

EKSPRESIJA PROTEINA Bcl-2, Bcl-X, Bax I p53 U EPSTEIN BARR VIRUS POZITIVNOM I NEGATIVNOM HODGKINOVOM LIMFOMU

EXPRESSION OF Bcl-2, Bcl-X, Bax AND p53 PROTEINS IN EPSTEIN BARR VIRUS POSITIVE AND NEGATIVE HODGKINS LYMPHOMA

**Elmir ČIČKUŠIĆ¹, Aida ARNAUTOVIĆ², Jasminka MUSTEDANAGIĆ-
MUJANOVIĆ¹, Ermina ILJAZOVIĆ¹, Zinaida KARASALIHović¹**

¹Zavod za patologiju Poliklinike za laboratorijsku dijagnostiku,

**²Klinika za interne bolesti, Univerzitetski klinički centar Tuzla, Trnovac bb,
75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina**

APSTRAKT

Uvod: Reed-Sternbergove stanice tipične za Hodgkinov limfom, predstavljaju transformirane post-germinativne B stanice, koje nisu ostvarile uspješan rearanžman imunoglobulinskog gena, te su stoga predodređene za apoptozu. Brojni mehanizmi, uključujući i latentnu infekciju Epstein Barr virusom (EBV), omogućavaju preživljavanje neoplastičnih stanica Hodgkinovog limfoma. Cilj studije je određivanje odnosa EBV statusa Hodgkinovog limfoma i ekspresije proteina udruženih sa apoptozom u neoplastičnim stanicama. Udruženost Hodgkinovog limfoma sa EBV određivana je detekcijom EBER1 i EBER2 hromogenom in situ hibridizacijom.

Materijal i Metode: Prisustvo proteina udruženih sa apoptozom: bcl-2, bcl-X, bax i p53, određivano je imunohistohemijski u neoplastičnim stanicama 39 slučajeva EBV pozitivnog i 42 slučaja EBV negativnog Hodgkinovog limfoma.

Rezultati: U neoplastičnim stanicama je Bcl-2 protein nađen u 22.2%, Bcl-X u 87.7%, Bax u 80.2% i p53 u 67,% slučajeva. U 44.4% slučajeva je prisutno istovremeno stvaranje Bcl-X, Bax i p53 proteina. Bcl-X se značajno više stvara u mješovitoj celularnosti, a Bcl-X i Bax u nodularnoj sklerozi. Nema značajne razlike u stvaranju sva četiri proteina u EBV pozitivnom i negativnom Hodgkinovom limfomu. Srednje vrijednosti intenziteta bojenja p53, Bcl-2, Bcl-X i Bax proteina ispitivane skupine u cijelosti, EBV pozitivne i EBV negativne skupine međusobno pokazuju značajnu razliku osim između Bcl-X i Bax.

Diskusija: Sposobnost preživljavanja neoplastičnih stanica Hodgkinovog limfoma zavisi od aktivnosti brojnih regulatora programirane stanične smrti. Ekspresija bcl-2, bcl-X, bax i p53 proteina u neoplastičnim stanicama se ne razlikuje u EBV pozitivnom i EBV negativnom Hodgkinovom limfomu.

Ključne riječi: Hodgkinov limfom, bcl-2, bcl-X, bax, p53, Epstein Barr virus

ABSTRACT

Introduction: Reed-Sternberg cells are typical for Hodgkin's lymphoma. They are transformed post-germinative B cells that not achieve successful immunoglobulin gene rearrangement, and therefore predetermined to apoptosis. Several mechanisms, including latent Epstein Barr virus infection (EBV), enable survival of Hodgkin's lymphoma neoplastic cells. Goal of this study is correlation of Hodgkin's lymphoma EBV status with expression of apoptosis associated proteins in neoplastic cells. Association of Hodgkin's lymphoma with EBV was determined by chromogenic hybridization in situ detection of EBER1 and EBER2.

Material and Methods: Presence of apoptosis associated proteins: bcl-2, bcl-X, bax and p53, were determined immunohistochemically in neoplastic cells of 39 EBV positive, and 42 EBV negative Hodgkin's lymphomas.

Results: Bcl-2 protein was detected in neoplastic cells in 22.2%, Bcl-X in 87.7%, Bax in 80.2% and p53 in 67.8% of cases. In 44.4% cases simultaneous presence of Bcl-X, Bax and p53 protein was detected. Bcl-X is significantly more produced in mixed cellularity, and Bcl-X and Bax in nodular sclerosis. No significant difference was found in production of all four proteins between EBV positive and negative Hodgkin's lymphoma. Median intensity of p53, Bcl-2, Bcl-X and Bax staining of complete examined group, EBV positive and EBV negative group show significant difference, except between Bcl-X and Bax.

Discussion: Survival capacity of Hodgkin's lymphoma neoplastic cells depends on activity of numerous regulators of programmed cell death. Expression of bcl-2, bcl-X, bax and p53 proteins is not different in neoplastic cells of EBV positive and EBV negative Hodgkin's lymphoma.

