

Speciální seminář z biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

FN Brno, PŘF a LF MU Brno

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.

MOÚ Brno, PŘF MU Brno

2013

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Seminář 5

Angiogeneze, apoptóza, metastázování

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

FN Brno, PřF a LF MU Brno

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.

MOÚ Brno, LF a PřF Brno

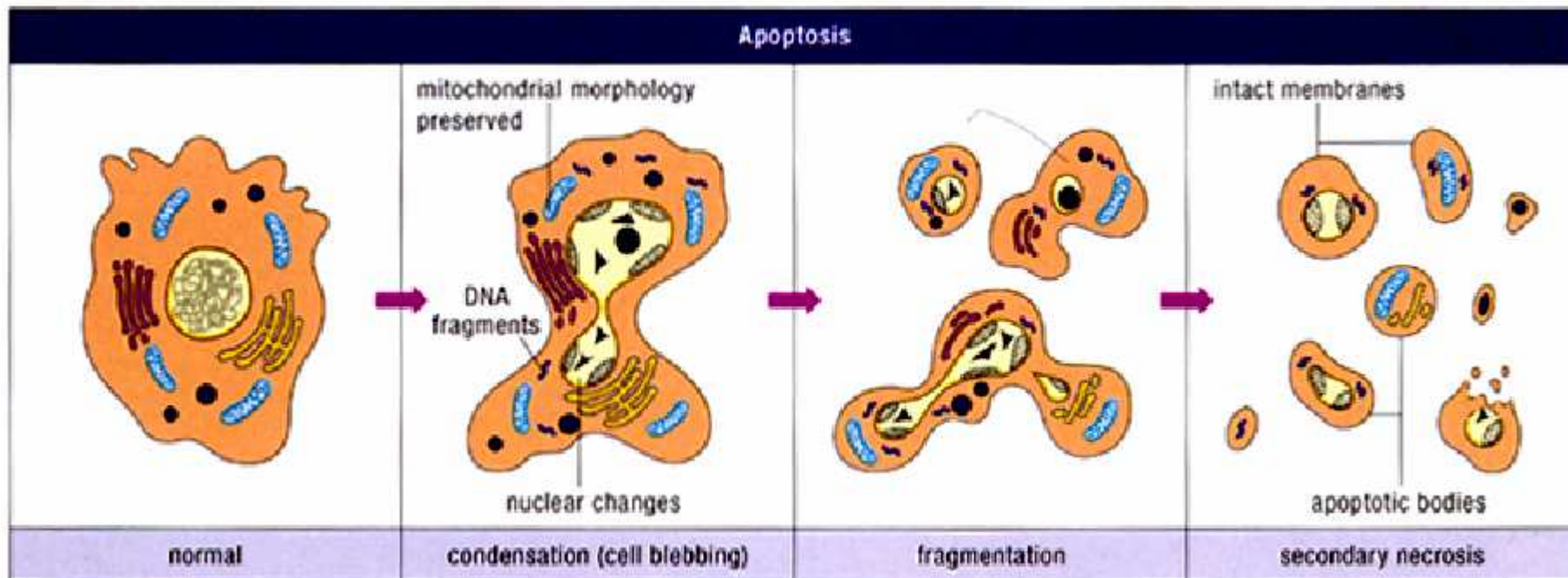
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

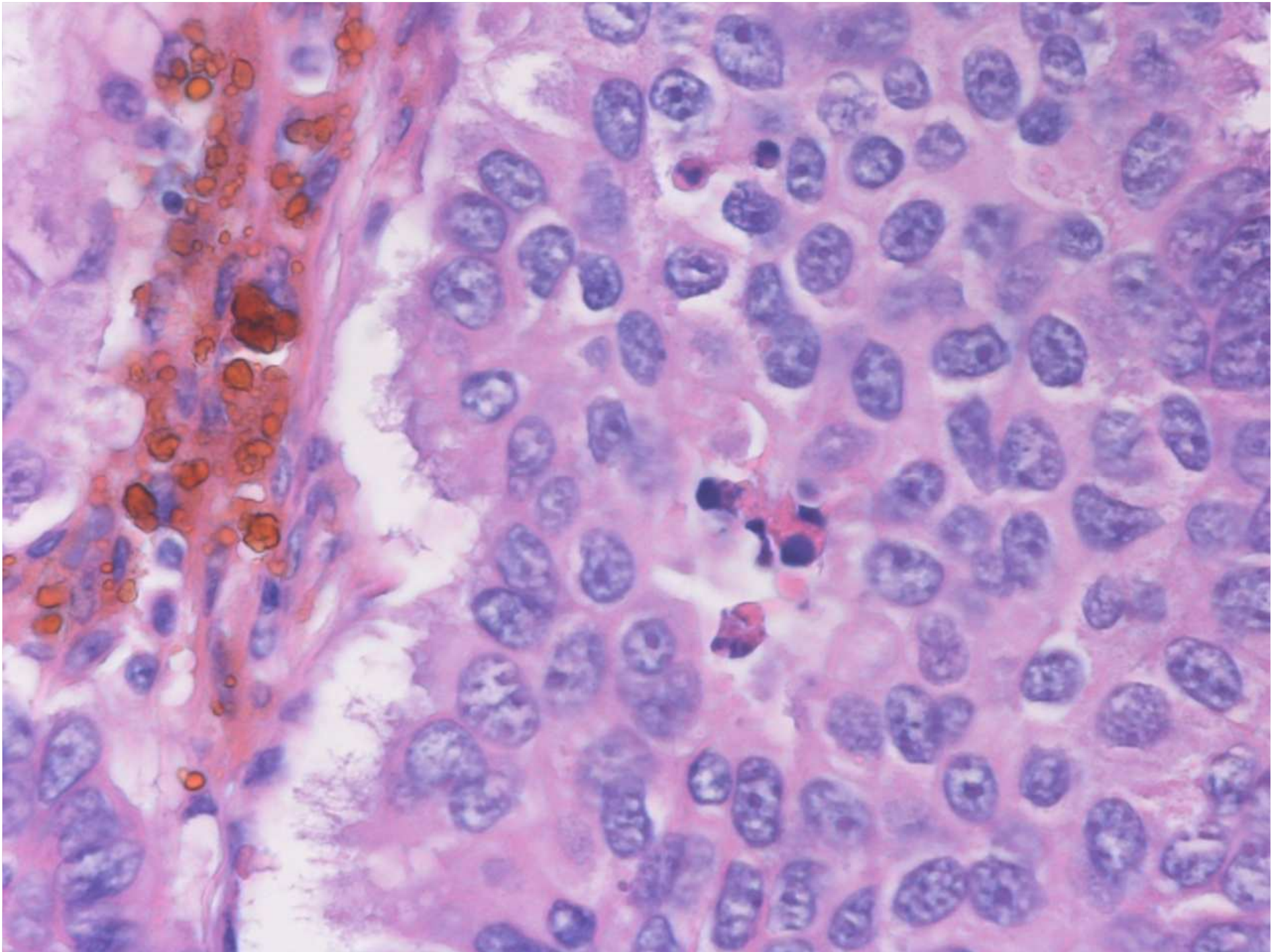
Apoptóza

Některé znaky: kondenzace buňky a jádra, kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a rozpad buňky na apoptotická tělíska, nenahodilá fragmentace DNA (žebřík na ELFO), uvolňování specifických faktorů z mitochondrií do cytoplasmy, aktivace kaskád kaspáz, ..

