

Badanie znaczenia ekspresji wybranych markerów apoptozy oraz antygenów proliferacyjnych w guzach z grupy nerwiaka zarodkowego u dzieci

Katarzyna Taran¹, Elżbieta Sałacińska-Łoś², Józef Kobos²

Wprowadzenie. Guzy neuroblastyczne należą do grupy drobnookrąglomórkowych nowotworów wieku dziecięcego. Biologia tych rozrostów nie jest w pełni poznana ani pod względem różnorodności obserwowanych obrazów morfologicznych, ani zjawiska spontanicznej regresji. Brak spodziewanych efektów leczenia w niektórych przypadkach wskazuje na istnienie jeszcze nie odkrytych mechanizmów proliferacji komórek guzów z grupy neuroblastoma. Celem badań była ocena i ujawnienie potencjalnych zależności pomiędzy ekspresją wybranych markerów apoptozy i antygenów proliferacyjnych w nowotworach tej grupy o różnym stopniu dojrzałości histologicznej.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiły wycinki z 57 guzów z grupy nerwiaka zarodkowego utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie i zatopione w bloki parafinowe. Wykonane z nich skrawki parafinowe o grubości 3–4 mikrometrów posłużyły do sporządzenia rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną (HE) oraz do badań immunohistochemicznych z użyciem przeciwciał przeciwko: P53, Ki-67, PCNA, MDM2, P21, BCL2 i RB1. Ekspresja markerów była przedstawiana jako indeks komórek wykazujących ekspresję badanego białka na 1000 komórek guza. Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet SYSTAT for Windows. Przyjęto znamienność badanych różnic na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki. Zmniejszaniu się potencjału proliferacyjnego nowotworu towarzyszyło nasilenie morfologicznego „dojrzwania”, a wysokim indeksem proliferacyjnym — wzrost liczby cytologicznych wykładników złośliwości nowotworu. Najwyższa ekspresja P53 korelowała z obecnością mikroskopowych wykładników złośliwości guza i wysokimi indeksami proliferacyjnymi. Ponadto ujawniono istnienie licznych statystycznie istotnych zależności pomiędzy badanymi markerami apoptozy i antygenami proliferacyjnymi.

Wnioski. Obserwowana zależność pomiędzy ekspresją P53 i MDM2 może być związana z inaktywacją „dzikiej” formy białka P53, a to z kolei z brakiem indukcji genu *WAF1/CIP1* i co za tym idzie, nieobecnością jego produktu. Analiza ekspresji BCL2 wydaje się wskazywać na potencjalną rolę tego białka w „dojrzwaniu” nowotworów z grupy neuroblastoma.

Evaluation of expression of chosen proteins connected with apoptosis and proliferation antigens in neuroblastoma group of tumors in children

Introduction. Neuroblastoma is a common example of small round cell tumors of childhood. However, the biology of these entities is not fully understood, as well as the variety of morphological pictures, and the phenomenon of spontaneous regression. Unexpected poor results of treatments indicates, that there still exists some as yet undiscovered mechanisms of proliferation of neuroblastoma cells.

The aim of our study was to estimate potential correlation between proliferation and apoptotic markers in neuroblastoma types of the different level of histological maturation.

Material and methods. We selected for our study 57 formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue sections of neuroblastic tumors. From all these tissues samples paraffin blocks about the thickness 3–4 of micrometers were

¹Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Zakład Patomorfologii Wieku Rozwojowego Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 4 im. M. Konopnickiej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

prepared and stained with hematoxylin and eosin (HE) and they were used for immunohistochemical research with the use of P53, Ki-67, PCNA and MDM-2, P21, BCL-2 and RB1 markers. The expression of investigated markers were estimated as the index of the number of cells with a 'positive' reaction on 1000 tumor cells. The 'SYSTAT for Windows' package was used for analysis and the difference was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. Our studies showed that the decrease of proliferating potential of neuroblastoma cells was connected with histological "maturation" and on the other hand that high proliferating indices correlated with morphological features of malignancy of the neoplasm. We also proved that intense expression of P53 protein was connected with the presence of morphological features of tumor malignancy and high indices of proliferation markers.

Conclusion. We observed in our studies that correlation between P53 and MDM2 expression was probably connected with inactivation of a 'wild' form of P53 protein followed by lack of *WAF1/CIP1* induction and the absence of that gene product. The analysis of BCL2 expression seems to point towards the part of that protein in the processes of maturation in neuroblastoma group of tumors.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2012; 62, 1: 101–108

