

A p53 /CD38/Zap70 coexpresszió a B-sejtes lymphocytás leukaemia (CLL)/kis lymphocytás lymphoma (SLL) megbízható prognosztikus markere

Horváth Emőke¹, Căndeia Marcela², Turcu Mihai¹, Drăguț Denisa o.h., Pávai Zoltán³, Chira Liliana¹, Mezei Tibor¹
Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Patológiai Tanszék, ²1. sz. Belgyógyászati Klinika, ³Anatómia és Fejlődéstan Tanszék

Coexpresia p53 /CD38/Zap70 este un factor prognostic fidel în leucemie limfocitară cronică/ limfom B cu celule mici mature

Introducere: Leucemia limfatică cronică (LLC) este o afecțiune hematologică malignă, cu punctul de plecare din măduvă, care se transformă în tablou leucemic interesând și nodulii limfatici. Datorită heterogenității genotipului tumoral, doar 65% din cazuri prezintă evoluție lentă, restul cazurilor au evoluție agresivă cu scăderea semnificativă a supraviețuirii. **Material și metode:** Scopul studiului este selectarea cazurilor cu prognostic rezervat prin evaluarea perioadei de supraviețuire luând în considerare stadiul clinic, aspectul arhitectural al infiltratului osteomedular, respectiv coexpresia unor factori cu valoare prognostică și predictivă (p53/CD38/ZAP-70) care au rol decisiv în evoluția bolii. **Rezultate:** coexpresia antigenelor corelează cu stadiul clinic, cu aspectul infiltratului osteomedular și cu perioada de supraviețuire. **Concluzii:** Determinarea imunohistochimică a antigenelor sus amintite din infiltratul tumoral al țesutului osteomedular caracterizează aspectul molecular (statusul mutațional al genei IgH) al acestei boli și contribuie la alegerea conduitei terapeutice.

Cuvinte cheie: coexpresia p53/CD38/ZAP-70, CLL, prognostic

Co-expression of p53/CD38/Zap70 is a reliable prognostic factor in chronic lymphocytic leukaemia/mature small B-cell lymphoma

Introduction: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a malignant haematological disease. It starts from the bone marrow and transforms in leukaemia involving the lymph nodes, too. Due to genotypic heterogeneity only 65% of cases present a slowly progressive evolution, in the rest the disease is associated with an aggressive clinical course with decreased survival rate. **Materials and methods:** the aim of our study stands in selection of these patients and evaluation of survival period in the mirror of the clinical stage, architectural organization of the bone marrow infiltrate and the co-expression of some prognostic and predictive factors (p53/CD38/ZAP-70) decisively influencing the disease course. **Results:** p53/CD38/ZAP-70 co-expression correlates with disease stage, the pattern of osteomedullary infiltrate and the survival period. **Conclusions:** immunohistochemical determination of the antigens mentioned above from the tumour infiltration of the bone marrow characterizes the molecular mosaic of the disease (IgH gene mutations) in this disease entity and contributes to the choice of therapeutical strategy.

Keywords: p53/CD38/ZAP-70 co-expression, CLL, prognosis

Orvostudományi Értesítő, 2010, 83 (2): 122-125

www.orvudert.ro

A CLL molekuláris patológiájának a megismerése mérföldkövet jelentett a betegség heterogenitásának megértésében. 1999-ben több kutatócsoport eredményei igazolták, hogy a CLL biológiai viselkedésének háttérében az immunoglobulin nehézlánc (IgH) gén variabilis régiójának (V_H) mutációs státusát meghatározó, a TCR zéta-láncával asszociált tirozinkináz fehérjének (ZAP-70) kulcsszerep jut [5, 1]. A fehérje expressziója jól korrelál a mutált és nem mutált V_H gén státussal, CLL-ben az emelkedett ZAP-70 expresszió kedvezőtlen prognózissal utal. Időközben az is bebizonyosodott, hogy a „nem mutált státussal” összefüggő prognosztikus marker a CD38 fehérje, amelynek a kedvezőtlen prognózisú esetekben a p53 fehérje expressziójával együtt a fokozott proliferációs aktivitás kialakításában van szerepe [2, 12].

E három fehérje expressziójának immunhisztokémiai kimutatása jól használható a klinikai evolúció megítélésére és a terápia megtervezésére.