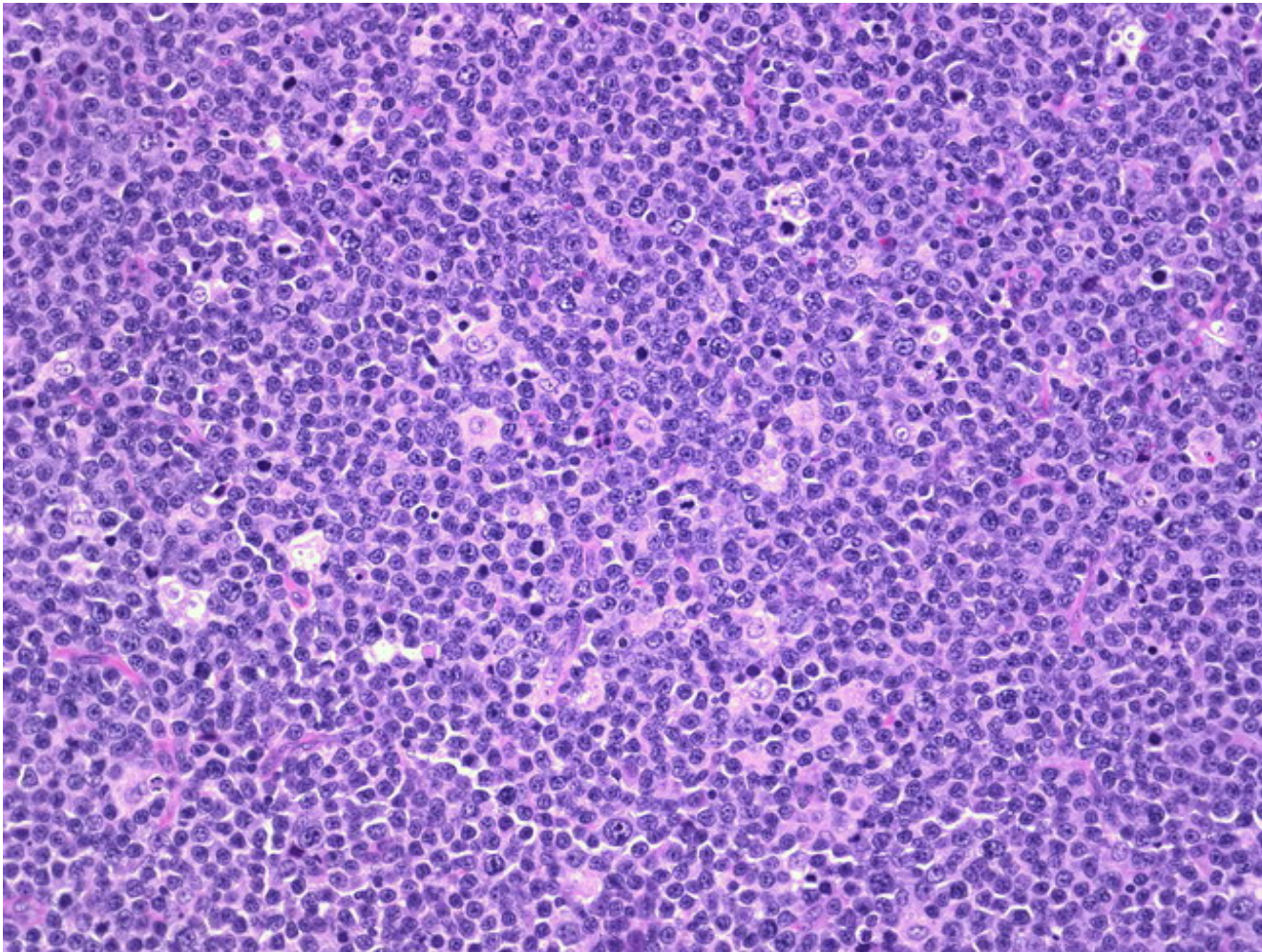


Měření apoptózy

- FCM fyzikálních změn (změna velikosti jádra, DNA content)
- TUNEL (TdT navazuje na konce DSB dUTP*)
- Annexin V (váže se na fosfatidylserin, který je při apoptóze externalizován)
- Exprese TTG - tkáňové transglutaminázy
- Aktivní (štěpená) forma Caspase 8,9,3
- Štěpné produkty účinků kaspáz (M30 - fragmenty CK 18)



Burkitův lymfom: typický obraz „hvězdného nebe“

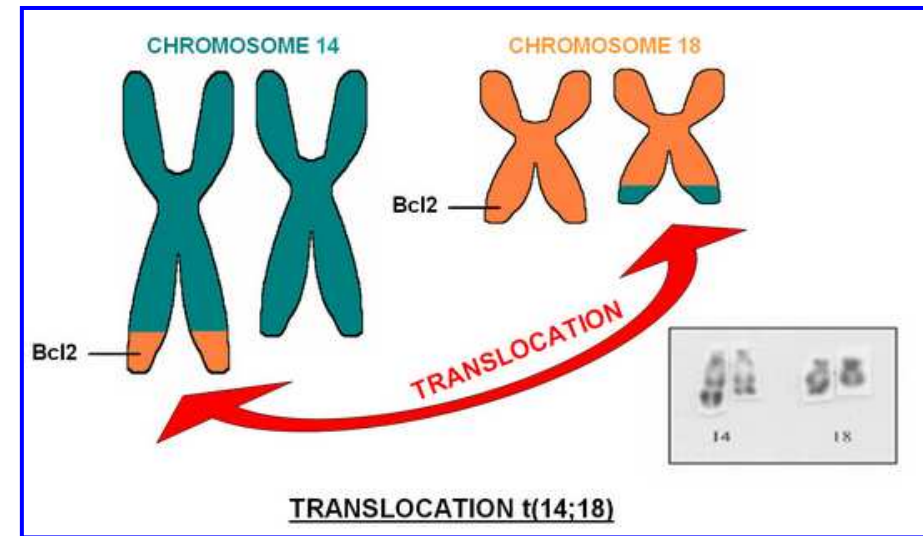
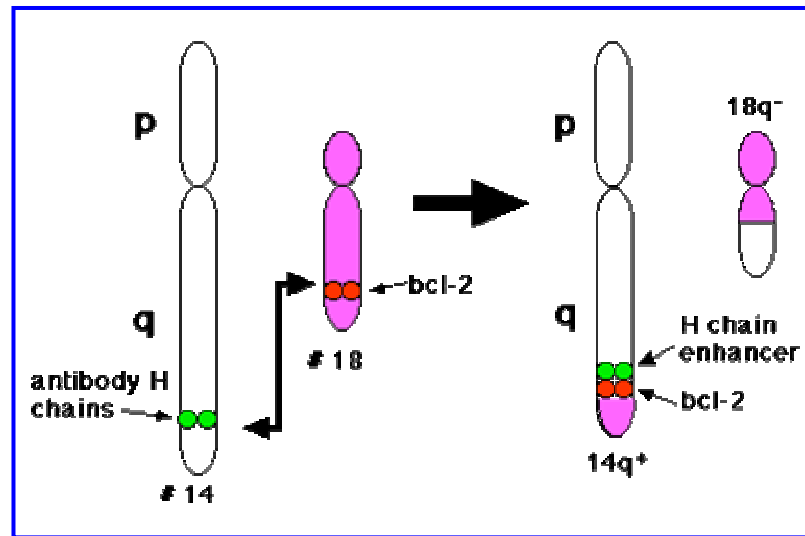


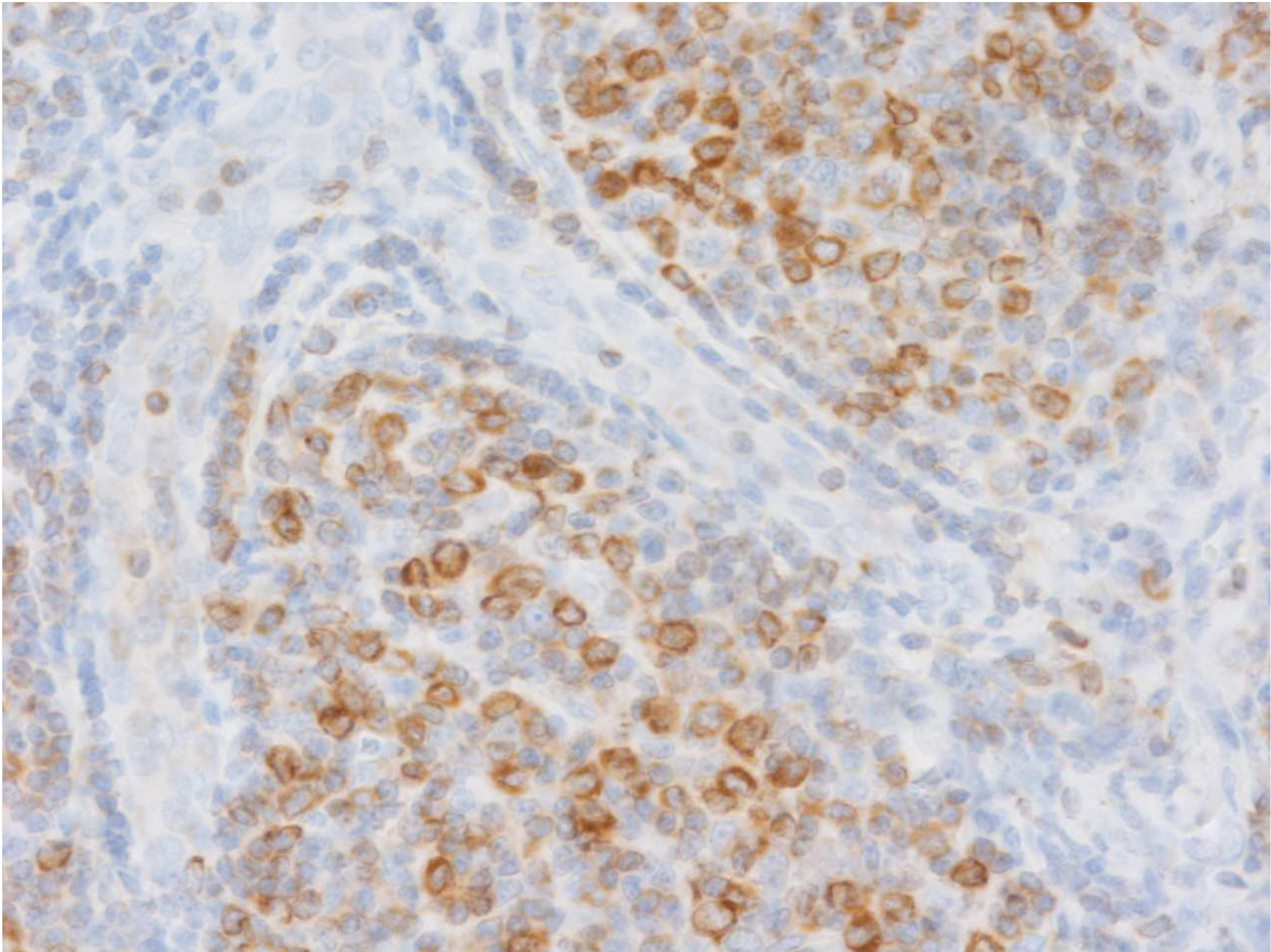
- Buňky jsou vysoce mitoticky i apoptoticky aktivní (Ki67-positivní, BCL2-negativní)

- Makrofágy s fagocytovanými apoptotickými tělísky mohou tvořit obraz „hvězdného nebe“.