Słowa kluczowe: neuroblastoma, apoptoza, markery proliferacji

Key words: neuroblastoma, apoptosis, proliferation markers

Wprowadzenie

Guzy neuroblastyczne należą do grupy drobnookrągłokomórkowych nowotworów wieku dziecięcego. Jest to grupa rozrostów neuroblastów o typowej lokalizacji w rdzeniu nadnerczy i strukturach współczulnego układu nerwowego. Charakterystycznym laboratoryjnym wyrazem obecności nerwiaka zarodkowego jest zwiększenie poziomu katecholamin i/lub ich metabolitów w moczu. To szeroko używane kryterium klinicznej diagnozy musi być zweryfikowane mikroskopowym badaniem guza. Pomimo istnienia sprawdzonej i powszechnie akceptowanej klasyfikacji histopatologicznej nowotworów pochodzenia neuroblastycznego, przebieg kliniczny choroby w przypadkach guzów o tej samej morfologii może być inny. Także zjawisko spontanicznej regresji nerwiaka zarodkowego wymaga pełnego wyjaśnienia. Niektóre pytania, zwłaszcza dotyczące zależności pomiędzy procesami proliferacji i apoptozy, podobnie jak te dotyczące fenomenu „dojrzenia” komórek guza, nadal wymagają odpowiedzi i mogą ukazać tę intrygującą grupę guzów w nowym świetle [1–7].

Apoptoza (programowana śmierć komórki) jest następstwem charakterystycznych zdarzeń na poziomie morfologicznym, biochemicznym i cząsteczkowym, które w rezultacie prowadzą do śmierci komórki. Proces ten jest dynamiczny, charakteryzuje się wzmożoną syntezą kwasu rybonukleinowego i białek, jak również pobudzeniem enzymów komórkowych. Aktywacja nukleaz (NUC 18, DNAzy I, DNAzy II) katalizujących rozerwanie wiązań wewnątrznukleosomalnych powoduje fragmentację DNA, co stanowi prawdopodobnie pierwszy, nieodwracalny etap apoptozy. Skomplikowany proces programowanej śmierci komórki podlega wielopoziomowej kontroli, w której biorą udział

produkty wielu genów, działające zarówno pro-, jak i anty-apoptotycznie np.: *P53*, *MDM2*, *WAF1* lub *BCL2*.

Gen *P53* należy do grupy genów supresorowych i odgrywa wiodącą rolę w kontroli integralności genomu komórki. Postacią czynną produktu tego genu, czyli białka P53 jest forma tetrameryczna — „dzikie” białko (niezmutowane). Białko P53 pełni rolę „strażnika molekularnego”, bierze bowiem udział w regulacji cyklu komórkowego, kontroluje naprawę DNA lub inicjuje apoptozę. Mutacje genu *P53* są najczęstszym defektem genetycznym stwierdzanym we wszystkich rodzajach nowotworów człowieka. Powstające cząsteczki zmutowanych form białka różnią się między sobą właściwościami biologicznymi. Różnice te zależą od rodzaju i miejsca mutacji. Do zmiany aktywności „dzikiego” białka P53 może również dochodzić na skutek jego wiązania się z produktami wirusów onkogennych, zmutowanym białkiem P53, a także w wyniku wzmocnionej ekspresji genu *MDM2*, którego produkt jest inhibitorem białka P53. Konsekwencją braku prawidłowo funkcjonującego białka P53 jest zniesienie jego wpływu na proces apoptozy, utrata kontroli nad podziałami komórki i naprawą uszkodzeń DNA, prowadząca do gromadzenia aberracji chromosomowych i rozwoju transformacji nowotworowej.

Gen *MDM2* jest onkogenem kodującym białko mające zdolność specyficznego wiązania się z białkiem P53. Tworzenie kompleksów P53/MDM2 obniża poziom wolnego P53 w jądrze komórkowym, a tym samym umożliwia komórce wejście w kolejną fazę cyklu komórkowego (przejście z fazy G1 do fazy S). Z drugiej strony, ekspresja *MDM2* jest indukowana przez nie zmutowane białko P53, co tworzy samoregulujący mechanizm kontroli zwrotnej proliferacji komórkowej. Amplifikację *MDM2* oraz wysokie stężenie

białka MDM2 zaobserwowano w wielu nowotworach u ludzi. Stwierdzono, że spośród wielu białek posiadających zdolność wiązania się z białkiem P53 (białka wirusów onkogennych), białko MDM2 jest czynnikiem o najwyższej aktywności transformacyjnej.

Gen *WAF1/CIP1* koduje białko P21, które jest inhibitorem kinaz cyklicznych (CDK). Hamuje ono aktywność większości kompleksów cykлина/CDK, co ma decydujące znaczenie dla regulacji cyklu komórkowego. Przypuszcza się, że P21 blokuje proliferację tylko w przypadku jego ilościowej dominacji nad kompleksem kinaza/cykлина. Białko P21 może wiązać się z PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) będącym podjednostką polimerazy DNA. Powstanie kompleksu P21/PCNA hamuje replikacyjną syntezę DNA, lecz nie blokuje syntezy replikacyjnej. Tak więc białko P21 ma możliwość zablokowania cyklu komórkowego na drodze dwóch niezależnych mechanizmów. Ekspresję genu *WAF1/CIP1* indukuje „dzika” forma białka P53, która posiada także zdolność wiązania się z jego produktem. Przyjmuje się, że białko P21 jest jednym z efektorów apoptozy przebiegającej z udziałem P53.