Key words: Hodgkin's lymphoma, bcl-2, bcl-X, bax, p53, Epstein Barr virus

UVOD

Hodgkinov limfom je neoplastična proliferacija Reed-Sternbergovih stanica i njihovih varijanti. Neoplastične stanice čine samo manji dio ukupne stanične populacije u Hodgkinovom limfomu. Dijagnoza ove neoplazme se zasniva na prepoznavanju ovih stanica, ali i na prisustvu karakteristične okolne infiltracije stanicama domaćina. Neoplastične stanice i prateći infiltrat u Hodgkinovom limfomu mogu biti vrlo različitog izgleda, tako da mogu oponašati druge limfome ili reaktivna stanja. Premda je Hodgkinov limfom osjetljiv na tretmane koji izazivaju apoptozu, on je otporan na fiziološke mehanizme koji izazivaju staničnu smrt. Reed-Sternbergove i Hodgkinove stanice izvjesno savladavaju endogenu apoptozu, preživljavaju i nakupljaju se, postajući klinički uočljive kao maligno oboljenje. Ove stanice posjeduju brojne članove iz porodice receptora za faktore tumorske nekroze. Receptori ove porodice su uključeni u aktivaciji i proliferaciji stanica, kao i u zaštiti stanica od apoptoze. Signali sa ovih receptora utiču na transkripciju. Otpornost prema apoptozi i aktivnost Reed-Sternbergovih stanica nastaje kao posljedica poremećaja u regulaciji gena koji kontroliraju ove procese.

Nekontrolisan porast broja stanica je osnovna osobina pretvaranja običnih u maligne stanice. To može nastati usljed povećanja proliferacije ili smanjenja stanične smrti. Smanjenje apoptoze može nastati kao posljedica nepostojanja ili mutacije tumor supresorskih gena p53 ili Rb, usljed povećanog stvaranja Bcl-2 ili smanjenja stvaranja Bax. Intracelularni infektivni agensi su također morali razviti mehanizme inhibicije apoptoze da bi spriječili uništavanje stanice

domaćina. Adenovirusi to ostvaruju stvaranjem proteina identičnog Bcl-2, Epstein-Barr virus poticanjem stvaranja Bcl-2, virus vakcinije stvaranjem inhibitora prokaspaze 1 i 8, i hlamidije sprečavanjem oslobađanja citohroma c u citozol¹.

Infektivni agens kao uzročnik Hodgkinovog limfoma je već izvjesno vrijeme predmet istraživanja, prije svega zbog kliničkih simptoma kao što su ciklične groznice i noćno znojenje, zbog morfološkog izgleda reaktivnog tkiva oko neoplastičnih ćelija, **epidemioloških nalaza bimodalne krivulje dobne incidence**, geografskih razlika u incidenci u mladih osoba, te zbog razlika u faktorima rizika u djece različitih društvenih klasa¹. Uloga Epstein Barr virusa (EBV) u nastanku Hodgkinovog limfoma je razmatrana dugo vremena, ali su ispitivanja bila otežana zbog karakteristično malog broja neoplastičnih stanica u ovom tumoru. Razvojem senzitivnih DNK metoda dokazana je udruženost EBV sa **ovom neoplazmom, kao i monoklonalnost prisutnog EBV genoma**^{2,3}.

U stvaranju uslova za kontinuiranu latentnu infekciju EBV se sreće sa dva izazova. Prvi je onemogućavanje lize njegove stanice domaćina od strane citotoksičnih T limfocita. Drugi izazov je inhibicija apoptoze ili programirane stanične smrti, koja je drugi odbrambeni mehanizam domaćina protiv virusnih infekcija⁴. Apoptoza je visoko orkestriran proces kojim stanica izvršava samoubistvo kao odgovor na razne stimuluse, i važan je mehanizam sprečavanja nastanka karcinoma. Programiranom staničnom smrću nastoji se prekinuti stanični metabolizam prije nego što dođe do umnažanja virusa i mogućnosti infekcije drugih stanica. Pri tome se stvaraju endonukleaze koje mogu razgraditi replicirajuću virusnu DNK

i zaustaviti umnažanje virusa⁵. Poznato je da neki virusi mogu stvarati bjelančevine koje mogu spriječiti ili odložiti apoptozu radi obezbjeđenja vremena za stvaranje nove generacije virusa⁶.

EBV je vrlo djelotvoran u sprečavanju apoptoze, jer su B limfociti, prirodni domaćini ovog virusa, izrazito podložni programiranoj staničnoj smrti. Tokom sazrijevanja B stanica u germinativnim centrima limfoidnih folikula, većina ovih stanica umire apoptozom. B limfociti koji posjeduju Ig receptore visokog afiniteta za antigene prezentirane od folikularnih dendritičkih stanica imaju aktiviran bcl-2 gen, i time su zaštićene od apoptoze. Reed-Sternbergove stanice tipične za Hodgkinov limfom, predstavljaju transformirane post-germinativne B stanice, koje nisu ostvarile uspješan rearanžman imunoglobulinskog gena, te su stoga predodređene za apoptozu. Brojni mehanizmi, uključujući i latentnu infekciju Epstein Barr virusom (EBV), omogućavaju preživljavanje neoplastičnih stanica Hodgkinovog limfoma.

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije proteina udruženih sa apoptozom (Bcl-2, Bcl-x, Bax, p53) u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma. Korelacija ekspresije proteina udruženih sa apoptozom u EBV pozitivnim i EBV negativnim slučajevima Hodgkinovog limfoma.

MATERIJAL I METODE

U studiju je uključen 81 slučaj Hodgkinovog limfoma dijagnosticiran u Zavodu za patologiju Univerzitetskog kliničkog centra Tuzla. U fenotipizaciji neoplastičnih stanica, dokazivanju EBV infekcije i određivanju ekspresije proteina udruženih sa apoptozom, korištena je imunohistohemijska metoda trostepene imunoperoksidaze sa streptavidinom. Upotrebljena su slijedeća antitijela: CD3(PC3/188A), CD15(C3D-1), CD20cy(L26), CD30(Ber-H2), CD45(T29/33), LMP(CS 1-4), BCL2 (124), Bcl-X(poliklonalni), Bax(poliklonalni) i p53 protein(DO-7)(DAKO, Glostrup, Danska). Detekcija Epstein Barr virusne ribonukleinske kiseline (EBER1 i EBER2 RNA) vršena je metodom hromogene hibridizacije in situ korištenjem FITC-om označene peptidne nukleinsko kiseline (PNA) probe (Dako, Glostrup, Danska).