BCL2: B-cell leukemia/lymphoma 2

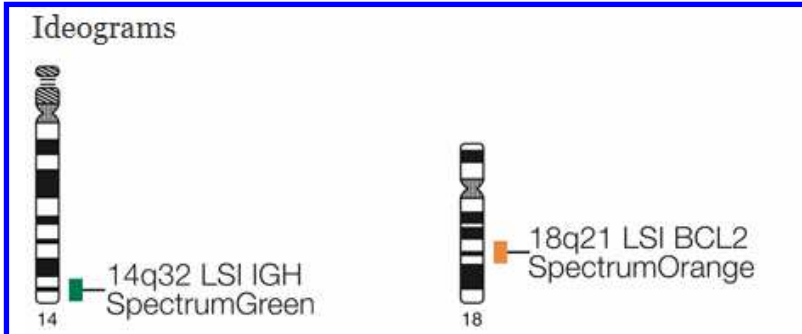
- První apoptotický gen objevený v savčích buňkách díky své roli v maligní přeměně B-buněk. Objeven v r. 1984 (*Tsujimoto*) jako produkt translokace t(14;18) u b. linie B-ALL
- Poprvé popsána **nová třída proto-onkogenů**: ne aktivátory buněčné proliferace, ale **represory buněčné smrti**.
- Folikulární lymfomy (+cca 30% DLBCL) často nesou translokaci t(14;18), ta vede k vysoké expresi *bcl-2*





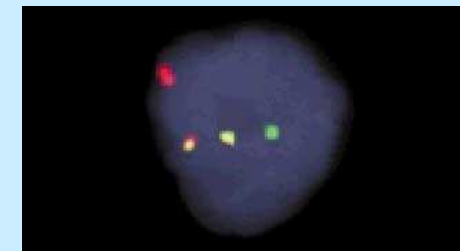
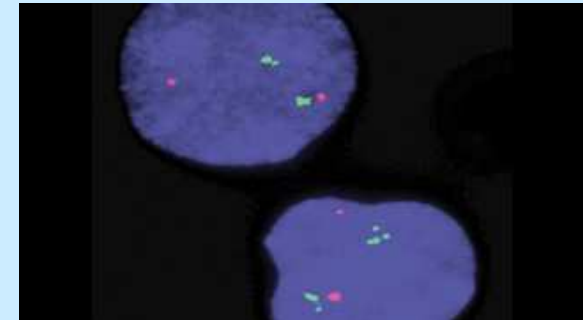
Detekce přestavby t(14;18)

Dual-color, Dual Fusion Translocation Probe

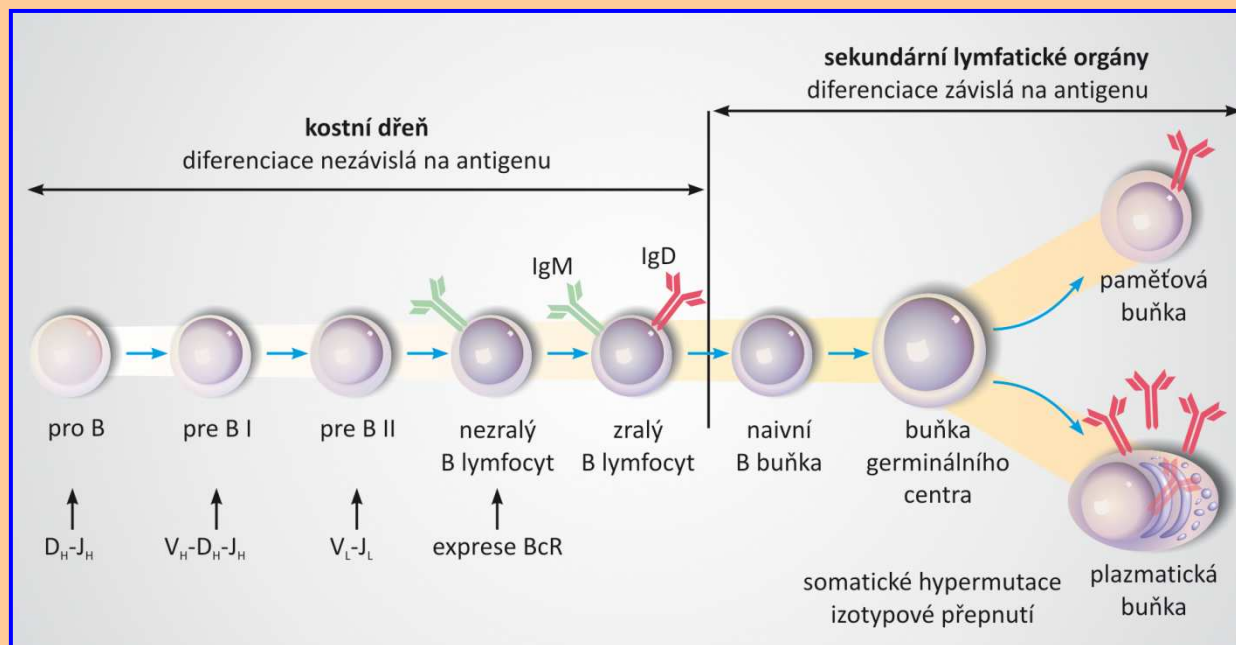


Výsledek hybridizace:

- Negativní buňky: dva zelené a dva oranžové signály (**2G + 2O**)
- Pozitivní buňky s reciprokou translokací t(14;18): jeden oranžový, jeden zelený, dva fúzní (**1O + 1G + 2F**)