Gen *BCL2* należy do onkogenów, a jego ekspresja ogranicza się do komórek, które są już zróżnicowane. Fizjologiczna rola białka BCL2 polega na hamowaniu apoptozy. Początkowo sądzono, że lokalizacja mitochondrialna tego białka może się wiązać z jego ingerencją w procesy fosforylacji oksydacyjnej, jednak dalsze badania tego związku nie potwierdziły. Sugeruje się natomiast, iż efekt antyapoptyczny BCL2 osiąga poprzez hamowanie produkcji wolnych rodników i/lub wpływ na redystrybucję jonów wapniowych w komórce lub zmianę transportu białek przez błony jądrowe i mitochondrialne.

Gen *RB1* jest kolejnym przykładem genu supresorowego. Zasadniczą funkcją białka RB1 jest regulacja cyklu komórkowego. W zależności od stopnia ufosforylowania, białko to wpływa stymulująco lub hamująco na cykl komórkowy w fazie G1. Utrata czynności fizjologicznej przez białko RB1 może nastąpić na skutek mutacji genu w obydwu allelach, albo też w wyniku wiązania się białka RB1 z białkami wirusowymi lub produktami niektórych protoonkogenów np. c-myc, c-abl. O ile funkcja supresorowa genu *RB1* i jego białkowego produktu jest udowodniona, tak jego bezpośredni związek z apoptozą nie jest w pełni potwierdzony. Można przypuszczać, iż wpływ białka RB1 na apoptozę może mieć miejsce w przypadku konfliktu sygnałów indukujących jednocześnie podziały komórkowe (wzrost fosforylacji RB1) i zatrzymanie cyklu komórkowego (akumulacja białka P53).

Proces programowanej śmierci komórkowej jest ściśle związany z proliferacją, różnicowaniem i transformacją nowotworową komórek. Dlatego też celowe jest prowadzenie badań nad mechanizmami regulacji apoptozy równolegle z oceną aktywności proliferacyjnej komórek. Obecnie, obok

innych metod, najczęściej do oceny proliferacji stosowane są: badanie ekspresji antygenu Ki-67 (białko to uważane jest za bardzo czuły i swoisty znacznik proliferacji komórek nowotworowych) i jądrowego antygenu komórek proliferujących — PCNA, czyli kofaktora polimerazy δ DNA, którego stężenie koreluje z aktywnością proliferacyjną komórki [8–13].

Materiał i metody

Badaniom poddano 57 guzów z grupy nerwiaka zarodkowego pochodzących ze zbiorów Zakładu Patomorfologii Wieków Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Zakładu Patomorfologii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Materiał do badań stanowiły wycinki guzów utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie i zatopione w bloki parafinowe. Wykonane z nich skrawki parafinowe o grubości 3–4 mikrometrów posłużyły do sporządzenia rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną (HE) oraz do badań immunohistochemicznych. Wszystkie guzy zostały podzielone na podstawie kryteriów zawartych w klasyfikacji Joshiego na cztery podgrupy różniące się stopniem „dojrzałości” morfologicznej.

1. Klasyczna postać nerwiaka zarodkowego (KNB). W utkaniu guza dominują niezróżnicowane neuroblasty bez neuropilśni lub z niewielką jej ilością. Mniej niż 5% komórek wykazuje tendencję do różnicowania się w kierunku komórek zwojowych. Obecne są rozety Homera Wrighta. Stwierdza się również liczne, często atypowe figury podziału.
2. Nerwiak zarodkowy z dojrzewaniem do nerwiaka zarodkowego zwojowokomórkowego (NB~GNB). Większość komórek populacji guza stanowią neuroblasty. Stwierdza się powyżej 5% komórek nowotworowych z tendencją do różnicowania się w kierunku komórek zwojowych. Mogą być obecne „dojrzałe” komórki zwojowe. Podścielisko jest bogatsze niż w KNB i zawiera więcej neuropilśni. Figury podziału są dość liczne.
3. Nerwiak zarodkowy zwojowokomórkowy (GNB). W obrazie mikroskopowym dominują neuroblasty różnicujące się w kierunku komórek zwojowych, jedno- lub wielojądrowych, wykazujących często cechy atypii. Stanowią one ponad 50% utkania guza. Stwierdza się obfitą neuropilśnią. Figury podziału są obecne, choć mniej liczne niż w opisanych powyżej podgrupach.
4. Nerwiak zarodkowy zwojowokomórkowy z dojrzewaniem do nerwiaka zwojowokomórkowego (GNB~GN). Główną populacją komórek guza są komórki zwojowe znajdujące się w różnej fazie dojrzewania, często z cechami atypii. Dojrzałe komórki zwojowe, jedno lub wielojądrowe stanowią powyżej 20% komórek nowotworowych. Ponadto obserwuje się bardzo obfite podścielisko, a także obecność komórek Schwanna. Nie stwierdza się neuroblastów, obecne są nieliczne figury podziału.

