

Az apoptózis előfordulása és jelentősége daganatos folyamatokban

Szende Béla

Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete,
MTA-SE EKSZ Molekuláris Patológiai Kutató Csoport, Budapest

A daganatmegelőző állapotok és rosszindulatú daganatok esetében feltételezhető az apoptotikus aktivitás csökkenése. Az utóbbi évek vizsgálatai alapján kiderült, hogy ez a tétel csak bizonyos tumorok esetében helytálló. Több adat szól amellett, hogy a kevésbé differenciált daganatokban magasabb az apoptotikus sejtek aránya, mint a jól differenciált daganatokban. Ugyanakkor a jól differenciált tumorok esetében nagyobb mértékű apoptózisindex-emelkedést érhetünk el citosztatikumokkal, vagy hormonkezeléssel. A szerző által vizsgált prosztaták, coloncarcinoma és akut lymphoid leukaemia esetében az apoptózis indukálhatósága a kezelés szempontjából prediktív faktornak tekinthető. Kevésbé állítható ez emlőrákokról és mesopharyngealis carcinomákról. A neuroblastoma, valamint a pajzsmirigy follicularis adenomája és follicularis, továbbá papillaris rákja és a mellékpajzsmirigy adenomája igen alacsony spontán apoptotikus aktivitással rendelkezik. Ezen tumorok estében az apoptózist befolyásoló gének (pl. bcl2, p53, bax) kifejeződésének sajátosságai a kórszövettani differenciáldiagnosztika szempontjából bírhatnak jelentőséggel. *Magyar Onkológia 48:215–219, 2004*

Decreased apoptotic activity in precancerous lesions and in malignant tumors has largely been prejudiced. Results of studies performed in the last years showed that this suggestion is correct only in certain types of tumors. Data have been revealed on higher apoptotic activity in poorly differentiated tumors, whereas in well-differentiated neoplasms this activity is relatively low. At the same time, cytostatic or hormonal treatment of well-differentiated tumors result in a considerable elevation of the apoptotic index. The author considers the inducibility of apoptosis as a predictive factor regarding the efficacy of therapy in case of prostate carcinoma, colon carcinoma and acute lymphoid leukemia. This statement is less applicable to breast cancer or mesopharyngeal carcinoma. Very low apoptotic activity was observed in neuroblastomas, follicular adenomas, as well as follicular and papillary carcinomas of the thyroid gland, and adenomas of the parathyroid gland. Expression of genes influencing apoptosis, such as bcl2, p53, and bax, may rather be of importance from the point of view of histological differential diagnosis. *Szende B. The occurrence and significance of apoptosis in tumors. Hungarian Oncology 48:215–219, 2004*



Bevezetés

Kerr és munkatársai 1972-ben a sejthalál aktív, programozott formáját írták le, melyet apoptózisnak neveztek el, az őszi lombhullásra utalva (7).

Közlésre érkezett: 2004. június 9.
Elfogadva: 2004. július 11.

Levelezési cím: Dr. Szende Béla, Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26. Tel./fax: 1-266-0451

A szerző a közleményt Dr. Jenei András egyetemi tanár 70. születésnapjára ajánlja.

Bár ez az első közlemény a májsejtek sajátos pusztulási formáját vette alapul, a következő években az apoptózissal foglalkozó irodalom elsősorban a daganatokban és a daganatmegelőző állapotokban előforduló apoptózist tárgyalta (18, 20). Elterjedt az a részben téves nézet, hogy a daganatokban megszűnik, vagy erősen lecsökken az apoptotikus aktivitás, aminek fokozása kívánatos. Ez, mint látni fogjuk, nem minden daganatra, ezen belül nem minden szövettani daganatra érvényes, de mégis a rosszindulatú daganatokat azon betegségek közé sorolhatjuk, melyek esetében érdemes az apoptózis fokozott induká-

lására törekedni. Később derült fény arra, hogy vannak olyan megbetegedések, melyekben a fiziológiást jóval meghaladó mértékben pusztulnak el a sejtek, apoptózis következtében. Ilyen esetekben természetesen az apoptózis mérséklésére kell irányulnia a terápiás beavatkozásnak.