Za imunohistohemijsku analizu, deparafinirani, 5µm debeli histološki rezovi formalinom fiksi-

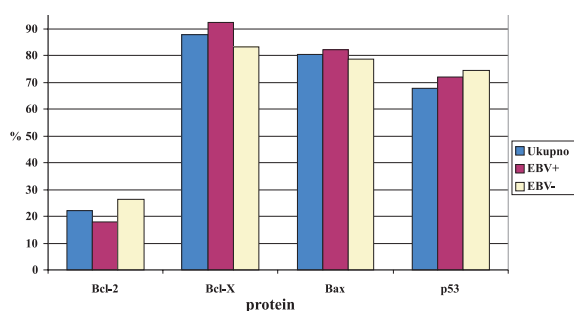
ranih i u parafin ukalupljenih tkivnih uzoraka Hodgkinovog limfoma inkubirani su primarnim antitijelima na sobnoj temperaturi u trajanju 1 sat. Prije inkubacije vršena je inhibicija aktivnosti endogene peroksidaze i demaskiranje antigena kuhanjem 15 minuta u citratnom puferu pH 6.0. Inkubacija sekundarnim antitijelima označenim biotinom i peroksidazom označenim streptavidinom trajala je 30 minuta. Kao hromogen korišten je 3,3 diaminobenzidin hidrohlorid, a za kontrastno bojenje hematoksilin. Intenzitet ekspresije antigena je određivan semikvantitativno kao negativno(0), blago(1), umjereno(2) i intenzivno pozitivno(3) bojenje.

U pripremi za in situ hibridizaciju, nakon standardne procedure deparafinizacije i rehidracije, obavljen je pretretman histoloških rezova proteinazom K u trajanju 20 minuta. Slijedila je hibridizacija PNA probom 90 minuta na 55°C, a potom inkubacija sa sekundarnim anti-FITC antitijelom označenim alkalnom fosfatazom u trajanju 30 minuta. Vizualizacija je izvršena BCIP/NBT/levamizol supstratnim sistemom 60 minuta, nakon čega je slijedilo kontrastno bojenje hematoskilinom.

Statistička obrada podataka je izvršena računanjem srednje vrijednosti, standardne devijacije, testiranjem proporcija, i hi-kvadrat testom.

REZULTATI

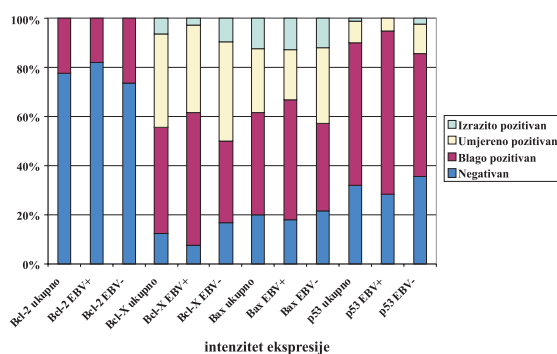
Neoplastične stanice Hodgkinovog limfoma su imunohistohemijski bile pozitivne na latentni membranski protein 1 u 27 (33.3%) slučajeva. In situ hibridizacijom, pozitivnost na EBER RNK u Reed-Sternbergovim, Hodgkinovim i lakunarnim stanicama je nađena u 39 (48.1%) slučajeva. Bcl-2 onkoprotein je u neoplastičnim stanicama **Hodgkinovog limfoma bio pozitivan** u 18 (22.2%) slučajeva, Bcl-X protein u 71 (87.7%), Bax protein u 65 (80.2%), a p53 protein je nađen u 55 (67.8%) slučajeva. Bcl-2 protein je bio pozitivan u 7 (17.9%) EBER RNK pozitivnih slučajeva Hodgkinovog limfoma, Bcl-X je nađen u 36 (92.3%), Bax u 32 (82.1%), a p53 u 28 (71.8%) slučajeva. Bcl-2 protein je bio pozitivan u 11 (26.2%) EBV negativnih slučajeva Hodgkinovog limfoma, Bcl-X je nađen u neoplastičnim stanicama 35 (83.3%), Bax u 33 (78.6%), a p53 u 27 (74.3%) slučajeva (Grafikon 1)(Slika 1).



Slika 1. Ekspresija proteina udruženih sa apoptozom u EBV + i EBV- Hodgkinovom limfomu

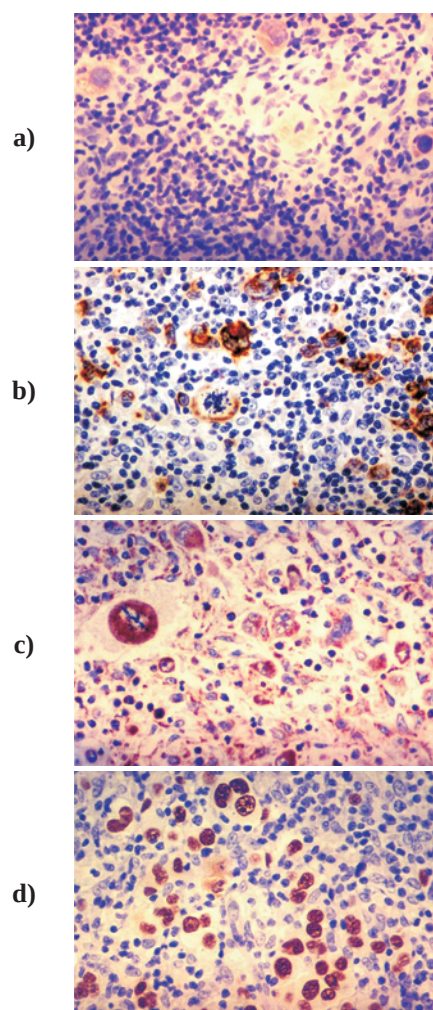
Figure 1. Expression of proteins associated with apoptosis in EBV + EBV- Hodgkin lymphoma