Tabela I. Ekspresja antygenów proliferacji komórkowej w poszczególnych podtypach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

| Podgrupy histologiczne | PCNA | | Ki-67 | |
|------------------------|---------|------------|---------|------------|
| | Średnia | Rozpiętość | Średnia | Rozpiętość |
| KNB | 28,71 | 6,5–66,1 | 41,54 | 6,0–82,0 |
| NB-GNB | 26,22 | 4,2–71,0 | 32,32 | 5,6–85,0 |
| GNB | 16,75 | 3,8–45,0 | 18,50 | 4,0–48,0 |
| GNB-GN | 12,80 | 7,2–20,0 | 34,67 | 8,5–53,0 |

Badania immunohistochemiczne przeprowadzono według metody immunoperoksydazowej, opisaną przez Hsu i współpracowników z użyciem monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko badanym białkom (P53 klon DO-7, Ki-67 klon MM1, PCNA klon PC10, MDM-2 klon 1B10, P21 klon 4D10, BCL-2 klon 100/D5, RB1 klon 84-B3-1) i awidynowo-biotynowo-peroksydazowego systemu detekcji ABC (*Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex*), firmy Novocastra. Do oceny ekspresji badanych białek użyto systemu komputerowej analizy obrazu (Multi Scan Base v. 8.08 — Computer Scanning System, Ltd.). Ekspresja markerów była przedstawiana jako indeks komórek wykazujących ekspresją badanego białka na 1000 komórek guza. Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet SYSTAT for Windows (Version 5, SYSTAT, Inc, Evaston, Illinois, USA). Przyjęto znamienność badanych różnic na poziomie $p < 0,05$.

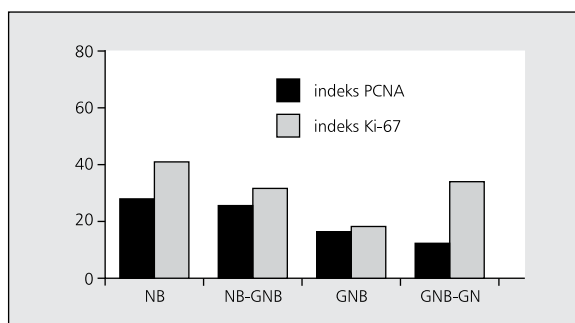
Wyniki

Na podstawie oceny obrazu mikroskopowego zakwalifikowano 32 z badanych guzów do podgrupy KNB (klasyczna postać nerwiaka zarodkowego), 12 guzów do podgrupy NB~GNB (nerwiak zarodkowy z dojrzewaniem do nerwiaka zarodkowego zwojowokomórkowego), 8 guzów do podgrupy GNB (nerwiak zarodkowy zwojowokomórkowy), 5 guzów do podgrupy GNB~GN (nerwiak zarodkowy zwojowokomórkowy z dojrzewaniem do nerwiaka zwojowokomórkowego).

Wyniki oceny ekspresji antygenów proliferacji komórkowej

Ekspresja Ki-67

Ekspresję antygeny Ki-67 stwierdzono we wszystkich przypadkach. Reakcja barwna miała charakter grubych ziaren zlokalizowanych w jądrach komórek. W podgrupach od KNB do GNB spostrzeżono zmniejszanie się wartości średnich indeksów Ki-67 od 41,64% dla KNB, poprzez 32,32% dla NB~GNB do 18,5% dla GNB. Wartość średnia indeksu Ki-67 w podgrupie GNB~GN wynosiła 34,66%. Pomiedzy poszczególnymi podgrupami histologicznymi stwierdzono istotne statystycznie różnice średnich wartości indeksów Ki-67.

**Rycina 1.** Średnie wartości indeksów PCNA i Ki-67 w poszczególnych podtypach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

Ekspresja PCNA

Wykazano ekspresję PCNA we wszystkich badanych przypadkach. Jądra komórek barwiły się homogenicznie lub w formie drobnych i średnich ziarnistości. W podgrupach od KNB do GNB~GN, wraz z „dojrzewaniem morfologicznym”, obserwowano zmniejszanie się wartości średnich indeksów PCNA, odpowiednio: KNB 28,71%, NB~GNB 26,22%, GNB 16,75%, GNB~GN 12,8%. Stwierdzono istotne statystycznie różnice średnich wartości indeksów tego antygeny pomiędzy poszczególnymi podgrupami histologicznymi.

Ekspresję antygenów proliferacji komórkowej w poszczególnych podtypach histologicznych przedstawia tabela I oraz rycina 1.

Wyniki oceny ekspresji markerów apoptozy

Ekspresja białka P53 w postaci drobnoziarnistego jądrowego odczynu w poszczególnych podgrupach histologicznych przedstawiała się następująco: KNB 20,77%, NB~GNB 10,26%, GNB~GN 16,56%, GNB 7,29%. Analiza statystyczna pozwoliła stwierdzić istotne statystycznie różnice wartości średnich indeksów P53 pomiędzy poszczególnymi podgrupami histologicznymi.