A következőkben néhány példával illusztrálva igyekszünk megvilágítani a túl kevés apoptózissal járó folyamatok lényegét, és utalni azokra a folyamatokra, amelyek egyes elemeinek gyógyszeres befolyásolásával jobb terápiás eredmény érhető el.

Csökkent apoptotikus aktivitással jellemezhető kórképek

Praeblastomatosus állapotok

Már az 1980-as évek elején felismerték azt a tényt, hogy a karcinogenezis során a sejtközösség apoptózis útján kiveti magából a károsodott DNS-sel rendelkező és a károsodás kivédésére képtelen sejteket (9). Amennyiben ez nem következik be, azaz az érintett szövet apoptotikus aktivitása csökken, a károsodott DNS-sel rendelkező sejtek szaporodása révén adott a rosszindulatú daganat kialakulásának lehetősége.

A praeblastomatosus laesiók egyik példája az orális leukoplakia. Ennek a megbetegedésnek klinikailag és patológiailag is több súlyossági fokozata van. A legsúlyosabb klinikai képet az erythroleukoplakia mutatja, melynek megfelelően kórszövettanilag súlyos dysplasiát figyelhetünk meg. Megállapítottuk, hogy a leukoplakiás folyamatban résztvevő hámsejtek apoptotikus aktivitása súlyos dysplasia esetén a legmagasabb. Az apoptózist, ill. a sejtproliferációt befolyásoló gének közül a Ki67, a p53 és a p63, a cyclin D1 expressziója a folyamat súlyosságával párhuzamosan fokozódik, míg a p27 kifejeződése csökken. Mindezek alapján újabb prognosztikai lehetőséghez jutottunk a leukoplakia rosszindulatú daganattá történő átalakulásának prognosztizálását illetően (10, 11).

Rosszindulatú daganatok

Prostatarák

A prostatarák a hormonérzékeny daganatok prototípusa. E tumorok több mint 80%-a androgénfüggő, tehát az androgén hormonok megvonása (castratio), ill. antiandrogén terápia hatására a daganatok növekedésének lassulása vagy teljes leállása következik be. Ennek hátterében a sejtproliferáció gátlása és az apoptotikus sejtpusztulás fokozása áll.

Totális androgén blokád (TAB) alatt álló prostatarákos betegek prostatabiopsziáit vizsgáltuk, a kezelés különböző időpontjaiban. A vizsgálatok során tanulmányoztuk az apoptózis- és mitózisindexet, a p53, bcl2, Ki67 kifejeződését. Megállapítottuk, hogy minél differenciáltabb a daganat kórszövettani szerkezete, annál kisebb a spontán keletkező apoptózis aránya. A legkevés-

bé differenciált prostatarákokban figyeltük meg a legmagasabb spontán apoptózis-indexet. Antiandrogén kezelésben részesült betegek esetében azonban a magasán differenciált tumorok mutatták a legnagyobb apoptózisindex-emelkedést a kezelés hatására (19)

Ismételt prostatabiopsziák segítségével kimutattuk, hogy a Ki67/apoptózis-arány változása 3,5 hónapos TAB hatására predikciós faktornak tekinthető a kezelés hatékonyságát illetően (17). Igazoltuk az LH-RH-agonisták prostataráksejtekre kifejtett direkt hatását, mely fokozott apoptózisban és csökkent mitotikus aktivitásban nyilvánul meg. Ez a jelenség már a kezelés első 24 órájában észlelhető, de csak a daganatszövet egyes sejt-csoportjaira érvényes. Ezek a sejtek rendelkeznek immunhisztokémiailag kimutatható GnRH-receptorokkal. A kezelésre nem reagáló sejtek a betegség relapsusának alapját képezhetik (16).