Intenzitet pozitivnosti neoplastičnih stanica EBV pozitivne Hodgkinove bolesti na proteine udružene sa apoptozom prikazan je u grafikonu. Intenzitet pozitivnosti neoplastičnih stanica na proteine udružene sa apoptozom prikazan je u grafikonu. Intenzitet pozitivnosti neoplastičnih stanica EBV negativne Hodgkinove bolesti na proteine udružene sa apoptozom prikazan je u grafikonu.



Slika 2. Intenzitet ekspresije proteina udruženih sa apoptozom u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma

Figure 2. Intensity of expression of proteins associated with apoptosis in neoplastic cells of Hodgkin lymphoma



Slika 3. Ekspresija proteina udruženih sa apoptozom u Hodgkinovom limfomu: a) Bcl-2, b) Bcl-X, c) Bax i d) p53

Figure 3. Expression of proteins associated with apoptosis in Hodgkin lymphoma: a) Bcl-2, b) Bcl-X, c) Bax, d) p53

Srednje vrijednosti intenziteta ekspresije ovih antigena ispitivane grupe u cijelosti, EBER RNK pozitivnih i negativnih slučajeva Hodgkinovog limfoma su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Srednje vrijednosti ekspresije antigena CD15, CD20, Bcl-2, Bcl-X, Bax i p53 proteina u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma

Table 1. Mean values of expression of antigens CD15, CD20, Bcl-2, Bcl-X, Bax and p53 proteins in neoplastic cells of Hodgkin lymphoma

Antigen	Grupa u Cijelosti (n=81)		EBV+ (n=39)		EBV-(n=42)	
	Srednje	St. devijacija	Srednje	St. devijacija	Srednje	St. devijacija
CD15	1.23	0.81	1.21	0.89	1.26	0.73
CD30	1.58	0.80	1.69	0.77	1.48	0.83
Bcl-2	0.22	0.42	0.18	0.39	0.26	0.45
Bcl-X	1.38	0.78	1.33	0.66	1.43	0.89
Bax	1.31	0.93	1.28	0.92	1.33	0.95
P53	0.79	0.65	0.77	0.54	0.81	0.74

DISKUSIJA

U netretiranom Hodgkinovom limfomu mogu se naći znaci niske apoptotične aktivnosti u vidu kariorektnih "mumificiranih" neoplastičnih stanica. Osjetljivost neoplastičnih stanica Hodgkinovog limfoma na terapiju, kao i znaci endogene stanične smrti govore o zadržavanju njihove sposobnosti podlijevanja apoptotičnoj smrti. Sa druge strane, klinička iskustva govore o postojanju dijela Hodgkinovog limfoma koji je otporan na terapiju. Imunohistohemijska ispitivanja prisustva **Bcl-2, Bcl-X i Bax u Hodgkinovom limfomu** su pokazala prisustvo sva tri proteina u Reed-Sternbergovim i Hodgkinovim stanicama u preko 50% slučajeva, sugerirajući pri tom načine preživljavanja in vivo i mehanizme odgovora na terapiju^{7,8}. Latentni membranski protein-1 Epstein-Barr virusa, koji se nalazi u neoplastičnim stanicama dijela Hodgkinovog limfoma, **može oponašati glavne signalne puteve B stanica**, dijeleći brojne osobine sa CD40, članom porodice receptora za faktor tumorske nekroze 1^{9,10}.

Učestalost prisutnosti Bcl-2 u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma ispitivane skupine u 22.2% slučajeva jedna je od najnižih zabilježenih. Manju učestalost ekspresije su našli autori studije iz Poljske (12.5%), a vrlo sličnu autori iz Kine (23.0%)^{11,12}. Statistički značajno veće prisustvo Bcl-2 proteina dokazali su autori studija sa 42.9% ($P < .01$), 53.3% ($P < .0001$), 44% ($P < .05$), 43% ($P < .05$), 37.7% ($P < .05$), 61.5% ($P < .01$), 69% ($P < .0001$), 63.5% ($P < .0001$) i 65% ($P < .0001$) ovih slučajeva¹³⁻²¹. Bcl-2 protein je u neoplastičnim stanicama EBV pozitivnih slučajeva ispitivane skupine (17.9%) bio nešto manje prisutan u odnosu na EBV negativne slučajeve (26.2%). Intenzitet bojenja na Bcl-2 protein je takođe bio nešto intenzivniji u EBV negativnim (0.26) u odnosu na EBV pozitivne slučajeve (0.18). **Ovi podaci su u skladu sa tvrdnjama da je stvaranje Bcl-2 proteina neovisno o udruženosti Hodgkinovog limfoma sa EBV infekcijom**^{11, 12, 14}.