Odczyn z P21 miał charakter grubych ziaren umiejscowionych w jądrach komórek. Przyjęto wartość 5% jako ekspresję graniczną tzn. guzy, w których powyżej 5% komórek wykazywało obecność tego białka, uznawano za P21 pozytywne. Warunek ten spełniły 4 guzy należące do podgrupy KNB oraz jeden należący do GNB. Zbyt mała liczba

Tabela II. Ekspresja białka P53 w poszczególnych podtypach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

| Podgrupy histologiczne | Odsetek komórek guza z dodatnią reakcją na obecność białka P53 | |
|------------------------|--|------------|
| | Średnia | Rozpiętość |
| KNB | 20,77 | 0–56,5 |
| NB~GNB | 10,26 | 0–47 |
| GNB | 7,29 | 2–19,5 |
| GNB~GN | 16,56 | 0–38 |

Tabela III. Ekspresja białka MDM2 w poszczególnych podtypach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

| Podgrupy histologiczne | Odsetek komórek guza z dodatnią reakcją na obecność białka MDM2 | |
|------------------------|---|------------|
| | Średnia | Rozpiętość |
| KNB | 56,64 | 10,6–92 |
| NB~GNB | 44,22 | 0–86 |
| GNB | 44,14 | 5–84 |
| GNB~GN | 41,16 | 1–70 |

przypadków w poszczególnych podgrupach nie pozwoliła na przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej.

Ekspresję białka MDM2 w postaci jądrowego odczynu o charakterze dyfuzyjnym z kumulacją pod błoną jądrową i przejaśnieniem w części centralnej jądra stwierdzono we wszystkich podtypach histologicznych. Najwyższy indeks zaobserwowano w podgrupie KNB — 59,21%, w pozostałych podgrupach wartości średnie indeksów MDM2 były do siebie zbliżone i wynosiły odpowiednio NB~GNB 44,22%, GNB 44,14%, GNB~GN 40,95%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich wartości indeksów MDM2 pomiędzy poszczególnymi podgrupami histologicznymi.

Ekspresję białka BCL2 ujawniono w komórkach wszystkich badanych guzów. Cytoplazma komórek barwiła się intensywnie w okolicy jądra w postaci charakterystycznych obwódok, z nagromadzeniem barwnika w okolicy strefy Golgiego. Najwyższą ekspresję tego białka prezentowały komórki guzów z podgrupy GNB~GN 75,95%. W podgrupach od KNB do GNB wartości średnich indeksów BCL2 kształtowały się podobnie: KNB 62,74%, NB~GNB 60,98%, GNB 50,1%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich wartości indeksów BCL2 pomiędzy poszczególnymi podgrupami histologicznymi.

Ekspresja białkowego produktu genu *RB1* o charakterze drobnoziarnistego odczynu jądrowego w poszczególnych podgrupach histologicznych przedstawiała się następująco: KNB 17,32%, NB~GNB 11,58%, GNB 2,86%, GNB~GN 10,32%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich wartości indeksów RB1 pomiędzy poszczególnymi podgrupami histologicznymi.

Tabela IV. Ekspresja białka BCL2 w poszczególnych podtypach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

| Podgrupy histologiczne | Odsetek komórek guza z dodatnią reakcją na obecność białka BCL2 | |
|------------------------|---|------------|
| | Średnia | Rozpiętość |
| KNB | 63,69 | 15–96 |
| NB~GNB | 60,98 | 14–95 |
| GNB | 50,1 | 12–81 |
| GNB~GN | 63,76 | 15–91 |

Tabela V. Ekspresja białka RB1 w poszczególnych podtypach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

| Podgrupy histologiczne | Odsetek komórek guza z dodatnią reakcją na obecność białka RB1 | |
|------------------------|--|------------|
| | Średnia | Rozpiętość |
| KNB | 17,62 | 0–63 |
| NB~GNB | 11,58 | 0–51 |
| GNB | 2,86 | 0–12 |
| GNB~GN | 8,26 | 0–26 |

Tabela VI. Ekspresja markerów apoptozy w całej grupie guzów z grupy nerwiaka zarodkowego — podsumowanie

| Białko | Odsetek komórek guza z dodatnią reakcją na obecność badanego białka | |
|--------|---|------------|
| | Średnia | Rozpiętość |
| P 53 | 19,60 | 0–82 |
| P 21 | 0,85 | 0–15 |
| MDM 2 | 52,90 | 0–92 |
| BCL-2 | 59,15 | 10–96 |
| RB1 | 14,20 | 0–63 |

Szczegółowe wyniki badań ekspresji wszystkich badanych markerów apoptozy przedstawiają tabele II–VI, a ich statystyczną analizę tabela VII.