Gyermekkori acut lymphoid leukaemia

A gyermekkori acut lymphoid leukaemiák kezelésében használatos egyik protokoll szerint a kezelést egy hetes prednisolon-monoterápia vezeti be. A prednisolon, ill. glucocorticoid adagolásának hatására a lymphoid sejtek apoptózisa következik be, ami felhasználható a kezelés hatékonyságának előrejelzésére is. Vizsgálatsorozatunkban kimutattuk, hogy az apoptózisindex emelkedése a peripheriás lymphoblastok esetében már az első prednisolon tabletta bevétele után 6 órával is megfigyelhető, és a kezelés megkezdése után 24 órával is fennáll. Az apoptózis arányának fokozódása azokban az esetekben következik be, melyek a későbbiek során jól reagálnak a komplex terápiára. Pozitív összefüggést tudunk kimutatni a prednisolonkezelés és az apoptózisfokozódás, valamint az apoptózis fokozódása és a betegség jobb terápiás válasza között (6, 13). Az apoptózisarány vizsgálata az acut lymphoid leukaemia kezelésének első fázisában több gyógyintézet rutin eljárásává vált.

Colorectalis carcinoma

A colorectalis carcinomák kiegészítő kezelésében, a műtéti kezelést megelőzően vagy azt követően kiterjedten alkalmaznak különböző citosztatikumokat, így az 5-fluorouracilt (5-FU). A betegség prognózisát hosszú távon befolyásolhatja az a körülmény, hogy a daganat milyen mértékben reagál a citosztatikus terápiára. Vizsgálataink során rectumcarcinomában szenvedő betegek diagnosztikus biopsziás anyagában vizsgáltuk az apoptózis- és mitózisindexet, valamint a p53 és bcl2 kifejeződését. A biopsziát követően a betegek 4 napon át részesültek 5-FU-kezelésben, majd a biopsziát követő 7. napon műtét történt. A műtéti anyagból ugyanazokat a vizsgálatokat végeztük el, melyeket a biopsziás anyag esetében fentebb említettünk. A betegek a műtét után tartósan 5-FU-kezelésben részesültek. A betegek hosszú távú klinikai követése során megfigyeltük, hogy a daganatos betegség prognózisa azon

esetekben volt kedvezőbb, melyekben a rövid távú 5-FU-kezelés nyomán az apoptózisindex emelkedett. Ugyanakkor nem találtunk értékelhető változásokat a p53 és bcl2 kifejeződésében (2, 3).

Emlőrák

Ductalis emlőrákok core-biopsziás módszerrel nyert részleteiben vizsgáltuk a mitózis- és apoptózisindex mértékét, továbbá az ösztrogénreceptor és a HER2-receptor jelenlétét. A biopszia után a betegek egy hetes Tamoxifen-kezelést kaptak, majd elvégezték a daganatok műtéti eltávolítását. A műtéti anyag kórszövettani feldolgozása során megismételtük a fent jelzett vizsgálatokat, és regisztráltuk a rövid távú Tamoxifen-kezelés nyomán bekövetkező változásokat. Statisztikailag egyedül az apoptózisindexben jelentkező értékelhető emelkedés (1). A betegek hosszú távú követése adhat felvilágosítást arra vonatkozóan, hogy az apoptózisindex emelkedése a rövid távú Tamoxifen-kezelés után jelenti-e a további Tamoxifenkezelésre adott kedvezőbb választ.

Mesopharyngealis carcinoma

A mesopharyngealis laphámrákok igen rossz prognózisúak, még agresszív komplex kezelés ellenére is. A sugárterápia megkezdése előtt nyert biopsziás minták kórszövettani vizsgálata során meghatároztuk az apoptózis- és mitózisindexet, továbbá a p53 kifejeződését. A sugárterápia megkezdése után 2 nappal a betegek tájékoztatása és beleegyezése alapján újabb biopszia történt. A második biopszia felhasználásával is elvégeztük a fenti vizsgálatokat, és a két biopszia során nyert adatokat egymással összevetettük. A betegeket hosszú távon követtük. Megállapítottuk, hogy a rövid távú sugárkezelés hatására egyedül az osztódási indexben következett be változás, ami csökkenésben nyilvánult meg. Az osztódási aktivitás sugárkezelés hatására bekövetkezett csökkenése egyúttal kedvezőbb prognózist is jelentett (12).

