrát u skupiny s vysokou malignitou. Ověření prognostického významu kombinovaných proliferace - apoptotických indexů, včetně indexu apoptóza plus mitóza, zůstává v centru dalšího výzkumu.

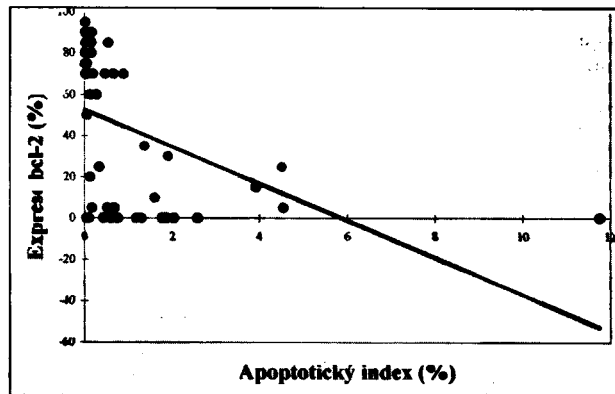
Na rozdíl od některých studií (5, 6) byla prokázána negativní korelace mezi apoptotickým indexem a Bcl-2 (7), kde vyšší imunopositivita antiapoptotického Bcl-2 souvisí s nízkou frekvencí apoptózy. Regulační vztahy mohou být ovšem velmi složité a komplexní, jak naznačuje i negativní korelace mezi Bcl-2 a mitotickým indexem a zejména vztahy všech uvedených parametrů k p53 (8). Tento má komplexní funkci (regulace několika stovek genů), je „proapoptotický“ a mj. aktivuje transkripci BAX, který je akcelerátorem apoptózy. BAX inhibuje Bcl-2, což potvrzuje i námi nalezená negativní korelace mezi p53 a Bcl-2. Tento nález naznačuje, že akumulovaný (overexpresovaný) p53 je u většiny B lymfomů funkční, což je zároveň doloženo nalezenou kladnou korelací mezi apoptózou a p53 akumulací a nakonec podpořeno být nečetnými literárními údaji o relativně malé frekvenci mutací p53 u lymfomů (9).

Na druhou stranu, nalezená pozitivní korelace mezi p53 a proliferací, jedná-li se ovšem vůbec o příčinnou závislost - může souviset s účastí specificky mutovaného p53 v kancerogenezi vysoce proliferujících lymfomů, jak naznačují některé literární údaje. Překvapivě nízká overexprese p21 neumožnila pro-

Obr. 1. Korelace apoptotického a mitotického indexu



Obr. 2. Korelace apoptotického indexu a exprese bcl-2



vést podrobnější statistickou analýzu a tím ani nepřispěla k otázce vzájemného vztahu s p53. Pro poznání regulačních mechanismů zůstává klíčové ověření mutací a také funkčnosti p53, např. testem FASAY, kdy mutace nemusí znamenat ztrátu aktivity. Tyto testy jsou ovšem často limitovány dostupností čerstvého materiálu a finanční náročností.

Dále nalezené korelace, negativní mezi p53 a celularitou, pozitivní mezi procentem CD45RO buněk a mitotickou aktivitou mohou být náhodnými nálezy, ale také zprostředkovaným výrazem biologických vazeb. CD45RO buňky, většinou T reaktivní (ojediněle jsou pozitivní i nádorové B buňky) mohou komplexními imunologickými mechanismy zvyšovat proliferaci nádorových B buněk. Úpřesnění vzájemných korelací i vztahů k prognóze lze dále očekávat od multivariační analýzy.

Apoptotický index (10) či související alterace Bcl-2 (11, 12, 13) a p53 (14) se v některých studiích ukazují jako prognostické faktory nezávislé na tradičních. Jiné studie (15), včetně naší, tuto nezávislost nepotvrzují. Nejednotné výsledky mohou být dány rozdíly v terapeutických protokolech, kdy naprostá většina pacientů je specificky léčena, takže nelze studovat souvislosti s přirozeným průběhem choroby. V každém případě jde o velmi nadějně faktory pro predikci účinnosti specifické terapie (16), včetně chemo a radioterapie. Apoptotický a mitotický index jsou do budoucna, až bude šířeji zavedeno hodnocení sekvenčních biopických či cytologických odběrů, důležitými parametry v hodnocení účinnosti protinádorové terapie, zejména nových agresivních vysokodávkových režimů.

Práce byla provedena v rámci grantového projektu GAČR No. 301/96/K047a podpořena darem Kanadského velvyslanectví v Praze z výtěžku Běhu Terryho Foxe.

Děkujeme za provedení imunoreakcí paní H. Bursové a E. Mikoškové a za hodnocení celularity v systému LUCIA paní L. Rašovské.