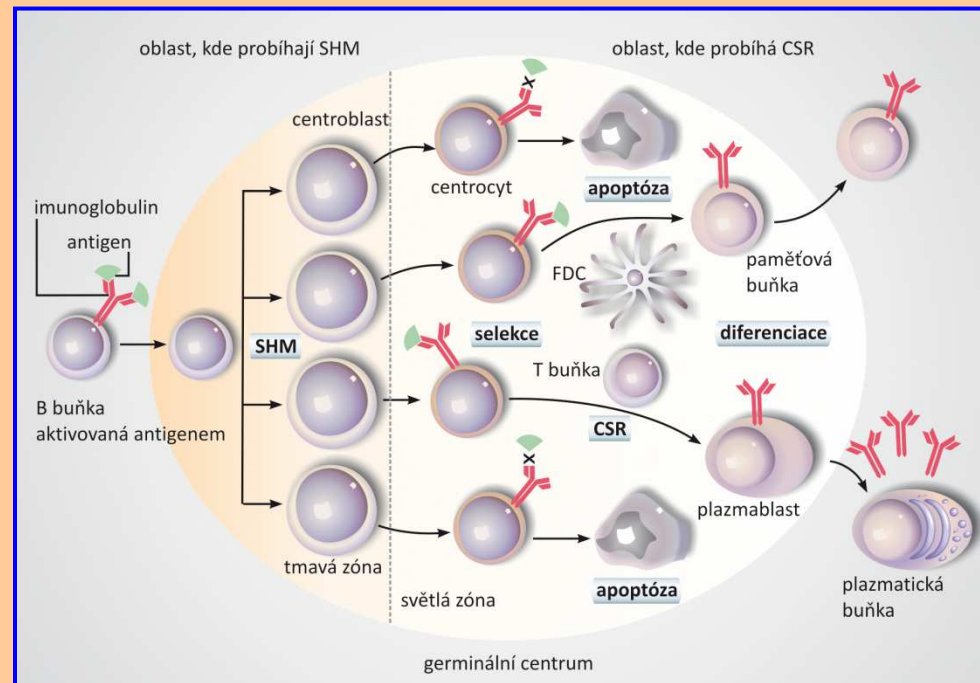


Vývoj B lymfocytů



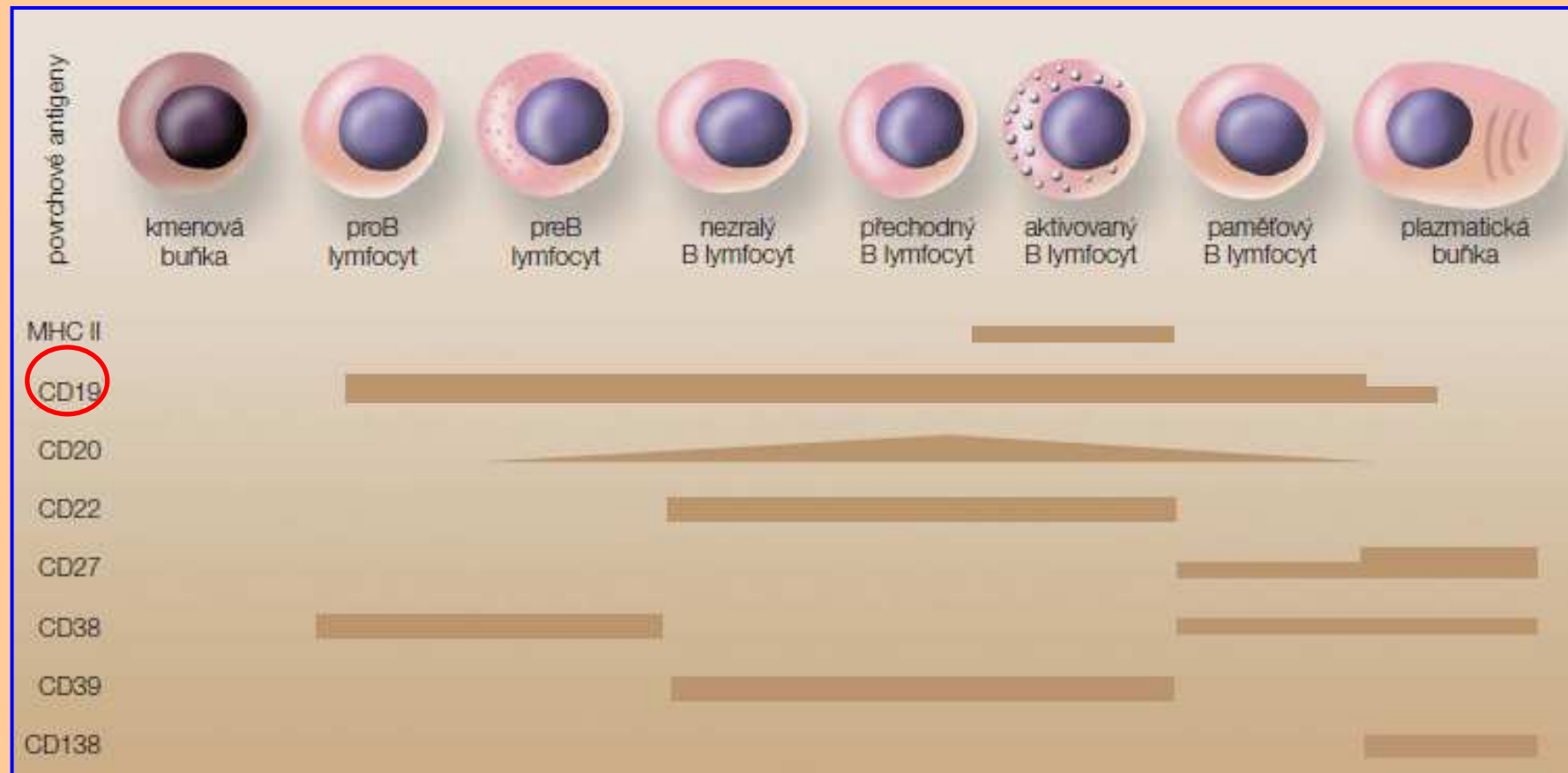
(1) Prekurzory B lymfocytů vznikají dělením pluripotentní hematopoietické kmenové buňky v **kostní dřeni**, kde - **bez přítomnosti antigenu** - probíhá první část vyžívání B lymfocytů. Dochází k přeskupování genových segmentů - V(D)J rekombinaci - nejdříve těžkých a pak lehkých řetězců. Nezralé B lymfocyty pak exprimují na svém povrchu přeskupený receptor a prodělávají selekční procesy: testována je autoimunita a schopnost přežít v periferních lymfatických tkáních.

Úloha germinálního centra v diferenciaci B lymfocytu

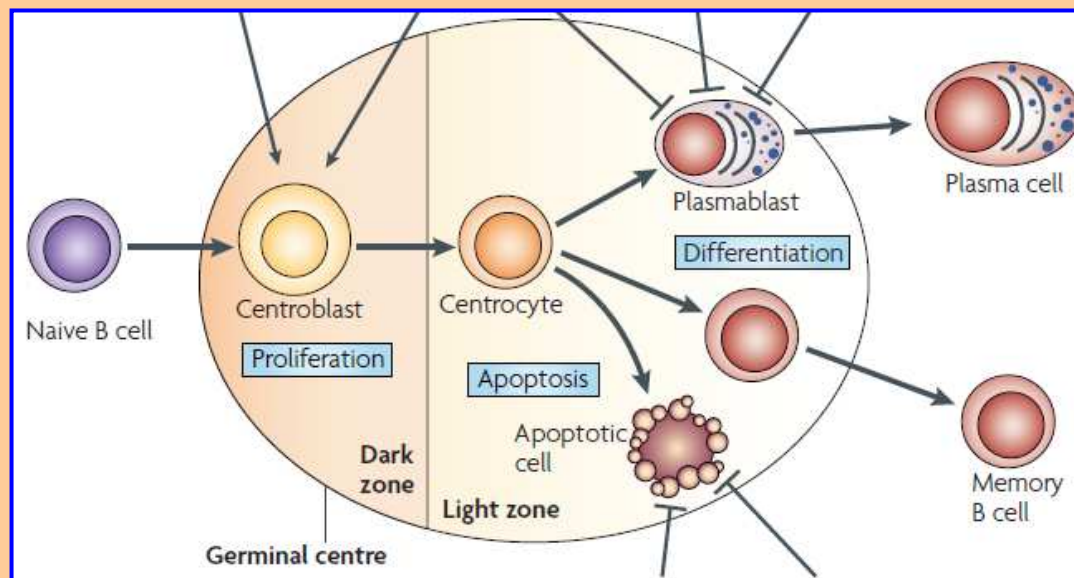


- Tmavá zóna GC je tvořena rychle se dělícími centroblasty, u kterých dochází k **somatickým hypermutacím**. Spojeno s intenzivní **proliferací**.
- Proliferující B lymfocyty vytlačují **klidové** buňky na periferii foliklu, kde tvoří tzv. plášťovou zónu.
- Světlá zóna je tvořena nedělícími se centrocyty, u kterých dochází k izotypovému přepnutí. Vznikají paměťové a plazmatické buňky. Spojeno s masivní **apoptózou** a **diferenciací**.

Exprese povrchových molekul B lymfocytů v průběhu jejich vyžívání



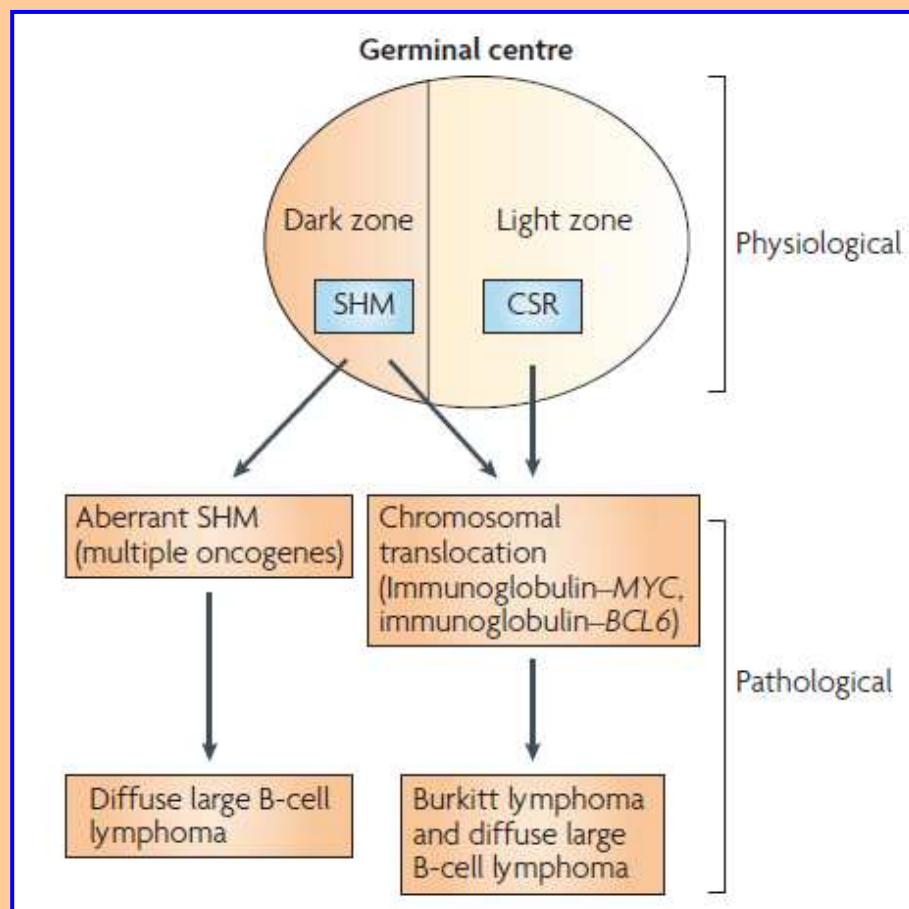
Úloha germinálního centra v diferenciaci B lymfocytu



Pro diferenciaci antigenem aktivovaných B buněk jsou typické:

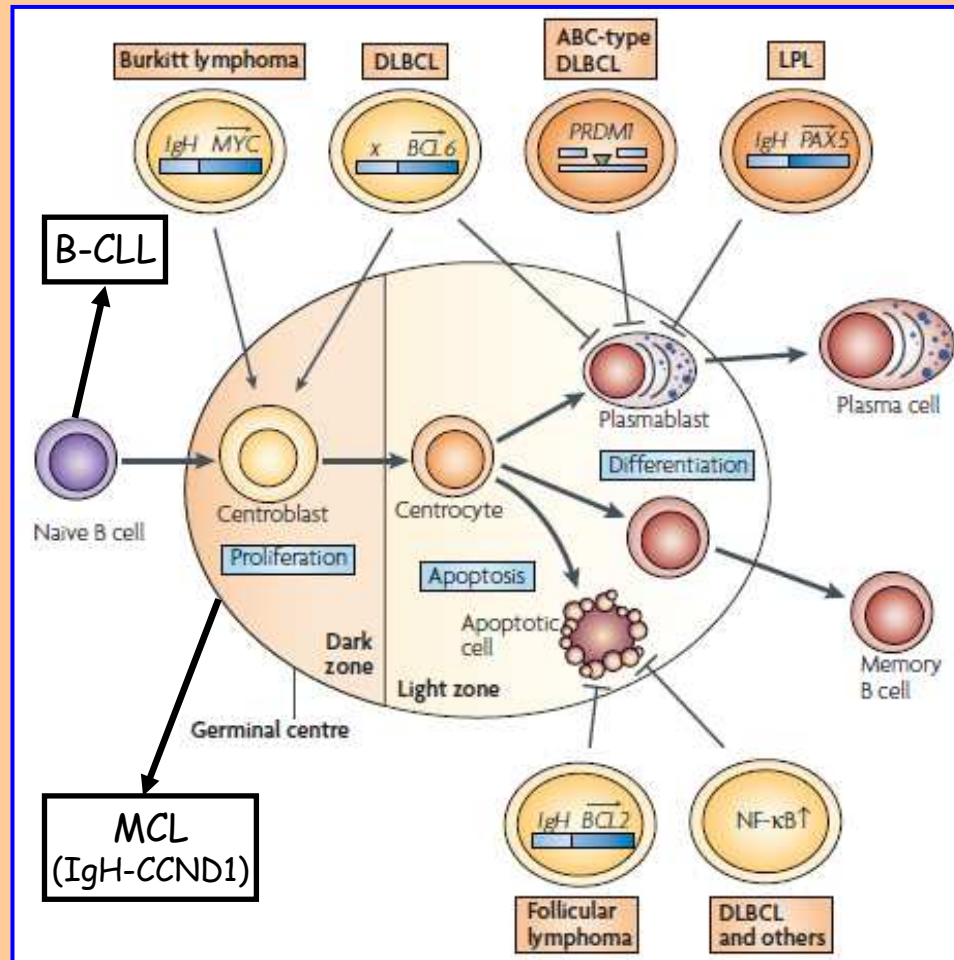
- výrazná proliferace
- snížená citlivost na poškození DNA (SHM, CSR)
- aktivní telomeráza
- silná vnímavost k apoptóze

Poškození DNA vznikající v germinálních centrech



- **Chyby** v procesech somatických hypermutací (SHM) a izotypového přepnutí (CSR), které jsou fyziologicky cíleny na imunoglobulinové řetězce, mohou:
- způsobit hypermutace nebo translokace některých protoonkogenů (*BCL6*, *c-myc*, *BCL2*, *CCND1*, *NF-κB* a dalších) a
- být **příčinou vývoje některých ne Hodgkinových lymfomů.**

Chyby v SHM a CSR vedou k vývoji lymfomů



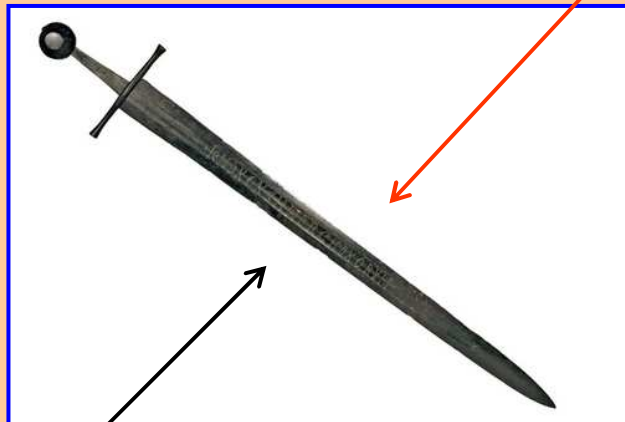
- Burkittův lymfom: t(8;14) \Rightarrow \uparrow *c-myc*
- Folikulární lymfom: t(14;18) \Rightarrow \uparrow *BCL2*
- Lymfom z buněk pláštěvé zóny: t(11;14) \Rightarrow \uparrow cyklin D1
- Difúzní velkobuněčný lymfom B buněk: aberace *BCL6*, *NF- κ B*, *PRDM1*, *c-myc*, ...
- Lymfoplasmacytoidní lymfom: t(9;14) \Rightarrow \uparrow *PAX5*

Přesahy: double-edged sword

~ advantage with liability

Výhoda

10¹¹ různých protilátek



Nevýhoda
riziko lymfomů

liability: přítěž, břímě,
překážka, odpovědnost,
závazek, náchylnost, povinnost,...

Lymfomy se dvěma zásahy (DHL)

- „Double-hit lymphomas“: Původně označení B lymfomů, které nesou zároveň přestavbu genu *c-myc* a genu *BCL2*; obecněji označení pro lymfomy s násobnými primárními genetickými změnami (*c-myc* plus další změna/změny - včetně triple-hit a quadruple-hit).
- Specifická skupina onemocnění s charakteristickým klinickým chováním: agresivní, rezistentní ke standardní terapii, s rizikem brzkého relapsu. (WHO 2008: BCLU - B-cell lymphoma, unclasifiable)
- Medián přežití odhadován mezi 4,5 a 18,5 měsíci, tedy výrazně kratší než BL a (IPI-) odpovídající DLBCL.
- Velmi pravděpodobně v současnosti podhodnocená (co do výskytu) skupina - možná více než 10 (14)% high-grade lymfomů.

Kazuistika

- muž/53let (J.B. nar. 1959)
- **22.8.2012** probatorní biopsie infiltrátu mezenteria při explorativní laparotomii na Chirurgickém oddělení Městské nemocnici Hustopeče (MUDr. Podskalan)
- klinická diagnóza: **Sarkoma** radicis mesenterii inoper. generalisatum
- diagnostikován (1. čtení) v Bioptické a cytologické laboratoři MDgK plus spol. s r.o. Újezd u Brna, prim. MUDr. Jarmila Klusáková, Ph.D., předběžný závěr: **lymfom**
- **září 2012** - 2. čtení: ÚPA FN Brno Bohunice

Výsledky ÚPA FN Brno Bohunice

Morfologické a imunofenotypické znaky mezi BL a DLBCL:

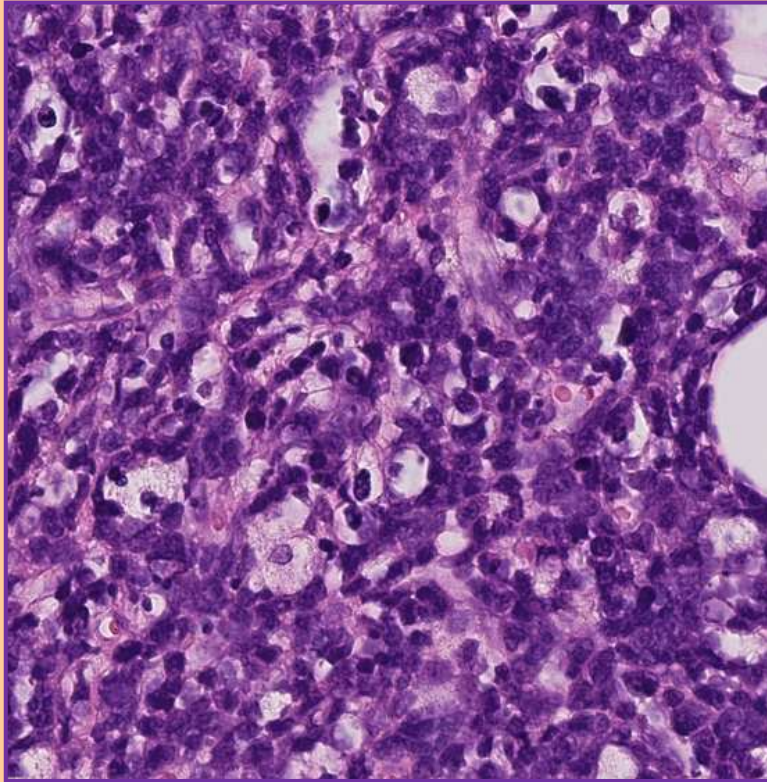
• morfologicky: četné mitózy a apoptózy, proliferační aktivita dle **Ki67 90-100%**, obraz hvězdného nebe (BL), populace nádorových buněk ale polymorfnější a morfologicky odpovídá více DLBCL: buňky středně velké a velké, často s vezikulárními jádry s prominujícími nukleoly

• IHC: **GC fenotyp** (CD10+, BCL6-) a silná difuzní pozitivita **BCL2**

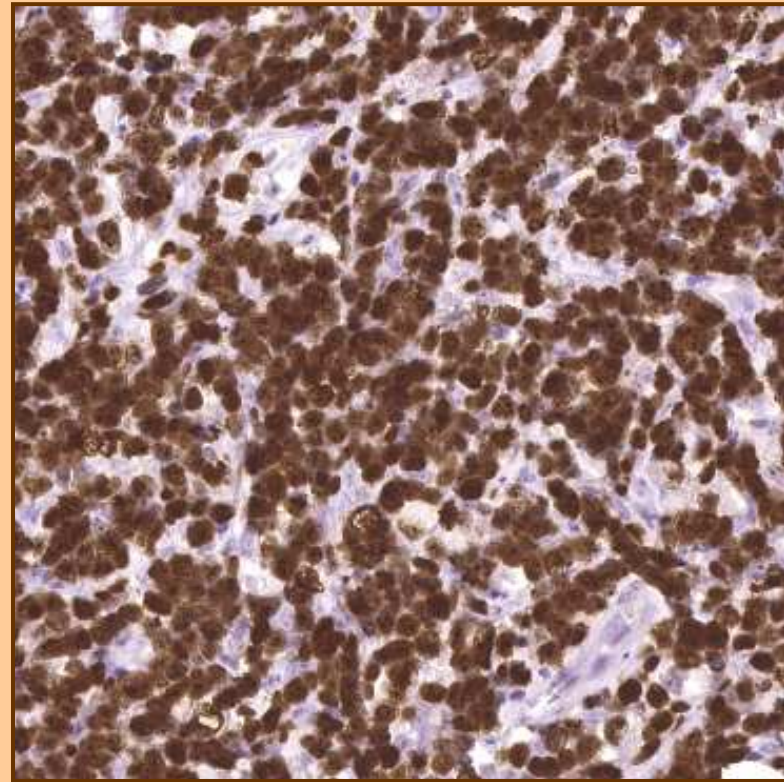
• závěr: neklasifikovatelný agresivní lymfom s rysy DLBCL a BL, nutné zvážit double-hit lymfom