Neuroblastoma és PNET

A neuroblastomák retinolsav-kezelését arra a tényre alapozzák, hogy ezen tumorok sejtei rendelkeznek retinolsav-receptorral (RAR)(4). A fenti megállapítást in vitro vizsgálatok alapján tették. Saját megfigyeléseink in vivo, biopsziás anyagokon végzett tanulmányokon alapulnak. A biopsziák nagyobb része neuroblastomában, kisebb része primitív peripheriás neuroectodermális tumorban (PNET) szenvedő gyermekekből származott. A biopsziás anyagok kórszövettani vizsgálata során elvégeztük az apoptózis- és mitózisindex meghatározását, továbbá a rendelkezésünkre álló RAR-ellenes antitest felhasználásával a RAR immunhisztokémiai és Western blot kimutatását hajtottuk végre.

Megállapítottuk, hogy neuroblastomákban átlagosan alacsony apoptózisarány figyelhető meg.

Immunhisztokémiai és Western blot-vizsgálattal egybehangozón kimutattuk, hogy RAR csak az esetek valamivel több mint felében található. Statisztikailag pozitív összefüggést találtunk a RAR-pozitivitás és a viszonylag magasabb apoptózisindex között. PNET esetében gyakoribb volt a RAR-pozitivitás, és valamennyi PNET-mintában emelkedett volt az apoptózisindex. A RAR-pozitív tumor miatt szenvedő betegeket retinolsav-kezelésben részesítik. A betegek hosszú távú követése folyamatban van (4).

Gliomák

A gliomák, különösen a kifejezetten malignus formák kezelésében a sebészi eljárások ma is a legeredményesebbek. A racionális gyógyszeres kezelés célpontjait vizsgálva arra igyekeztünk választ kapni, hogy a mitotikus aktivitáson kívül van-e különbség az egyes gliomatípusok között az apoptotikus aktivitást és a p53-expressziót illetően. Műtéti úton eltávolított astrocytomákat, oligodendrogliomákat és glioblastoma multiforme szövetet tanulmányoztunk a fenti szempontok szerint. Megállapítottuk, hogy magas malignitású (A3) astrocytomákban és glioblastoma multiforme-kben erősen megemelkedett az apoptotikus sejtek aránya az alacsonyabb malignitású gliomákhoz képest. A p53-expresszió az A3 astrocytomákban volt a legmagasabb, a glioblastoma multiforme csak csökkent mértékben mutatott pozitívítást az immunhisztokémiai kimutatható mutáns p53-ra nézve. Ez a körülmény utalhat a p53 további mutációjára glioblastoma multiforme esetében (14). A fenti eredmények értelmezése, elsősorban terápiás szempontból még további vizsgálatokat igényel.

Tüdőrák

Ismeretes a tüdőrák különböző szövettani formáinak eltérő érzékenysége a gyógyszeres- és a sugárterápiával szemben. Tájékozódó vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a tüdő laphámrákja, adenocarcinomája, ill. kissejtes rákja a spontán apoptózis vonatkozásában is különbözik egymástól. A legalacsonyabb apoptózisindexet laphámrákok esetében találtuk. Viszonylag magasabb apoptózisindexet határoztunk meg adenocarcinomákban. A kissejtes tüdőrák mutatta a legmagasabb spontán apoptotikus aktivitást (8).

Pajzsmirigy-adenoma és pajzsmirigyrák

A pajzsmirigy-adenomák és a follicularis, ill. papillaris pajzsmirigyrákok egyaránt alacsony apoptotikus aktivitást mutatnak. Tanulmányoztuk follicularis adenomák, follicularis és papillaris carcinomák spontán apoptózisindexét. Még carcinomák esetében is 1% körüli értéket találtunk. Az apoptózist befolyásoló gének közül immunhisztokémiai vizsgálattal határoztuk meg a p53, a bcl2 és a bax kifejeződését. Azt találtuk, hogy a p53 kifejeződése a follicularis carcinomákban a legmagasabb. Ezt követik a papillaris carcinomák, míg a

follicularis adenomákban igen alacsony p53-expresszió található. Ezzel szemben a bcl2- és érdekes módon a bax-expresszió follicularis adenomákban magas, míg a follicularis és papillaris carcinomákban emelkedett. A bcl2 és a bax co-expressziója összhangban lehet azzal a ténnyel, hogy az adenomákban mind a sejtproliferáció, mind az apoptózis alacsony szinten van.