Anyag és módszer

Retrospektív vizsgálatunk a 2007- és 2008-ban kóris-

mézett B-sejtes lymphocytás leukaemia (CLL) eseteket tanulmányozza, amelyekben a diagnózis felállítása a morfológiai eltérések és a daganatsejtek jellegzetes immunfenotípusának (CD20/CD23/CD5 coexpresszió) vizsgálata alapján történt. Ebben a periódusban feldolgozott 137 csontvelő biopsziából (OMB) 46 esetben diagnosztizáltunk CLL-t az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2001-ből származó osztályozásának kritériumai (klinikai kritériumok, perifériás vér-, csontvelő-, és nyirokcsomó morfológia, valamint immunfenotípus) alapján. A 46 EDTA-ban méisztelenített, és standard feldolgozásnak alávetett biopsziás anyag újrazivsgálata után 26 csontvelő mintából végeztük el a p53/CD38/ZAP-70 coexpresszió meghatározását immunhisztokémiai módszerrel. A talált eredményeket a csontvelő daganatos infiltrátumának mintázatával, a klinikai stádiummal (módosított Rai-klasszifikáció), valamint a túléléssel összevetve értékeltük.

A vizsgált csoportból kiszűrtük a technikailag nem megfelelően feldolgozott, a kisméretű biopsziákat (kevesebb mint három velőűrt tartalmazó), valamint a hiányos klinikai adatokkal rendelkező mintákat (összesen 20 eset).

A p53/CD38/ZAP-70 coexpresszió immunhisztokémiai kimutatásához Anti-Human p53 Protein Clone DO-7 (DAKO), CD38-Ab-3 Clone 38CO3 (Lab Vision), valamint ZAP-70- Ab-1 Clone 2F32 (DAKO) antitestek-

Dr. Horváth Emőke
540136 Marosvásárhely – Târgu Mureș
Gh. Marinescu utca 50.
E-mail: horvath_emoke@yahoo.com

ket, vizualizáló rendszerként pedig Ultravision LP Large Volum Detection System HRP Polimert (Lab Vision) és 3, 3'-diaminobenzidin kromogént használtunk.

A reakciók kvantifikálását egymástól függetlenül két patológus végezte a sejtsztruktúrákhoz kötött lokalizáció (mag/citoplazma) függvényében. A szakirodalmi ajánlásokat figyelembe véve a ZAP-70 és a CD38 értékelése esetén pozitívnak csak a citoplazma szintjén megjelenő reakcióterméket tekintettük, amelyek a daganatsejtek legalább 20 %-át érintették. A p53 esetében csak a magfestődést vettük figyelembe, és kiszámítottuk a p53 indexet (100 sejthez viszonyítva a pozitív sejtmagok számát). Küszöbértéknek a 10 %-ot fogadtuk el [12].

Eredmények

A vizsgált csoport átlagéletkora 58,3 év, a férfi/nő arány 1,2 volt.

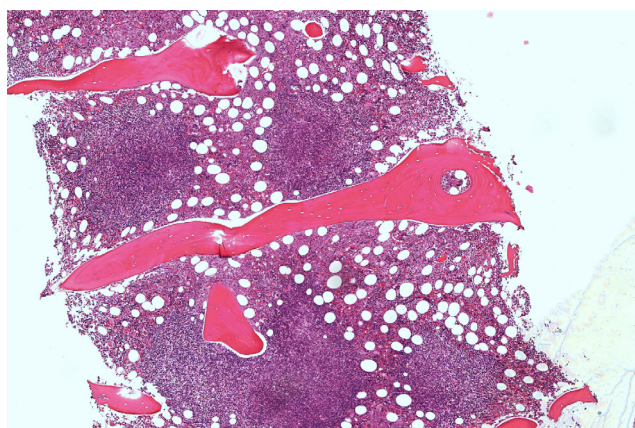
A betegség prognózisának megítélésére figyelembe vettük a klinikai stádiumot, melynek alapján 5 esetünk 0, 8 esetünk I., 6 esetünk a II., 3 esetünk a III., valamint 4 esetünk a IV. stádiumba soroltuk a módosított Rai-

klasszifikáció (1987) kritériumai szerint (1. táblázat). A csontvelői daganatos beszűrődés 34, 61%-ban (9-9 eset) mutatott vegyes (1. ábra), illetve diffúz (2. ábra) mintázatot. Az interszticiális érintettség 6 esetben (23,07%) dominált, míg tiszta noduláris mintázatot csupán 2 esetben (7,69%) találtunk (3. ábra).