• **LMP** - FISH: t(14;18), t(8;14), 8q24

Naše výsledky

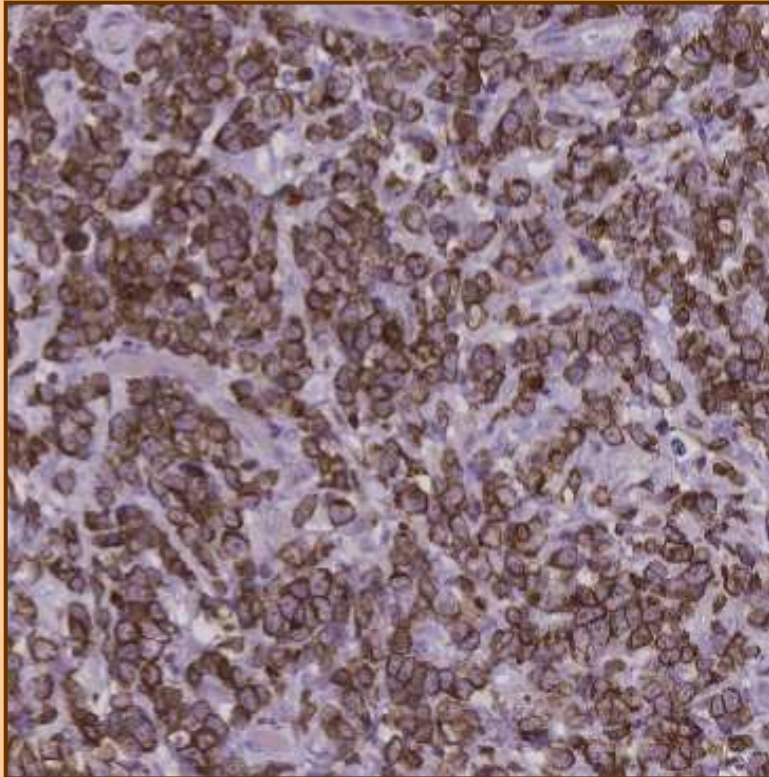


eosin hematoxylin: středně velké a velké buňky centroblastického vzhledu; úsekovitě naznačen obraz hvězdného nebe

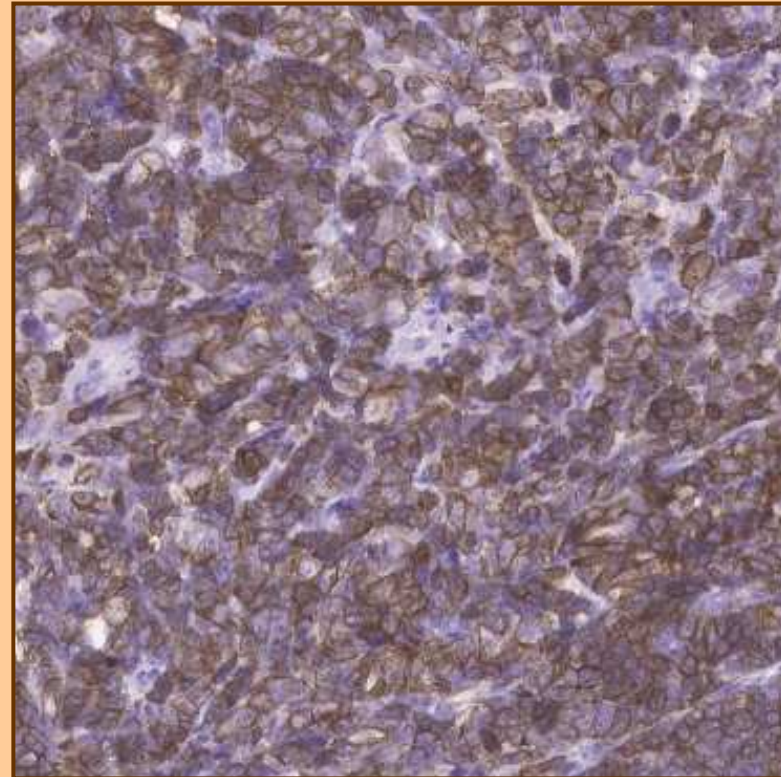


Ki67: proliferační aktivita extrémně vysoká, 95-100%

Naše výsledky

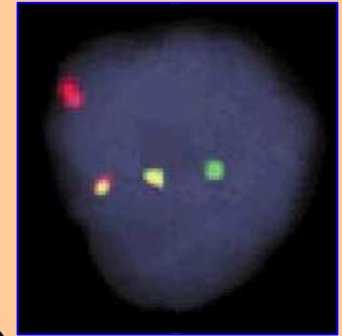


BCL2: difuzně pozitivní

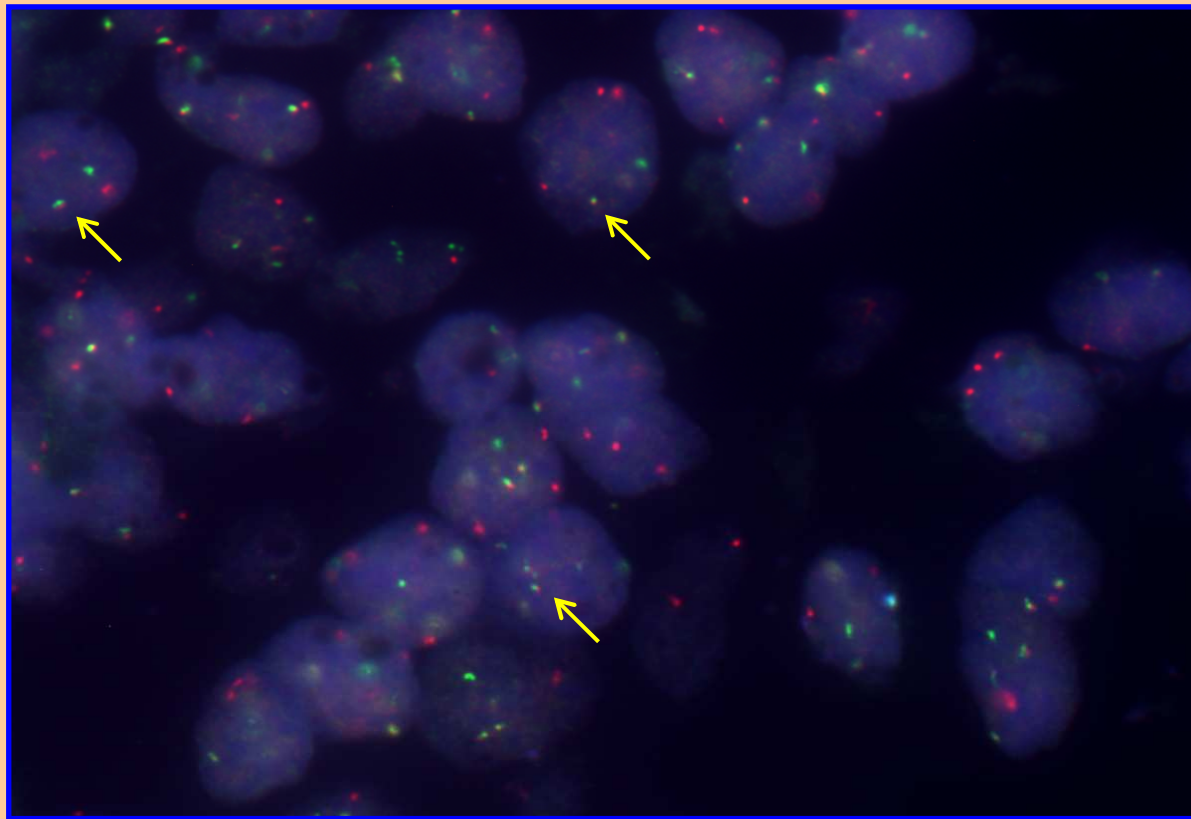


CD79a: difuzně silně pozitivní

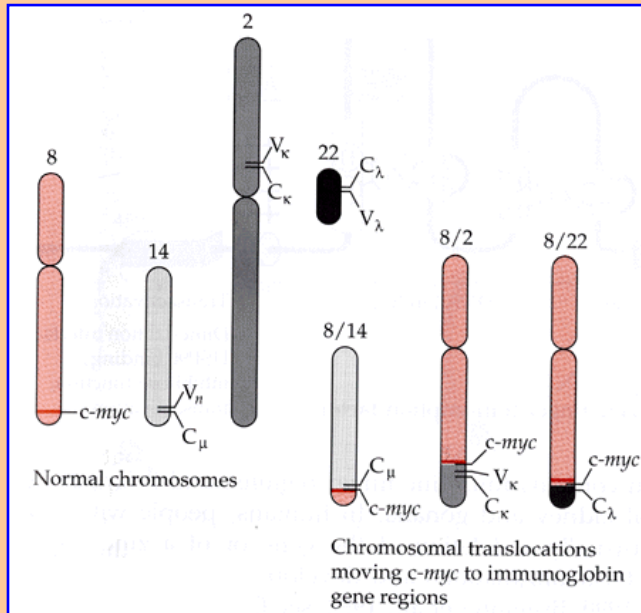
Výsledky LMP: FISH t(14;18)