Dyskusja

Zaburzenie równowagi pomiędzy namnażaniem i programowaną śmiercią komórkową leży u podstaw choroby nowotworowej, a poziom aktywności proliferacyjnej jest jednym z najstarszych znanych czynników prognostycznych w nowotworach złośliwych [14–16]. Immunohistochemiczna ocena aktywności proliferacyjnej komórek jest powszechnie akceptowaną metodą, dużo bardziej dokładną niż mikroskopowa ocena liczby mitoz w utkanie nowotworu. Udowodniono, że wysokie indeksy proliferacyjne występują w guzach neuroblastycznych z niższym stopniem zróżnicowania oraz że korelują z krótszym czasem przeżycia chorych. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań są zgodne z rezultatami spodziewanymi na podstawie litera-

Tabela VII. Zależności statystyczne pomiędzy ekspresją badanych białek w całej grupie guzów z grupy nerwiaka zarodkowego

| | PCNA | Ki67 | P53 | MDM2 | BCL2 | RB1 |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| PCNA | | R = 0,812 p < 0,001 | R = 0,615 p < 0,001 | R = 0,181 p = 0,167 | R = 0,049 p = 0,712 | R = 0,453 p < 0,001 |
| Ki67 | R = 0,812 p < 0,001 | | R = 0,544 p < 0,001 | R = 0,165 p = 0,200 | R = 0,063 p = 0,629 | R = 0,541 p < 0,001 |
| P53 | R = 0,615 p < 0,001 | R = 0,544 p < 0,001 | | R = 0,331 p = 0,008 | R = 0,018 p = 0,886 | R = 0,559 p < 0,001 |
| MDM2 | R = 0,181 p = 0,167 | R = 0,165 p = 0,200 | R = 0,331 p = 0,008 | | R = 0,002 p = 0,990 | R = 0,356 p = 0,004 |
| BCL2 | R = 0,049 p = 0,712 | R = 0,063 p = 0,629 | R = 0,018 p = 0,886 | R = 0,002 p = 0,990 | | R = 0,112 p = 0,382 |
| RB1 | R = 0,453 p < 0,001 | R = 0,541 p < 0,001 | R = 0,559 p < 0,001 | R = 0,356 p = 0,004 | R = 0,112 p = 0,382 | |

p — poziom istotności; R — współczynnik korelacji

tury przedmiotu [17–19], a ponadto obrazują, w jaki sposób indeks proliferacji koreluje z obecnością morfologicznych wykładników dojrzewania w poszczególnych typach histologicznych guzów z grupy nerwiaka zarodkowego. Istnienie znaczącej statystycznie korelacji pomiędzy indeksami ekspresji PCNA i Ki-67 w naszych badaniach wskazuje na ich równoważną wartość prognostyczną.

Większość poznanych onkogenów należy w rzeczywistości do grupy protoonkogenów, czyli genów, które w prawidłowej komórce biorą udział w regulacji procesów wzrostu i różnicowania. Gen *P53* i jego produkt odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, a przede wszystkim w kontroli integralności genomu. W nowotworach wieku dziecięcego mutacje genu *P53* stwierdzane są z różną częstością. W rdzeniaku, wyściółczaku zarodkowym, nerwiaku zarodkowym i guzach z grupy pPNET oraz ostrej białaczce limfoblastycznej mutacje tego genu obserwowano sporadycznie, w przeciwieństwie do nowotworów, takich jak: kostniakomięsak, mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy, glejak złośliwy i chłoniak Burkitta, gdzie częstość mutacji *P53* jest wysoka. Rola genu *P53* w patogenezie i przebiegu neuroblastoma nie jest jasna. Część autorów uważa, że w przeciwieństwie do wielu innych nowotworów złośliwych, w inicjacji procesu nowotworowego w nerwiaku zarodkowym nie bierze udziału mutacja genu *P53*. Uznaje się również za wielce prawdopodobny pogląd, że to utrata funkcji białka *P53*, a nie mutacja jego genu może odgrywać rolę w transformacji nowotworowej niezróżnicowanych nerwiaków zarodkowych. Zaobserwowany w naszych badaniach wysoki odsetek komórek z ekspresją *P53* w guzach z podgrupy klasycznego nerwiaka zarodkowego może być związany z wysokim potencjałem proliferacyjnym tych nowotworów, natomiast ekspresja *P53* w guzach „dojrzewających”, w komórkach o morfologii komórek zwojowych, może być efektem jego fizjologicznej roli w regulacji różnicowania i apoptozy.

W literaturze nie ma także zgodności, co do dystrybucji białka *P53* w komórce. Obserwowana w części przypadków guzów z grupy neuroblastoma obecność białka *P53* w cytoplazmie komórek pozwala domniemywać, że wykryte białko jest nie zmutowaną, ale i nieaktywną formą, choć jednocześnie podkreśla się w cytowanych pracach, że hipoteza ta wymaga dalszych badań. Należy nadmienić, że i w przeprowadzonej przez nas ocenie ujawniono obecność białka *P53* w cytoplazmie komórek niektórych przypadków neuroblastoma, nie wykrywając jednak cytoplazmatycznej ekspresji tego białka w żadnym przypadku ganglioneuroblastoma, ani ganglioneuroma. Niektórzy autorzy uważają również, iż zawsze obecność białka *P53* powinna być traktowana jako niekorzystny czynnik rokowniczy, gdyż wiąże się ona z bardziej agresywnym przebiegiem choroby, a także tendencją do przerzutów i nawrotów. W naszych badaniach ujawniono także dodatnią zależność pomiędzy indeksami antygenów proliferacji komórkowej i indeksem *P53* [7–9, 20–23].