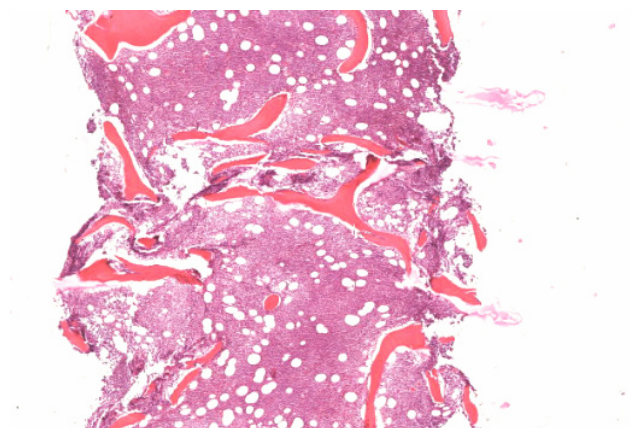
A prognosztikus faktorok expressziójának illetve az expresszió hiányának alapján öt coexpressziós mintázatot különböztettünk meg: p53-/CD38-/ZAP-70- (12 eset), p53+/CD38-/ZAP-70- (4 eset), p53-/CD38+/ZAP-70- (4 eset), p53+/CD38+/ZAP-70- (4 eset) és p53+/CD38+/ZAP-70+ (2 eset). Ezen coexpressziós mintázatok összefüggését a betegség klinikai stádiumával valamint a túléléssel az 1. táblázat szemlélteti, mely adatai szerint p53+/CD38+/ZAP-70- illetve a p53+/CD38+/ZAP-70+ esetek jól korelálnak a stádiummal és a túléléssel: 75%-os 2 éves túlélést találtunk a III. klinikai stádiummal és p53+/CD38+/ZAP-70- coexpresszióval jellemzett esetekben. p53+/CD38+/ZAP-70+ coexpressziót csak a IV. stádiumú betegeinknél mutattunk ki, náluk az átlagos túlélés 5,5 hónap volt a diagnózis felállításától számítva.

1. táblázat. Prognosztikai és prediktív tényezők CLL-ben és ezek összefüggései a p53/CD38/ZAP70 coexpressziós mintázattal

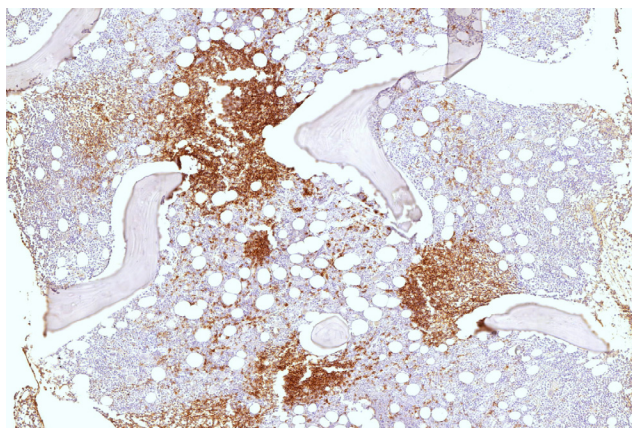
Stádium/ Átlagos túlélés	Laboratóriumi paraméterek Lymphocytosis	ESET- SZÁM 26	p53-/ CD38-/ ZAP70-	p53+/ CD38-/ ZAP70-	p53-/ CD38+/ ZAP70-	p53+/ CD38+/ ZAP70-	p53+/ CD38+/ ZAP70+	TÚLÉLÉS
0 />15 év		5	5	0	0	0	0	100 %
I/ 9 év	+Lymphadenopathia	8	5	1	2	0	0	100 %
II/ 5 év	+Hepatosplenomegalia	6	0	3	2	1	0	100 %
III/ 2 év	+Anaemia (Hb<11 g/l)	3	2	0	0	1	0	75 %
IV/ 2 év	+Thrombocytopenia (Ptl<100×10 ⁹ /l)	4	0	0	0	2	2	0 %
ESETSZÁM		26	12	4	4	4	2	



1. ábra. CLL: a csontvelő vegyes mintázatú érintettsége (HE, 4 obj.)