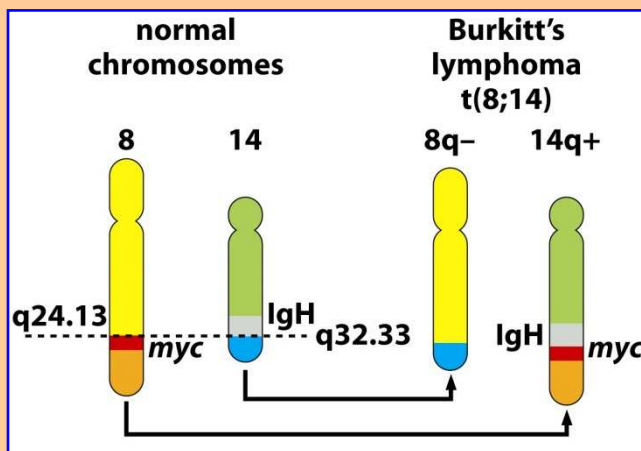
- t(14;18)(q32;q21) - IgH/BCL2 („dual fusion translocation probe“)
- Výsledek: **77%** jader s translokací, tj. pozitivní \Rightarrow vysoká exprese BCL2



c-myc a Burkittův lymfom



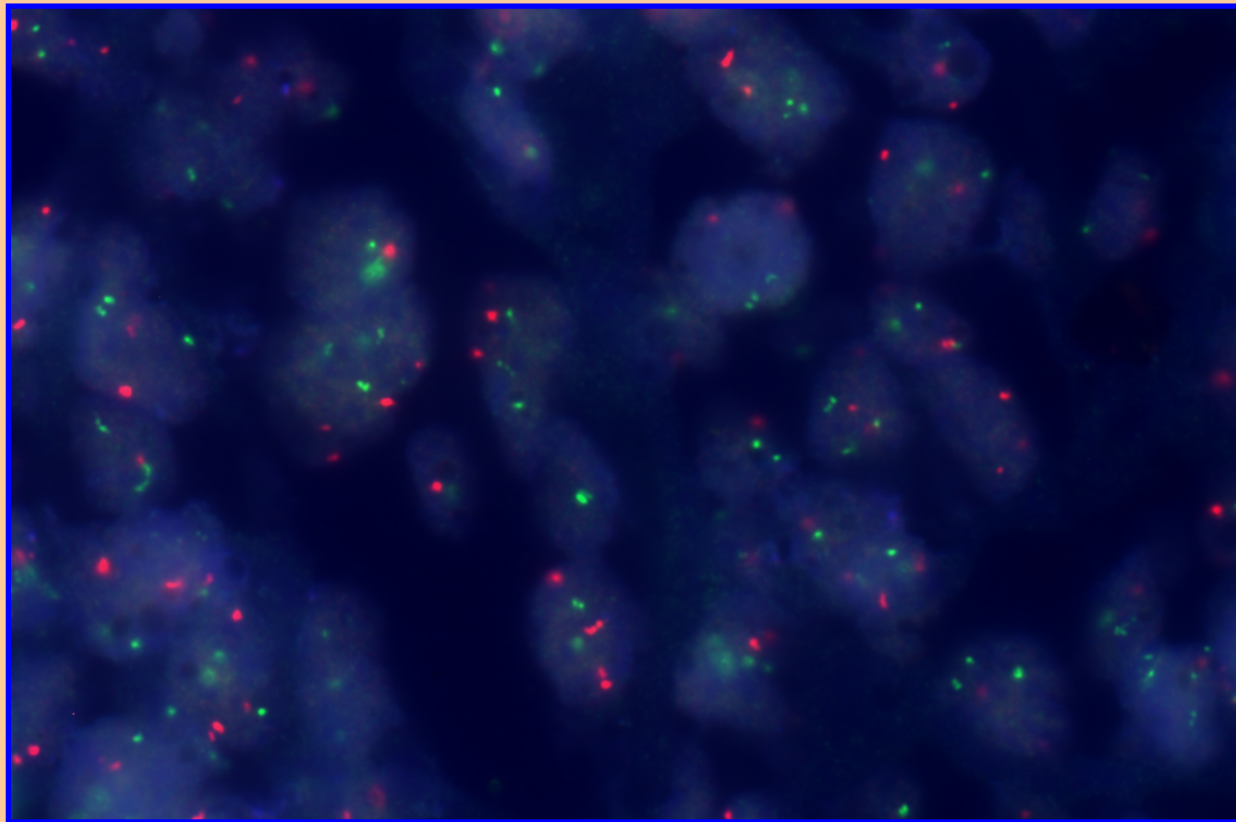
- Téměř všechny případy BL souvisí s translokací genu *c-myc* (chromozom 8) buď s genem pro těžký imunoglobulinový řetězec μ (chromozom 14) nebo lehký řetězec κ nebo λ (chromozomy 2 a 22).



- 80% případů BL má translokaci t(8;14)(q24;q32).
- Případů s translokacemi t(2;8)(p11;q24) a t(8;22)(q24;q11) je asi po 10%.

Výsledky LMP: FISH t(8;14)

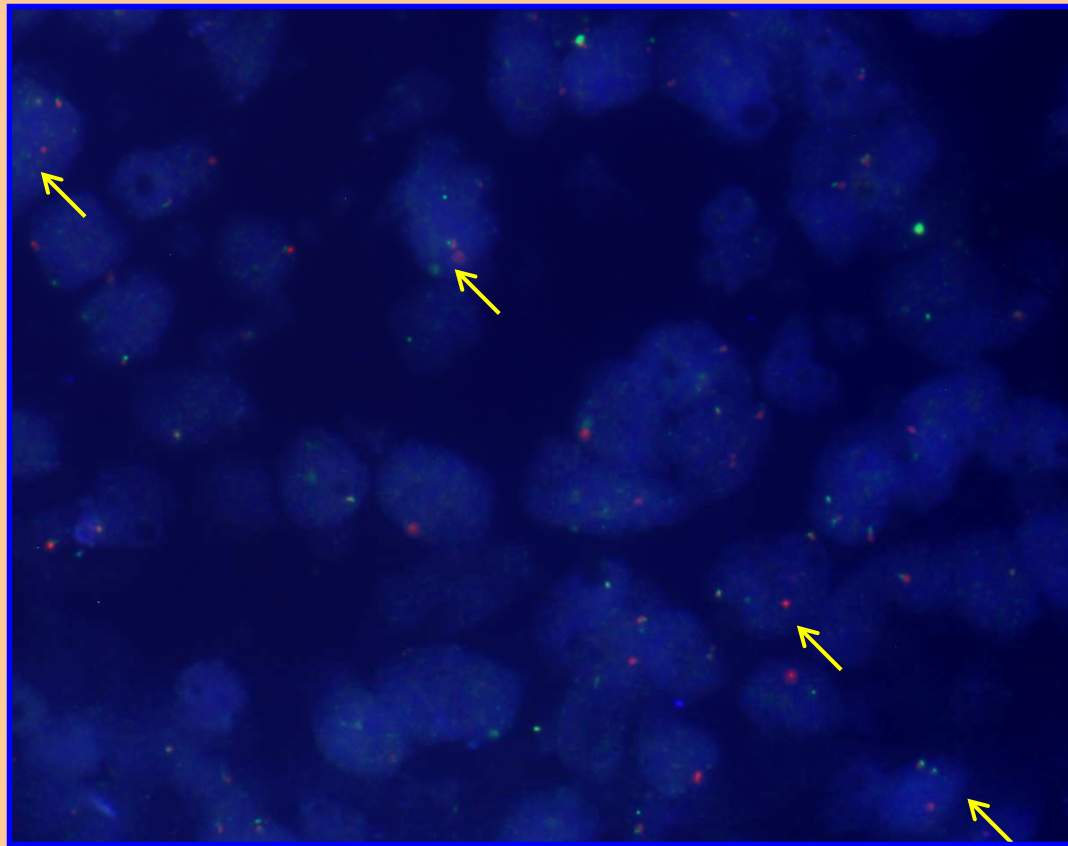
- t(8;14)(q24;q32) - IgH/MYC („dual fusion translocation probe“)
- Výsledek: **1%** jader s translokací, tj. negativní



Naše výsledky: FISH 8q24



- 8q24 - přestavba genu *c-myc* („break apart rearrangement probe“)
- Výsledek: **28%** jader s translokací, tj. pozitivní ⇒ vysoká exprese *c-Myc*



Lymfomy se dvěma zásahy

- Většina DH lymfomů jsou *de novo* případy bez předchozí historie indolentního lymfomu. 15-20% DH lymfomů je diagnostikovaných u pacientů s předchozím indolentním onemocněním, nejčastěji folikulárním lymfomem.
- V literatuře detailně dokumentovány případy s ohnisky (high-grade) „Burkitt-like“ (DH) lymfomu na pozadí histologicky (low-grade) folikulárního lymfomu.