A gyakorlati differenciáldiagnosztika szempontjából figyelemre méltó a p53 és a bcl2 egymással ellentétes viselkedése, mely a follicularis adenomák, ill. follicularis carcinomák egymástól való elkülönítését segítheti elő (5).

Mellékpajzsmirigy-hyperplasia, -adenoma és -carcinoma

A mellékpajzsmirigy rákja rendkívül ritka. A hyperparathyreosissal járó kórképek hátterében részben mellékpajzsmirigy-hyperplasia, részben mellékpajzsmirigy-adenoma áll. A hyperplasia lehet primer – ez a ritkább eset, de legtöbbször krónikus veseelégtelenség szövődményeként alakul ki. Az adenomák legtöbb esetben primer laesiók, de előfordul veseelégtelenség következtében kialakuló adenoma is.

Sebészileg eltávolított hyperplasiás és daganatos mellékpajzsmirigyek vizsgálatát végeztük, a sejtproliferációs paraméterek és a sejtproliferációban, ill. sejthalálban szerepet játszó génproduktumok tanulmányozása céljából. Összesen 125 beteg mellékpajzsmirigyét távolították el, hyperparathyreoidosis klinikai jelei miatt. Hyperplasiát 62, adenomát 60, rákot 3 esetben találtunk. Vizsgáltuk a fősejt/világos sejt-onkocytá arányt, az osztódási- és apoptózisindexet.

Valamennyi laesióban jelentős volt az oncocyták aránya. Hyperplasiában 0–2%, adenomában 2–3% volt az apoptózisindex, míg carcinomában 3–5%-nak bizonyult mind az apoptózis, mind az osztódási index. Mutáns p53-pozitivitást találtunk néhány hyperplasia és több adenoma sejteinek cytoplasmájában, néhány adenoma és a carcinomák sejteinek magjában. Mind a daganatok, mind a hyperplasiák esetében kimutatható volt a bcl2 és bax az oxyphil sejtek (oncocyták) cytoplasmájában, s változó gyakorisággal és intenzitással a fősejtekben és világos sejtekben is.

A fentiek a mellékpajzsmirigysejtek erős anti-proliferatív szabályozó mechanizmusára utalnak. Ebben valószínűleg jelentősége van a sejtproliferáció és sejthalál szabályozásában fontos szerepet játszó géntermékek együttes kifejeződésének, elsősorban a mitochondriumokban dús oncocytákban (15).

Következtetések

Saját vizsgálataink és az irodalomban található adatok arra utalnak, hogy az apoptózis jelenségének tanulmányozása új utakat nyitott meg a daganatok pathogenesisének, prognosztikájának és terápiájának vonatkozásában. Kezdenek letisztulni a korábban leegyszerűsített fogalmak, és kiderült, hogy az apoptózis szempontjából is külön

kell tárgyalnunk minden daganattípust, beleértve egyes szervek eltérő szöveti szerkezetű daganatait. Elkülöníthetők olyan daganatok, melyekben külső, terápiás behatásra magas apoptózisarány indukálható. Más tumorok ilyen szempontból rezisztensnek tekinthetők. Az apoptózisindukációval szemben még a korábban érzékeny tumor is rezisztenssé válhat, amikor olyan daganatsejtek kerülnek túlsúlyba, amelyek receptorok hiányában vagy más, védekező mechanizmusok miatt már nem válaszolnak apoptózissal a terápiásnak szánt beavatkozásra.

Azt sem szabad elfelejtenünk, hogy a sejthalál arányát mindig össze kell vetnünk a sejtosztódás arányával, hiszen a daganat növekedésének, vagy stagnálásának, ill. visszafejlődésének mértékét a sejtproliferáció és a sejthalál aránya szabja meg.