Onkogen *MDM2* stanowi istotny czynnik regulujący proliferację komórek poprzez inaktywację białka *P53* na drodze kontroli zwrotnej. W guzach z grupy neuroblastoma niektórzy autorzy stwierdzili amplifikację tego genu i obecność jego białkowego produktu w jądrach komórek nowotworowych [8, 11, 24, 25]. W naszych badaniach zaobserwowano obecność białka *MDM2* w niemal wszystkich badanych guzach. Odsetek komórek *MDM2* pozytywnych we wszystkich podgrupach histologicznych był wysoki (powyżej 40%), choć najwyższy w klasycznym nerwiaku zarodkowym. Ponadto wykazano znamiennej statystycznie dodatnią zależność między ekspresją *P53* i *MDM2*. Związane jest to prawdopodobnie z inaktywacją wzrastającego poziomu białka *P53* w obrębie jądra komórkowego, co pozwala na zapoczątkowanie cyklu komórkowego, a więc zwiększa potencjał proliferacyjny.

Białko P21, produkt genu *WAF1/CIP1* pełni rolę regulatora cyklu komórkowego na drodze dwóch niezależnych mechanizmów, jednak w literaturze istnieją jedynie nieliczne doniesienia na temat ekspresji P21 w guzach neuroblastycznych. Podaje się, że P21 zwykle wykazuje ekspresję w komórkach guzów z grupy neuroblastoma [12, 26]. W naszych badaniach odsetek komórek P21 pozytywnych we wszystkich typach guzów z grupy nerwiaka zarodkowego był niski, poniżej 10%. Wydaje się, iż inaktywacja „dzikiego” białka P53 jest przyczyną braku indukcji genu *WAF1/CIP1*, a co za tym idzie, nieobecności jego produktu.

Gen *BCL2* jest protoonkogenem, którego mechanizm działania jest odmienny od dotychczas wymienionych genów. Wywiera on efekt antyapoptotyczny, lecz sposób działania nie jest dokładnie poznany. Doniesienia z piśmiennictwa o ekspresji *BCL2* w komórkach guzów z grupy neuroblastoma są sprzeczne. Niektórzy autorzy stwierdzali obecność tego białka we wszystkich badanych przypadkach neuroblastoma, ganglioneuroblastoma i ganglioneuroma, inni opisywali ekspresję *BCL2* jedynie w nerwiaku zarodkowy i to tylko w części przypadków (40–80%). Jedni autorzy uważają, że obecność *BCL2* towarzyszy gorszemu rokowaniu, inni nie stwierdzają takiej zależności [11, 12, 27]. W przeprowadzonych przez nas badaniach ekspresję białka *BCL2* zaobserwowano we wszystkich podtypach histologicznych, przy czym odsetek komórek *BCL2* pozytywnych w nowotworach wykazujących cechy zróżnicowania wynosił powyżej 60%, co mogłoby wskazywać na potencjalny udział białka *BCL2* w „dojrzwaniu”, a tym samym być może i w regresji tych nowotworów. Nie ujawniono jednak istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją *BCL2* a innymi badanymi białkami.

Gen *RB1* jest genem supresorowym, którego produkt w prawidłowej komórce reguluje procesy proliferacji komórkowej i wykazuje aktywność antymitotyczną. W dostępnym nam piśmiennictwie jedynie nieliczne prace dotyczyły obecności białka *RB1* w guzach z grupy neuroblastoma. W badaniach tych podkreślano, iż liczba komórek wykazujących ekspresję tego białka wiązała się ze stopniem zróżnicowania komórek nowotworu [28]. W naszych badaniach indeksy komórek *RB1* w poszczególnych podgrupach histologicznych nie różniły się istotnie. Znamienne statystycznie zależność pomiędzy indeksami białek P53, MDM2 i indeksem *RB1* obrazuje złożone mechanizmy regulacji procesu apoptozy.

Reasumując, zmniejszaniu się potencjału proliferacyjnego nowotworów z grupy nerwiaka zarodkowego towarzyszyło zwiększanie obecności cech „dojrzwania”, a wysokim indeksem proliferacyjnym — morfologicznych wykładników złośliwości nowotworu. Najwyższa ekspresja P53 korelowała z obecnością mikroskopowych wykładników złośliwości guza i wysokimi indeksami proliferacyjnymi. Obserwowana korelacja pomiędzy ekspresją P53 i MDM2 może być związa-

na z unieczynnieniem dzikiej formy białka P53, a to z kolei związane z blokadą genu *WAF1/CIP1* i w rezultacie brakiem białka P21. Analiza ekspresji *BCL2* wydaje się wskazywać na potencjalną rolę tego białka w „dojrzwaniu”, a być może i regresji nowotworów z grupy neuroblastoma. Uzyskane rezultaty wskazują na potrzebę dalszych badań guzów neuroblastycznych. Być może metody biologii molekularnej pozwolą na pełne ujawnienie i wyjaśnienie procesów proliferacji i morfologicznego „dojrzwania” guzów z grupy nerwiaka zarodkowego [29, 30].

Dr n. med. Katarzyna Taran

Katedra Patomorfologii

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Pomorska 251, 92–213 Łódź

e-mail: dr.taran.patho@gmail.com

Otrzymano: 19 lipca 2011 r.