U distribuciji učestalosti ekspresije Bcl-2 prema podtipu **Hodgkinovog limfoma ispitivane skupine** u cijelosti nije nađena statistički značajno veća udruženost ekspresije Bcl-2 sa određenim podtipom, što je u suprotnosti sa tvrdnjama da je **Bcl-2 protein češće prisutan u podtipu nodu-**

larne skleroze¹⁶. Poređenjem ekspresije Bcl-2 proteina nije nađena statistički značajno veća ekspresija ovog onkoproteina u podtipovima **nodularne skleroze (34.8%), limfocitne predominacije (33.3) i mješovite celularnosti (28.6%)** EBV negativnih slučajeva u odnosu na EBV pozitivne slučajeve ispitivane skupine (19.2%; 0.0% i 10%). Srednje vrijednosti intenziteta ekspresije **Bcl-2 proteina u pomenutim podtipovima Hodgkinovog limfoma** takođe su veće u grupi EBV negativnih slučajeva (0.26; 0.33 i 0.29) u odnosu na EBV pozitivne (0.19; 0.00; 0.10). Mogućnost da **Bcl-2 može imati značajniju ulogu u patogenezi EBV negativnih slučajeva Hodgkinovog limfoma** već je iznesena, ali nije bila povezivana sa određenim podtipovima bolesti¹⁴. Ispitivanjem povezanosti ekspresije Bcl-2 proteina i prisustva t (14;18) u Hodgkinovom limfomu nije nađena značajna udruženost prisustva ove translokacije i ekspresije Bcl-2. To može značiti da t (14;18) ne igra značajnu ulogu u patogenezi Hodgkinovog limfoma.

Bcl-X gen iz porodice gena inhibitora apoptoze je prema većini izvještaja mnogo aktivniji u Hodgkinovom limfomu u odnosu na Bcl-2 gen. Ekspresija ovog gena je zabilježena u 86% do 94% slučajeva^{21, 22}. Samo u jednoj studiji je nađena ekspresija ovog gena u 34% slučajeva, što je statistički značajno manje ($P < .0001$) u odnosu na ispitivanu skupinu¹³. **In vitro ispitivanja** su pokazala da Bcl-X gen može uticati na stvaranje otpornosti na lijekove, upućujući na zaključak da hemijske i biološke interakcije sa ovim proteinom mogu imati terapijski značaj u Hodgkinovom limfomu²¹. Učestalost ekspresije **Bcl-X proteina u neoplastičnim stanicama ispitivane skupine** u cijelosti (87.7%) je u skladu sa većinom objavljenih podataka, dok je intenzitet bojenja **bio srednji (1.38)**. **Nalaz visoke ekspresije Bcl-X**, a niske ekspresije Bcl-2 u Hodgkinovoj bolesti odgovara objavljenim podacima⁷. Razlika u ekspresiji Bcl-X proteina u skupini EBV pozitivnih slučajeva (92.3%) u odnosu na EBV negativne slučajeve (83.3%) iznosi 9%, i iako nije statistički značajna, najveća je razlika u ekspresiji ispitivanih proteina udruženih sa apoptozom među ovim skupinama. Interesantno je da je **prosječan intenzitet bojenja u EBV negativnoj skupini (1.43)** nešto veći, ali ne i statistički značajno različit, u odnosu na EBV pozitivnu skupinu (1.33). U **raspodjeli učestalosti ekspresije Bcl-X** prema podtipovima Hodgkinovog

limfoma ispitivane skupine u cijelosti, nađena je statistički značajna razlika ($P < .05$) u ekspresiji ovog **proteina u podtipovima nodularne skleroze** (91.2%) i mješovite celularnosti (88.2%) u odnosu na podtip limfocitne deplecije (33.3%). Podtip limfocitne predominacije sa 75.9% slučajeva sa ekspresijom Bcl-X nije statistički značajno **različit u odnosu na limfocitnu depleciju**. Poređenjem srednjeg intenziteta bojenja neoplastičnih stanica pojedinih podtipova EBV pozitivne i EBV negativne skupine Hodgkinovog limfoma najjači intenzitet je nađen u skupini EBV negativne mješovite celularnosti (1.71), što naglašava mogućnost značajne uloge ovog proteina u patogenezi slučajeva ove skupine. Ekspresija Bcl-X u pojedinim podtipovima EBV pozitivne i EBV negativne skupine Hodgkinovog limfoma pokazala je značajno manju učestalost u podtipu limfocitne deplecije u odnosu na ostale podtipove.

Ispitivanja prisustva proapoptotičnog proteina Bax u pojedinim studijama pokazuju da je ovaj protein bio odsutan, ili prisutan u vrlo malom dijelu slučajeva (1.8%), druge studije su pokazale njegovu ekspresiju u 41% do 92% slučajeva^{8, 13, 15}. Upotrebom monoklalnog antitijela pri analizi Bax proteina nađeno je prisustvo u malom broju slučajeva, **dok je upotreba poliklalnog antitijela** pokazala visoku ekspresiju ovog proteina¹. Ispitivanja prisustva glasničke RNK Bax gena u Reed-Sternbergovim stanicama koje su pozitivne na **Bax protein upotrebom poliklalnog antitijela** su pokazala prisustvo ove RNK, potvrđujući korisnost ovog antitijela¹.

Ekspresija **Bax proteina u neoplastičnim stanicama** ispitivane skupine Hodgkinovog limfoma je bila visoka (80.2%), a razlika u ekspresiji među skupinama EBV pozitivnih (82.1%) i EBV negativnih **slučajeva (78.6%) je bila neznatna**. Intenzitet bojenja Bax proteina ispitivane skupine u cijelosti je bio umjeren i nije pokazao statistički značajnu razliku među EBV pozitivnim i EBV negativnim slučajevima. Poređenjem učestalosti pozitivnosti **Bax proteina u neoplastičnim stanicama** pojedinih podtipova Hodgkinovog limfoma ispitivane skupine u cijelosti, skupine EBV pozitivnih i EBV negativnih slučajeva, nodularna skleroza je pokazala najčešću pozitivnost u sve tri skupine (89.5%; 92.3%; 87.1%). U ispitivanoj skupini u cijelosti ona je bila statistički značajno veća ($P < .05$) u odnosu na ekspresiju ovog proteina u podtipovima limfocitne predominacije

i mješovite celularnosti, a u skupinama EBV pozitivnih i EBV negativnih slučajeva u odnosu na podtip mješovite celularnosti.