A fenti problémák ellenére előre jelezhető, hogy az apoptózisindex, továbbá az apoptózisban szerepet játszó gének expressziójának vizsgálata a jövőben egyre inkább részévé válik a daganatok kórszövettani jellemzésének.

Irodalom

1. Farczádi E, Kaszás I, Baki M, Szende B. Changes in apoptosis, mitosis, Her-2, p53 and bcl2 expression in breast carcinomas after short-term tamoxifen treatment. *Neoplasma* 40:101-103, 2002
2. Farczádi E, Kaszás M, Baki M, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, bcl2 and p53 expression in rectum carcinomas after short-term cytostatic treatment. *Ann NY Acad Sci* 1010:780-783, 2003
3. Farczádi E, Szántó J, Kaszás I, et al. Changes in apoptotic and mitotic activity in rectal carcinoma after short-term cytostatic therapy as possible predictive factors. *Neoplasma* 46:219-223, 1999
4. Farid P, Babosa M, Hauser P, et al. Spontaneous apoptosis and retinoic acid receptor incidence in neuroblastomas and peripheral neuroectodermal tumors. *Ped Hematol Oncol* 17:315-321, 2000
5. Farid P, Gomba S, Péter I, Szende B. Bcl2, p53 and bax in thyroid tumors and their relation to apoptosis. *Neoplasma* 48: 299-301, 2001
6. Garami M, Bocsi J, Kovács G, et al. Apoptotic ratio as an early prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in children. *Medical Ped Oncol* 33:269, 1999
7. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972
8. Kogan EA, Cherniaev AL, Chuchalin AG, et al. Morphological and molecular-genetic features of lung carcinoma in persons who worked at RF nuclear facilities and lived in RF territories polluted after the Chernobyl accident. *Arkh Patol* 1:22-26, 1999
9. Kopper L, Peták I. Daganatok és apoptózis. In: Kopper L, Fésüs L. *Apoptózis*, Medicina, Budapest 2002, pp. 383-414
10. Kövesi Gy, Szende B. A leukoplakia súlyosságával párhuzamosan változik az apoptózis- és mitózisindex, valamint a p53 és Ki-7 kifejeződése. *Magyar Onkológia* 46:333-338, 2002
11. Kövesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology* 65:331-336, 2003
12. Kraxner H, Tamás L, Sáfrány G, et al. Apoptotic and mitotic activity in squamous cell carcinoma cells after combined modality treatment with γ -irradiation and dibromodulcitol. *Cell Biol Int* 25:599-606, 2001
13. Schuler D, Szende B. Apoptosis and acute lymphocytic leukemia in children. *Ann NY Acad Sci* 824:28-37, 1997

14. Sipos L, Szegedi Z, Fedorcsák I, et al. Apoptosis and p53 expression in human gliomas. *Pathol Oncol Res* 4:267-270, 1998
15. Szende B, Farid P, Végső G, Perner F. Apoptosis and p53, bcl-2 and Bax gene expression in parathyroid glands of patients with hyperparathyroidism. *Pathol Oncol Res* 10:98-1034, 2004
16. Szende B, Lovász S, Farid P, Romics I. Apoptosis in prostate carcinomas after short-term treatment with decapeptyl. *Ann NY Acad Sci* 1010:784-788, 2003
17. Szende B, Romics I, Minik K, et al. Repeated biopsies in evaluation of therapeutic effects in prostate carcinoma. *Prostate* 49:93-100, 2001
18. Szende B. Az apoptózis jelentősége az emberi megbetegedésekben. *LAM* 10:386-392, 2000
19. Szende B, Romics I, Torda I, et al. Apoptosis, mitosis, p53, bcl2, ki-67 and clinical outcome in prostate carcinoma treated by androgen ablation. *Urol Int* 63:115-119, 1999
20. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: An overview of the process and its relevance in disease. In: Kaufmann, SH. *Apoptosis, Advances in Pharmacology*, Vol 41, Academic Press, San Diego, 1997. pp. 1-34