Przyjęto do druku: 28 października 2011 r.

Piśmiennictwo

1. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP i wsp. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2243–2253.
2. Carpentier DF, Nichols K, Chou PM i wsp. The expression of Wt1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors. *Mod Pathol* 2002; 15: 1080–1086.
3. Citak C, Karadeniz C, Dalgic B i wsp. Intestinal lymphangiectasia as a first manifestation of neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46: 105–107.
4. Conte M, Parodi S, De Bernardi B i wsp. Neuroblastoma in adolescents: the Italian experience. *Cancer* 2006; 106: 1409–1417.
5. Iżycka-Świeszewska E, Drożyńska E, Rzepko R i wsp. Clinicopathological considerations on angiogenic potential in neuroblastoma Schwannian stroma-poor tumours. *Folia Neuropathologica* 2007; 45: 1–8.
6. Llobat-Bosch A. Small round cell tumors. A challenge for surgical pathology: Past and future. *Rev Esp Patol* 1999; 32: 259–260.
7. Taran K, Kobos J, Sitkiewicz A, Sporny S. Estimation of prognostic value of CD44 expression in neuroblastic tumours in children. *Folia Neuropathologica* 2007; 45: 126–132.
8. Corvi R, Savelyeva L, Schwab M. Patterns of oncogene activation in human neuroblastoma cells. *J Neurooncol* 1997; 31: 25–31.
9. Fulda S, Friesen C, Los M i wsp. Betulinic Acid Triggers CD95 (APO-1/FAS)- and p53-independent Apoptosis via Activation of Caspases in Neuroectodermal Tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 4956–4964.
10. Fulda S, Sieverts H, Friesen C i wsp. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997; 57: 3823–3829.
11. Hoehner JC, Gestblom C, Olsen L i wsp. Spatial association of apoptosis — related gene expression and cellular death in clinical neuroblastoma. *Br J Cancer* 1997; 75: 1185–1194.
12. Labat-Moleur F, Guillermet Ch, Lorimier P i wsp. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem & Cytochem* 1998; 46: 327–334.
13. Tonini GP, Mazzocco K, di-Vinci A, Geido E i wsp. Evidence of apoptosis in neuroblastoma at onset and relapse. An analysis of a large series of tumors. *J Neurooncol* 1997; 31: 209–215.
14. Sebire NJ, Gibson S, Rampling D i wsp. Immunohistochemical findings in embryonal small round cell tumors with molecular diagnostic confirmation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 1–5.
15. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP i wsp. Terminology and Morphologic Criteria of Neuroblastic Tumors. *Cancer* 1999; 86: 349–363.
16. Haber M, Smith J, Bordow SB i wsp. Association of high level MRP-1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4127–4134.
17. Joshi VV, Tsongalis GJ. Correlation between morphologic and non-morphologic prognostic markers of neuroblastoma. *Ann NY Acad Sci* 1997; 824: 71–83.

18. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K i wsp. Telomerase Activity in Neuroblastoma: is it a Prognostic Indicator of Clinical Behaviour? *Eur J Cancer* 1997; 33: 1932–1936.
19. Rudolph P, Lappe T, Hero B i wsp. Prognostic Significance of the Proliferative Activity in Neuroblastoma. *Am J Pathol* 1997; 150: 133–145.
20. Isaacs JS, Hardman R, Carman TA i wsp. Differential subcellular p53 localization and function in N- and S-type neuroblastoma cell lines. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 545–555.
21. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997; 389: 191–194.
22. Kaghand M, Bonnet H, Yang A i wsp. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809–819.
23. Kusafuka T, Fukuzawa M, Oue T i wsp. Mutation analysis of p53 gene in childhood malignant solid tumors. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1175–1180.
24. Rubie H, Hartmann O, Michon J i wsp. N-Myc Gene Amplification Is a Major Prognostic Factor in Localized Neuroblastoma: Results of the French NBL 90 Study. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1171–1182.
25. Schwab M, Corvi R, Savelyeva L. New genetic loci in neuroblastoma. *Klin Pediatr* 1997; 209: 147–149.
26. Maeda T, Nishimura N, Sano K. P21 (WAF1/Cip1/Sdi1/Pic1) mRNA is expressed in neuroblastoma cell lines but not in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Acta Paediatr Jpn* 1997; 39: 590–594.
27. Mejia MC., Navarro S, Pellin A i wsp. Study of bcl-2 protein expression and apoptosis phenomenon in neuroblastoma. *Anticancer Res* 1998; 18(2A): 801–806.
28. Raschella G, Tanno B, Bonetto F i wsp. Retinoblastoma-related protein pRb2/p130 and its binding to the B-myb promoter increase during human neuroblastoma differentiation. *J Cell Biochem* 1997; 67: 297–303.
29. Bowman LC, Castleberry RP, Cantor A i wsp. Genetic Staging of Unresectable or Metastatic Neuroblastoma in Infants: a Pediatric Oncology Group Study. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 373–380.
30. Spitz R, Hero B, Simon T i wsp. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (11Pt1): 3368–3373.