#### Literatura:

- 1 Lennert, K., Feller, A. C. et al.: Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1981, 1990.
- 2 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, 30, 1997, s. 152-159.
- 3 Takano, Y., Saegusa, M., Masuda, M. et al.: Apoptosis, proliferative activity and Bcl-2 expression in Epstein-Barr-virus-positive non-Hodgkin's lymphomas. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123, 1997, s. 395-401.
- 4 Du, M., Singh, N., Hussein, A. et al.: Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). J. Pathol., 178, 1996, 4, s. 379-384.
- 5 Symmans, W. F., Katz, R. L., Ordonez, N. L. et al.: Transformation of follicular lymphoma. Expression of p53 and bcl-2 oncoprotein, apoptosis and cell proliferation. Acta Cytol. 39, 1995, 4, s. 673-682.
- 6 Aftabuddin, M., Yamadori, I., Yoshino, T. et al.: Correlation between the number of apoptotic cells and expression of the apoptosis-related antigens Fas, Le(y) and bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas. Pathol. Int., 45, 1995, 6, s. 422-429.
- 7 Leoncini, L., Del Vecchio, M. T., Spina, D. et al.: Presence of the bcl-2 protein and apoptosis in non-Hodgkin's lymphomas with diffuse growth pattern. Int. J. Cancer. 61, 1995, 6, s. 826-831.
- 8 Takano, Y., Saegusa, M., Ikenaga, M.: Apoptosis and proliferative activity of non-Hodgkin's lymphomas compared with expression of bcl-2, p53 and c-myc proteins. Pathol. Int. 47, 1997, 2-3, s. 90-94.
- 9 Koduru, P. R., Raju, K., Vadmal, V.: Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Blood 90, 1997, 10, s. 4078-4091.
- 10 Leoncini, L., Del Vecchio, M. T., Megha, T.: Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. Am. J. Pathol. 142, 1993, 3, s. 755-763.
- 11 Gascoyne, R. D., Adomat, S. A., Krajewski, S.: Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Blood 90, 1997, 1, s. 244-251.
- 12 Hill, M. E., MacLennan, K. A., Cunningham, D. C., Vaughan, H. B. et al.: Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. Blood, 88, 1996, 3, s. 1046-1051.
- 13 Herminé, O., Haioun, C., Lepage, E. et al.: Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood. 87, 1996, 1, s. 265-272.
- 14 Piris, M. A., Pezzella, F., Martinez-Montero, J. C. et al.: p53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. Br. J. Cancer. 69, 1994, 2, s. 337-341.
- 15 Czader, M., Mazur, J., Pettersson, M.: Prognostic significance of proliferative and apoptotic fractions in low grade follicle center cell derived non-Hodgkin's lymphomas. Am. Cancer Soc. 26, 1995, 6, s. 1180-1188.
- 16 Milross, C. G., Mason, K. A., Hunter, N. R.: J. Natl. Cancer Inst. 88, 1996, 18, s. 1308-1314.

# informace

## INFORMACE OSJEZDU

XXIII. brněnské onkologické dny  
XX. OEI Scientific Meeting  
XIII. konference SZP  
Brno, 7.-9. května 1999

Brněnské onkologické dny budou mít v roce 1999 netradiční scénář, formu a obsah. Organizace evropských onkologických ústavů (Organisation of European Cancer Institutes, OEI, člen UICC), který sdružuje 80 evropských pracovišť, pořádá každý rok v jednom z členských center Scientific Meeting k vybrané topice. Organizací slavnostního XX. OEI Scientific Meeting byl pověřen Masarykův onkologický ústav a proběhne v rámci Brněnských onkologických dnů. Brněnské onkologické dny budou mít všechny obvyklé součásti: setkání vedoucích center Národního onkologického registru v krajích a okresech a vedoucích sester, Konferenci SZP, satelitní sympozia. Hlavní odborný program budeme sdílet s 80 řediteli evropských onkologických ústavů a takřka 100 zahraničních a domácích patologů, proto je oficiálním jazykem **angličtina**.

Téma onkologických dnů „Advances in Biology and Treatment of Breast Cancer“ je pojato jako edukační, s důrazem na kvalitu přednášejících, aby byly splněny náročné podmínky OEI.

Vědecký program je rozdělen do tří sekcí:

1. Advances in Molecular Biology. Prognostic and Predictive Pathology
2. Advances in the Treatment of Early Breast Cancer
3. Advances in the Treatment of Metastatic Breast Cancer

OEI Pathology Group má vlastní paralelní edukační program:

1. Grading in Neoplastic Diseases and Premalignant Related Lesions
2. Fact and Controversies on Breast Cancer
3. Slide seminar: Unusual Cases in Breast Pathology
4. Fine Needle Cytology Pathology

Ze zahraniční se aktivně účastní např.: B. Weberová (USA), L. Teppo (Finsko), B. Gusterson (Velká Británie), C. Elston (Velká Británie), P. E. Lonning (Norsko), C. Hudis (USA), T. Petit (Francie), V. J. V. D. Steene (Belgie), J. M. Nabholz (Kanada), S. Rodenhuis (Holandsko), P. F. Conte (Itálie).

Domácí autoři mohou odevzdat postery v anglickém jazyce.

V případě, že jste ještě neodbrželi pozvánku a program cestou Onkologické společnosti, můžete se obrátit na paní Pavlu Hodesovou, Oddělení epidemiologie nádorů M O Ů, tel. 05/43 13 69 05, E-mail: [direct@mou.cz](mailto:direct@mou.cz).