Poređenjem srednjih vrijednosti intenziteta bojenja Bax proteina nađen je u skupini EBV negativnih slučajeva značajno veći intenzitet u podtipu nodularne skleroze u odnosu na druge podtipove (1.58 naprema 0.33; 0.86 i 0.00). Najveći srednji intenzitet bojenja je nađen u EBV pozitivnim **slučajevima podtipa limfocitne deplecije** (2.50), što je u cijelosti najveća prosječna vrijednost bojenja u svim ispitivanim skupinama. Bax protein je pokazao značajnu prisutnost u ispitivanim slučajevima Hodgkinovog limfoma, koja je **najizraženija u podtipu nodularne skleroze, bez obzira na udruženost sa EBV infekcijom**. Visoku ekspresiju Bax gena neki od autora navode kao mogući razlog dobrog terapijskog odgovora **značajnog dijela oboljelih od ove neoplazme**⁸. Iako je Bax protein prisutan u najvećem dijelu slučajeva Hodgkinovog limfoma, u većini pozitivnih stanica nema morfoloških znakova koji odgovaraju apoptozi. Bax gen će izazvati staničnu smrt kada je nivo njegove ekspresije veći u odnosu na ekspresiju Bcl-2 i Bcl-X gena²³. Izgleda da su neoplastične stanice zaštićene od smrti sve dok je količina Bcl-X proteina dovoljna da veže postojeći Bax protein²⁴.

Protein **p53 se može imunohistohemijski dokazati** u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma u značajnom dijelu slučajeva. Prikazana je učestalost pozitivnosti neoplastičnih stanica u 30% do 77% slučajeva ove bolesti^{13, 20, 25, 26}. Učestalost pozitivnosti neoplastičnih stanica ispitivane skupine u cijelosti na p53 protein (67.8%) odgovara dijelu studija sa izraženom ekspresijom ovog proteina. Statistički značajno manju ekspresiju ovog proteina u odnosu na ispitivanu skupinu su pokazale studije sa 30% ($P < .001$) i 35% ($P < .001$) ovakvih slučajeva^{18, 27}. Učestalost prisutnosti p53 u EBV pozitivnim slučajevima (71.8%) je nešto veća nego u EBV negativnim slučajevima (64.3%), ali ne statistički značajno. Poređenjem učestalosti pozitivnosti Reed-Sternbergovih i Hodgkinovih stanica u pojedinim podtipovima bolesti nađena je najveća učestalost pozitivnosti **podtipa nodularne skleroze** u ispitivanoj skupini u cijelosti (73.7%) i skupini EBV negativnih bolesti (71.0%). Zanimljiv je podatak da su svi analizirani slučajevi EBV pozitivne limfocitne predominacije i limfocitne deplecije pozitivni, a svi EBV ne-

gativni slučajevi ovih podtipova negativni na p53 protein. Nije nađena statistički značajna razlika u intenzitetima bojenja p53 između EBV pozitivnih i **EBV negativnih slučajeva. Poređenjem srednjih vrijednosti intenziteta bojenja neoplastičnih stanica na p53 u odnosu na podtip bolesti i udruženost sa EBV infekcijom značajno veću srednju vrijednost je pokazao podtip EBV pozitivne limfocitne deplecije (1.5).** Među EBV negativnim slučajevima najveću, ali ne značajno različitu pozitivnost je pokazao podtip mješovite celularnosti (1.14). Stvaranje p53 proteina u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma je uobičajena pojava, bez značajnih razlika među podtipovima bolesti, odnosno bez obzira na udruženost sa EBV infekcijom. Ispitivanja postojanja mutacija p53 gena u Hodgkinovom limfomu i **njihovog mogućeg uticaja na stvaranje p53 proteina** su pokazala da ove mutacije nisu karakteristične za ovu neoplazmu i nemaju uticaja na stvaranje ovog proteina^{25, 28}.

Odsustvo ekspresije Bcl-2, Bcl-X, Bax i p53 proteina u samo 2 (2.5%) slučaja ispitivane skupine Hodgkinovog limfoma potvrđuje ulogu apoptotičnih i **antiapoptotičnih gena u patogenezi** ove bolesti. U manjem dijelu slučajeva (14.8%) prisutan je samo jedan od navedenih proteina, dok se u statistički značajno većem ($P < .0001$) broju slučajeva nađu dva ili više proteina (82.7%). **Tri proteina su nađena u više od polovine slučajeva (50.6%), a sva četiri u 13.6% slučajeva.** Statistički značajno najbrojnija ($P < .0001$) kombinacija ekspresije u ispitivanoj skupini u cijelosti je istovremeno prisustvo Bcl-X, Bax i **p53 proteina u 36 (44.4%) slučajeva.** Sposobnost preživljavanja ili podlijevanje staničnoj smrti neoplastičnih stanica Hodgkinovog limfoma očigledno ne zavisi od aktivnosti pojedinačnog gena uključenog u regulaciju ovih dešavanja. **Sudbina Reed-Sternbergovih i Hodgkinovih stanica će biti određena mogućnošću održavanja ravnoteže između proapoptotičnih i antiapoptotičnih signala.**