2. ábra. CLL: a csontvelő diffúz mintázatú érintettsége (HE, 2 obj.)



3. ábra. CLL: a csontvelő noduláris mintázatu érintettsége, amelyet jól kirajzol a CD20 immunreakció (10 obj.)

Megbeszélés

A B-sejtes lymphocytás leukémia (CLL)/kis lymphocytás lymphoma (SLL) Európában és az AEÁ-ban a leggyakrabban előforduló felnőttkori leukémia/lymphoma, amelynek két formája: stabil és progresszív ismeretes a V_H gén mutációs státusának függvényében [5, 12].

A betegség a csontvelőből indul ki, leukaemiás vérképpel jár és progressziója során a nyirokcsomókat is infiltrálja.

A 2008-as újraosztályozás értelmében a diagnózis jól körülhatárolt kritériumokra épül, amelyeknek ismerete elengedhetetlen a szöveti minta értékelésénél: 1. az utolsó három hónapra jellemző abszolút lymphocytosis a perifériás vérben ($>5,10^9/l$), melyet kis, érett lymphocyták képviselnek 5% alatti prolymphocytával, 2. a daganatsejtek B sejtmarkereket expresszálnak (CD19, CD20, CD23), amelyekhez csak a CD5 T sejt marker expressziója társul. A csontvelőbiopszia nem kötelező része a diagnosztikának, de a prognózis megítélésének szempontjából elengedhetetlen [11].

Pontos incidenciája hazánkban nem ismert, de a diagnosztika fejlődésével egyre több eset kerül felismerésre, és fiatalabb életkorban diagnosztizálják. Az irodalmi adatok szerint az átlagos életkor a diagnózis időpontjában változó, egyes szerzők 55 évet [12], mások 65-70 évet említenek, a férfi/nő arány 1,5 [3, 4, 8, 9]. Az általunk vizsgált betegcsoport átlagéletkora (58,3 év) jelentős eltérést nem mutat az irodalmi adatokhoz viszonyítva, ami azzal magyarázható, hogy a 2007-2008-as Nemzeti Egészségügyi Szűrőprogram során több eset került kezdeti stádiumban felismerésre (13 eset 0 és I. stádiumban). A nemek közötti megoszlás is egybehangzik az irodalmi adatokkal.

A csontvelő infiltrációjának mértéke változó (20-90%), és mintázata lehet noduláris (az esetek 7%-a), interstitiális

(34%), vegyes (24%) vagy diffúz (35%) [8, 9]. A betegség korai szakaszában az infiltrátum noduláris vagy interszticiális. A diffúz mintázat kedvezőtlen prognózist valószínűsít. Az általunk feldolgozott mintákban az interszticiális érintettség 6 esetben (23,07%) dominált, míg tiszta noduláris mintázatot csupán 2 esetben (7,69%) találtunk. A betegség előrehaladtával a vegyes mintázaton (34,61%) keresztül alakult át diffúz infiltrátumba (34,61%), amely a velőűrből a normális haematopoesist és a zsíresejteket kiszorította, és megjelent a III-IV. stádiumra jellemző anaemia és thrombocytopenia. A három $53+/CD38+/ZAP-70-$, valamint a két $p53+/CD38+/ZAP-70+$ coexpressziót mutató eseteink diffúz infiltrációs mintázattal rendelkeztek, és a betegséget a III., illetve a IV. stádiumban diagnosztizáltuk.

Nagyszámú eseten végzett klinikai vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a CLL-ek 50-70%-a a kedvező prognózisú mutált CLL, míg 30-50%-a a gyors lefolyású nem mutált CLL csoportjába tartozik [3]. A ZAP-70 fehérje felhalmozódása a daganatsejtek citoplazmájában a V_H gén nem mutált formában való expresszióját minősíti, ami a várható élettartam jelentős csökkenését vetíti elő az ugyanazon stádiumban levő, ZAP-70-t nem expresszáló esetekhez viszonyítva [1].

A ZAP-70 fiziológiásan T- és NK-sejtekben expresszálódik, és a T-sejt receptorkomplex zeta láncához kapcsolódva vesz részt a jelátviteli folyamatban. A ZAP-70 a mutációt nem tartalmazó IgH génekkel rendelkező CLL-sejtekben általában a T-sejtekhez hasonló mértékben expresszálódik, míg a mutációt tartalmazó IgH génekkel rendelkező CLL-sejtekben nem mutatható ki [10]. A ZAP-70 jelenleg az egyik legfontosabb prognosztikai faktornak tekinthető, mivel a betegség lefolyásával szoros összefüggést mutat [12].