U netretiranom Hodgkinovom limfomu prednost je izvjesno na strani antiapoptotičnih gena, što se ogleda u malom broju apoptotičnih stanica i u rastu i širenju neoplazme. Ekspresija gena **uključenih u regulaciju apoptoze može imati uticaja na odgovor na terapiju** čiji je osnovni cilj da neoplastične stanice podvrgne apoptozi. Prisustvo Bax ili nekog drugog proapoptotičnog proteina u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma

može ostaviti mogućnost pokretanja mehanizma apoptoze ovim putem. Povećano stvaranje Bcl-2 proteina ili njegovih homologa može uticati ne samo na otpornost B i T limfocita na kortikosteroide, gama zračenje i na oštećenje DNK hemoterapijom, nego može zaštititi i različite neoplastične stanice²⁹. **Poređenjem srednjih vrijednosti intenziteta bojenja p53, Bcl-2, Bcl-X i Bax proteina** ispitivane skupine u cijelosti, EBV pozitivnih i EBV negativnih skupina, nađena je u svim navedenim kombinacijama statistički **značajna razlika u intenzitetima ekspresije navedenih proteina** ($P < .0001$ do $P < .000001$), osim između Bcl-X i Bax proteina. Stoga se može pretpostaviti da je za opstanak i rast neoplastičnih stanica neophodna ravnoteža aktivnosti ovih gena. U slučaju Hodgkinovog limfoma izgleda da je veoma značajna ravnoteža stvaranja Bcl-X i Bax proteina, dok Bcl-2 ne pokazuje takav nivo ekspresije. U više drugih ispitivanja je dokazano da visok nivo ekspresije Bcl-2 gena u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma ima nepovoljan uticaj na prognozu bolesti, dok su za uticaj visokih i niskih nivoa ekspresije p53 gena mišljenja podijeljena^{30, 31}.

Svi **EBV udruženi slučajevi Hodgkinovog limfoma** imaju visoku ekspresiju LMP1 koji izaziva odgovor citotoksičnih T limfocita u zdravih osoba. Smanjena ekspresija HLA gena klase I u EBV negativnom Hodgkinovom limfomu, može biti način na koji neoplastične stanice ovih slučajeva izbjegavaju prepoznavanje od strane citotoksičnih T limfocita³². U **EBV pozitivnim slučajevima** nađena je uobičajena, pa čak i povećana ekspresija HLA gena klase I što upućuje na drugačije mehanizme izbjegavanja staničnog odgovora³³. U osoba sa EBV pozitivnim Hodgkinovim limfomom nađen je lokalni prije nego sistemski poremećaj u citotoksičnosti³⁴. Stvaranje inhibitora citotoksičnih T stanica, interleukina-10 i faktora tumorskog rasta- β , koji **su nađeni u neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma**, ili stvaranje serpina mogu spriječiti **destruktivno dejstvo perforina i granzima**^{35, 36}. Ispitivanje prisustva apoptoze u Fas i Fas ligand pozitivnim neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma su pokazala da interakcije Fas i Fas liganda ne moraju uzrokovati apoptozu ovih stanica³⁷. To znači da postoje mehanizmi kojima Reed-Sternbergove i Hodgkinove stanice mogu izbjeći apoptozu uzrokovanu citotoksičnim nesekretornim putem.

ZAKLJUČAK

U neoplastičnim stanicama Hodgkinovog limfoma Bcl-2 protein se nalazi u 22.2%, Bcl-X u 87.7%, Bax u 80.2% i p53 u 67.8% slučajeva. Istovremeno stvaranje Bcl-X, Bax i p53 proteina je prisutno u 44.4% slučajeva. Ekspresija bcl-2, bcl-X, bax i p53 proteina u neoplastičnim stanicama se ne razlikuje u EBV pozitivnom i EBV negativnom Hodgkinovom limfomu. Srednje vrijednosti intenziteta bojenja p53, Bcl-2, Bcl-X i Bax proteina ispitivane skupine u cijelosti, EBV pozitivne i EBV negativne skupine međusobno pokazuju značajnu razliku, osim između Bcl-X i Bax proteina. Sposobnost preživljavanja ili podlijevanje staničnoj smrti neoplastičnih stanica Hodgkinovog limfoma očigledno ne zavisi od aktivnosti pojedinačnog gena **uključenog u regulaciju programirane stanične smrti. Sudbina Reed-Sternbergovih i Hodgkinovih stanica će biti određena mogućnošću održavanja ravnoteže između proapoptotičnih i antiapoptotičnih signala.**