A betegség progressziója során észlelhető fokozott proliferációs aktivitás hátterében egy másik sejtfelszíni fehérjének, a CD38-nak is fontos szerepe lehet. Expressziója a gyorsan progrediáló esetekre jellemző, sejtfelszíni elhelyezkedése révén egyszerűen és pontosan mérhető, azonban jelentőségét csökkenti az a tény, hogy kifejeződése a betegség lefolyása során változhat [2, 6].

A daganatsejtek p53 magi expressziója a genetikai instabilitás (17p kromoszómaregió deléciója) jele.

A CD38 és p53 V_H gén mutációs státusától független prediktív tényezők asszociációja a prognózist tovább rontja. Míg az irodalmi adatok a III-IV. stádiumban két éves átlagos túlélésről számolnak be, addig a $p53+/CD38+$, ZAP-70-, illetve a $p53+/CD38+$, ZAP-70+ immunfenotípussal jellemzett esetek átlagos túlélése jelentősen csökkent. A három prognosztikus tényező együttes expressziója additív értékű, mellyel a betegség

megjelenésének diagnosztizálásakor kiszűrhetők a nagy rizikójú csoportba tartozó páciensek függetlenül a klinikai stádiumtól [7].

Következtetések

A CLL klinikai viselkedését tekintve heterogén betegség, amelynek kimenetelét számos biológiai tényező befolyásolja. Ezen molekuláris jellemzők immunhisztokémiai módszerekkel a rutin gyakorlatban is kimutathatók.

A DNS-szekvenálását igénylő mutációs státus költséges és bonyolult meghatározása helyett a ZAP-70 expresszió csontvelő biopsziás mintákon való kvantifikálása jól használható a klinikai prognózis megítélésében.

A V_H gén mutációs státusától független prognosztikus tényezők, a CD38 és p53 megbízható kiegészítői a fent említett panelnek.

A korszerű kezelési terv felállításában a kromoszóma-eltérések kimutatása (citogenetikai és célzott FISH-vizsgálatokkal), és a daganatsejtek fenotípusának (áramláscitometriával) meghatározása elengedhetetlen, de figyelembe kell venni a csontvelő és a nyirokcsomók morfológiai (az infiltráció mértéke és mitázata) és biológiai jellemzőit, amelyek a várható túléléssel jól korrelálnak.

Irodalom

1. Crespo M., Bosch F., Villamor N. et al. – ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl Med*, 2003, 348:1764-1775.
2. Damle R.N., Wasil T., Fais F. et al. – IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 1999, 94:1848-1854.
3. Dighiero G., Hamblin T. J. – *Chronic lymphocytic leukemia*, *Lancet*, 2008, 371:1017-1029.
4. Dore G. M., Anderson W.F., Curtis R. E. et al. – *Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology*, *Br J Hematol* 2007, 139: 809-819.
5. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A. et al. – *Unmutated immunoglobulin VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*, *Blood*, 1999, 94:1848-1854.
6. Kanti R. R. – *Introduction: Chronic lymphocytic leukemia in perspective*, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2007, 20 (3): 363-365.
7. Oscier D. G., Gardiner A. C., Mould S. J. et al. – *Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent but complementary prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia*, *J Clin Oncol*, 2003, 21:3928-3932.
8. Pangalis G.A., Vassilakopoulos Th.P., Dimopoulou M.N. et al. – *B-chronic lymphocytic leukemia: Practical aspects*, *Hematol Oncol*, 2002, 20:103-146.
9. Pangalis G.A., Angelopoulou M.K., Vassilakopoulos Th.P. et al. – *B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmocytic lymphoma, including Waldenstrom's macroglobulinemia: A clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders*, *Semi Hematol*, 1999, 36:104-114.
10. Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L. et al. – *ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia*, *N Engl J Med*, 2004, 351:893-901.
11. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. – *Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma, in WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th edition, Lyon 2008, 323-326.
12. Szepesi Á. – *Molecular biology of CLL*, *Hungarian Oncology*, 2005, 49:327-330.