LITERATURA

1. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; 4: 332-339.
2. Glaser S.L., Lin R.J., Stewart S.L. Epstein-Barr Virus-Associated Hodgkin's Disease: Epidemiologic Characteristics in International Data. *Int. J. Cancer* 1997; 70: 375-382.
3. Weiss LM., Mohaved LA., Butler AE., Swanson SA., Frierson FH., Cooper PH. Analysis of lymphoepithelioma and lymphoepithelioma-like carcinomas for Epstein-Barr virus by in situ hybridization. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989; 13: 625-631.
4. Vaux DL, Haeccker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-779.
5. Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 2000; 21: 405-426.
6. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997; 71: 1739-1746.
7. Schlaifer D, March M, Krajewski S, Laurent G, Pris J, Delsol G, Reed JC, Brousset P. High expression of the bcl-x gene in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1995; 85: 2671-2674.
8. Brousset P, Benharroch D, Krajewski S, Laurent G, Meggetto F, Rigal-Huguet F, Gopas J, Prinsloo I, Pris J, Delsol G, Reed J, Schlaifer D. Frequent expression of the cell death-inducing gene bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1996; 87: 2470-2475.
9. Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, Van Arsdalet T, Ware C, Kieff E. The Epstein-Barr virus transformant protein LMP1 engages signalling proteins for the Tumor Necrosis Factor Receptor family. *Cell* 1995; 80: 389-394.
10. Luftig M, Yasui T, Soni V. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:141-146.
11. Kordek R, Biernat W, Kupnicka D, Wozniak L. Expression of bcl-2 protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein in Hodgkin's disease. *Pol J Pathol* 1994; 45: 279-281.
12. Liu C, Liao S, Gao Z. Epstein-Barr virus infection and the expression of bcl-2 proto-oncogene in Hodgkin's disease. *Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* 1997; 26: 155-157.
13. Lauritzen AF, Moller PH, Nedergaard T, Guldberg P, Hou-Jensen K, Ralfkiaer E. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease. *APMIS* 1999; 107: 636-644.
14. Khan G, Gupta RK, Coates PJ, Slavin G. Epstein-Barr virus infection and bcl-2 proto-oncogene expression. Separate events in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1993; 143: 1270-1274.
15. Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, Eliopoulos G, Kakolyris S, Rontogianni D, Gorgoulis V, Georgoulis V. Expression of p53, p21/waf1, bcl-2, bax, Rb and Ki 67 proteins in Hodgkin's lymphomas. *Histol Histopathol* 2000; 15: 445-453.
16. Lones MA, Pinkus GS, Shintaku IP, Said JW (1994) Bcl-2 oncogene protein is preferentially expressed in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease of the nodular sclerosis subtype. *Am J Clin Pathol* 102: 464-467.
17. Claviez A, Tiemann M, Peters J, Kreipe H, Schneppenheim R, Parwaresch R. The impact of EBV proliferation rate, and bcl-2 expression in Hodgkin's disease in childhood. *Ann Hematol* 1994; 68: 61-66.
18. Doussis IA, Pezzella F, Lane DP, Gatter KC, Mason DY. An immunocytochemical study of p53 and bcl-2 protein expression in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 663-667.
19. Smolewski P, Niewiadomska H, Blonski JZ, Robak T, Krykowski E. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53, bcl-2 or C-erb B-2 proteins on Reed-Sternberg cells: prognostic significance in Hodgkin's disease. *Neoplasma* 1998; 45: 140-147.
20. Preciado MV, Cristobal E, Menarguez J, Martinez Montero JC, Diez B, De Matteo E, Grinstein S. Oncogene expression in tumour cells of pediatric Hodgkin's disease in Argentina: correlation with Epstein-Barr virus presence. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 25-31.
21. Schlaifer D, Krajewski S, Rigal-Huguet F, Laurent G, Pris J, Delsol G, Reed JC, Brousset P. Bcl-X gene expression in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 143-146.
22. Chu WS, Aguilera NS, Wei MQ, Abbondanzo SL. Antiapoptotic marker Bcl-X(L), expression on Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using a novel monoclonal marker, YTH-2H12. *Hum Pathol* 1999; 30: 1065-1070.
23. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
24. Messineo C, Jamerson H, Hunter E, Brazier R, Bagg A, Irving SG, Cossman J. Gene expression by single Reed-Sternberg cells: pathways of apoptosis and activation. *Blood* 1998; 91: 2443-2451.
25. Elenitoba-Johnson KS, Medeiros LJ, Khorsand J, King TC. p53 expression in Reed-Sternberg cells does not correlate with gene mutations in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 728-738.
26. Xerri L, Bouabdallah R, Camerlo J, Hassoun J. Expression of the p53 gene in Hodgkin's disease: dissociation between immunohistochemistry and clinicopathological data. *Hum Pathol* 1994; 25: 449-454.
27. Tzardi M, Kouvidou C, Panayiotides I, Koutsoubi K, Stefanaki K, Giannaki E, Darivianaki K, Zois M, Eliopoulos G, Kakolyris S, Delides G, Rontogianni D, Kanavaros P. Expression of p53 and mdm-2 proteins in Hodgkin's disease. Absence of correlation with the presence of Epstein-Barr virus. *Anticancer Res* 1996; 16: 2813-2819.
28. Montesinos-Rongen M, Roers A, Kuppers R, Rajewsky K, Hansmann ML. Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood* 1999; 94: 1755-1760.
29. Strasser A, Huang DCS, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: 151-178.

30. Brink AA, Oudejans JJ, Van Den Brule AJ, Kluin PM, Horstman A, Ossenkoppele GJ, Van Heerde P, Jiwa M, Meijer CJ. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance? *Mod Pathol* 1998; 11: 376-383.
31. Smolewski P, Robak T, Krykowski E, Blasinska-Morawiec M, Niewiadomska H, Plauzanska A, Chmielowska E, Zambrano O. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1150-1160.
32. Poppema S, Visser L. Absence of HLA class I expression by Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 1994; 145: 37-41.
33. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Horstman A, Vos W, Baak JPA, Kluin PM, Van Der Valk P, Walboomers JMM, Meijer CJLM. Analysis of MHC class I expression on Reed-Sternberg cells in relation to the cytotoxic T-cell response in Epstein-Barr virus positive and negative Hodgkin's disease. *Blood* 1996; 87: 3844-3851.
34. Frisan T, Sjoberg J, Dolcetti R. Local suppression of Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxicity in biopsies of EBV-positive Hodgkin's disease. *Blood* 1995; 86: 1493-1501.
35. Ohshima K, Suzumiya J, Akamatsu M, Takeshita M, Kikuchi M. Human and viral interleukin-10 in Hodgkin's disease, and its influence on CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Int J Cancer* 1995; 62: 5-10.
36. Quan LT, Caputo A, Bleackley RC, Pickup DJ, Salvesen GS. Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier. *Am J Biol Chem* 1995; 270: 10377-10379.
37. Metkar SS, Naresh KN, Redkar AA, Soman CS, Advani SH, Nadkarni JJ. Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1999; 33: 521-530.

Rad primljen: 10. 3. 2008.

Rad prihvaćen: 12. 5. 2008.