Náš výsledek:

t(14;18)(q32;q21) - negativní (77% jader s translokací)

8q24 - pozitivní (28% jader s translokací)

Lymfomy se dvěma zásahy

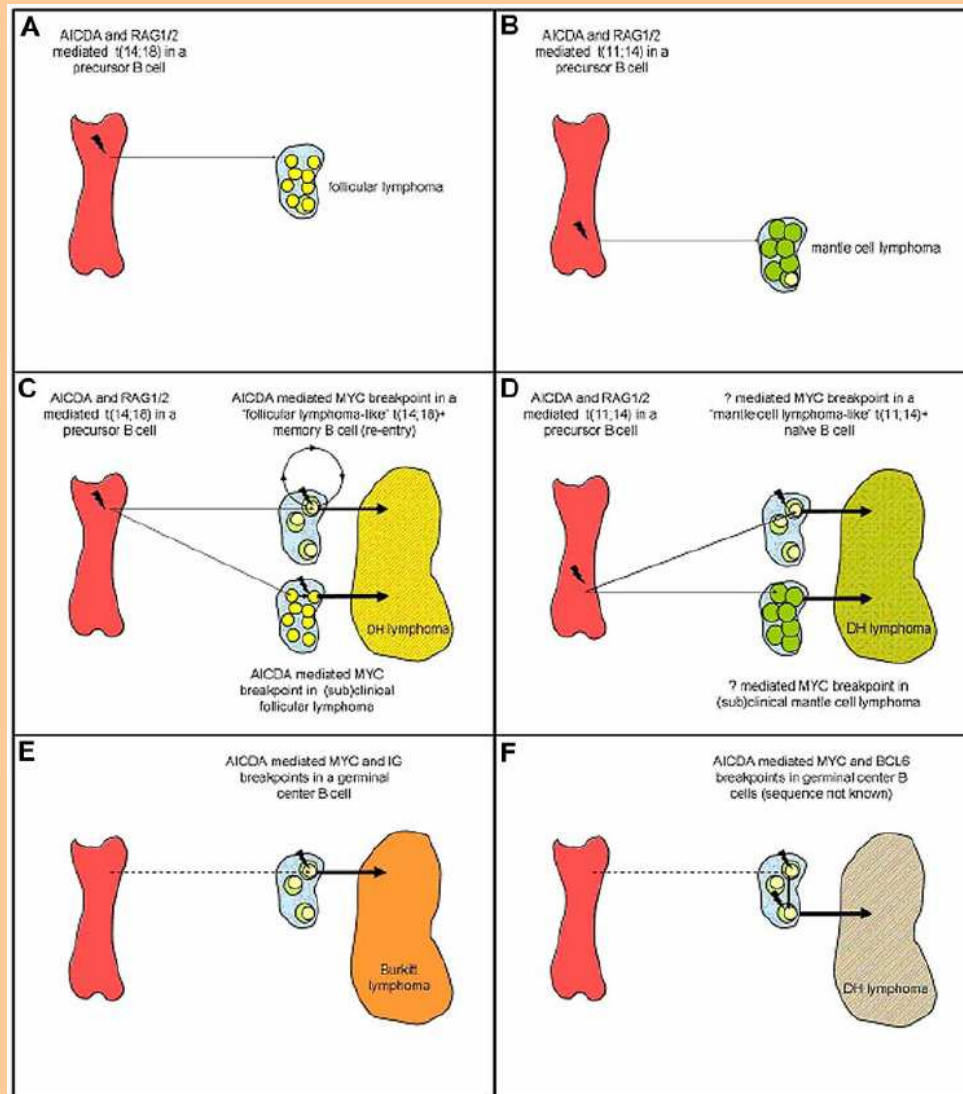
- U Burkittova lymfomu je přestavba *c-myc* primární genetickou změnou, obvykle není doprovázena dalšími chromozomálními aberacemi. Translokace t(8;14) je nejčastější přestavbou *c-myc*, představuje 80% případů BL.
- U double-hit lymfomů se má za to, že přestavba *c-myc* je sekundární, vznikající na podkladě již existující primární změny a relativně vysoké, časté chromozomální komplexity. Odpovídá tomu i mnohem častější výskyt přestavby *c-myc* s genem pro lehký imunoglobulinový řetězec nebo s jiným, neimunoglobulinovým genem.

Náš výsledek:

t(8;14)(q24;q32) - negativní (1% jader s translokací)

8q24 - pozitivní (28% jader s translokací)

Lymfomy se dvěma zásahy



- Většina přestaveb *c-myc* je zprostředkována AICDA ve zralých B buňkách (E).
- Zlomy *BCL2* a *CCND1* jsou pravděpodobně zprostředkovány RAG1/2 v prekurzorových B buňkách (A, B).
- ⇒ Přestavby *MYC/8q24* jsou sekundární zásahy u případů s přestavbami *BCL2/18q21* nebo *CCND1/11q13* (C, D).
- Načasování zásahů u DHL *BCL6+/MYC+* a *BCL3+/MYC+* je méně jasné, protože přestavby těchto genů zprostředkovávají stejné mechanismy (F).

Onkogeny zapojené do vývoje lymfomů

MYC, BCL2, CCND1 (BCL1)

BCL6

- lokalizován v pozici 3q27
- exprimován v mnoha tkáních, ale u B buněk omezen na buňky GC, nutný pro vytvoření GC
- transkripční represor mnoha genů účastnících se apoptózy, odpovědi na poškození DNA, regulace buněčného cyklu, proliferace a diferenciace; cílové geny např. BCL2, p53, IRF4
- „vypnutím p53“ umožňuje somatické hypermutace a izotypové přepnutí (tj. rekombinace), také „non-Ig genů“ (včetně sebe)
- aberrace BCL6: hypermutace, translokace - 50% s Ig lokusem, 50% jiní partneři
- translokace BCL6 u asi 30-40% DLBCL, některých FL, MALT

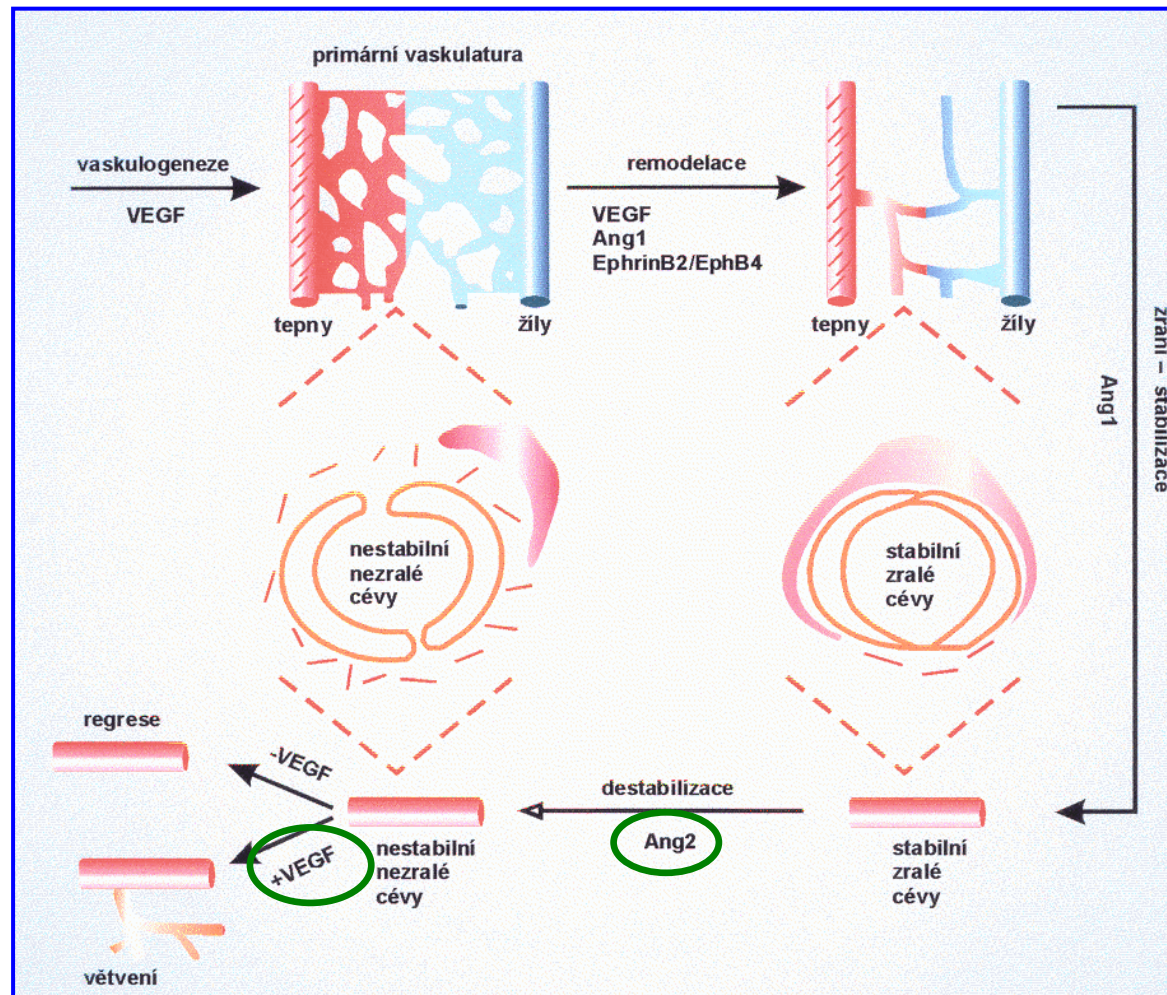
Onkogeny zapojené do vývoje lymfomů

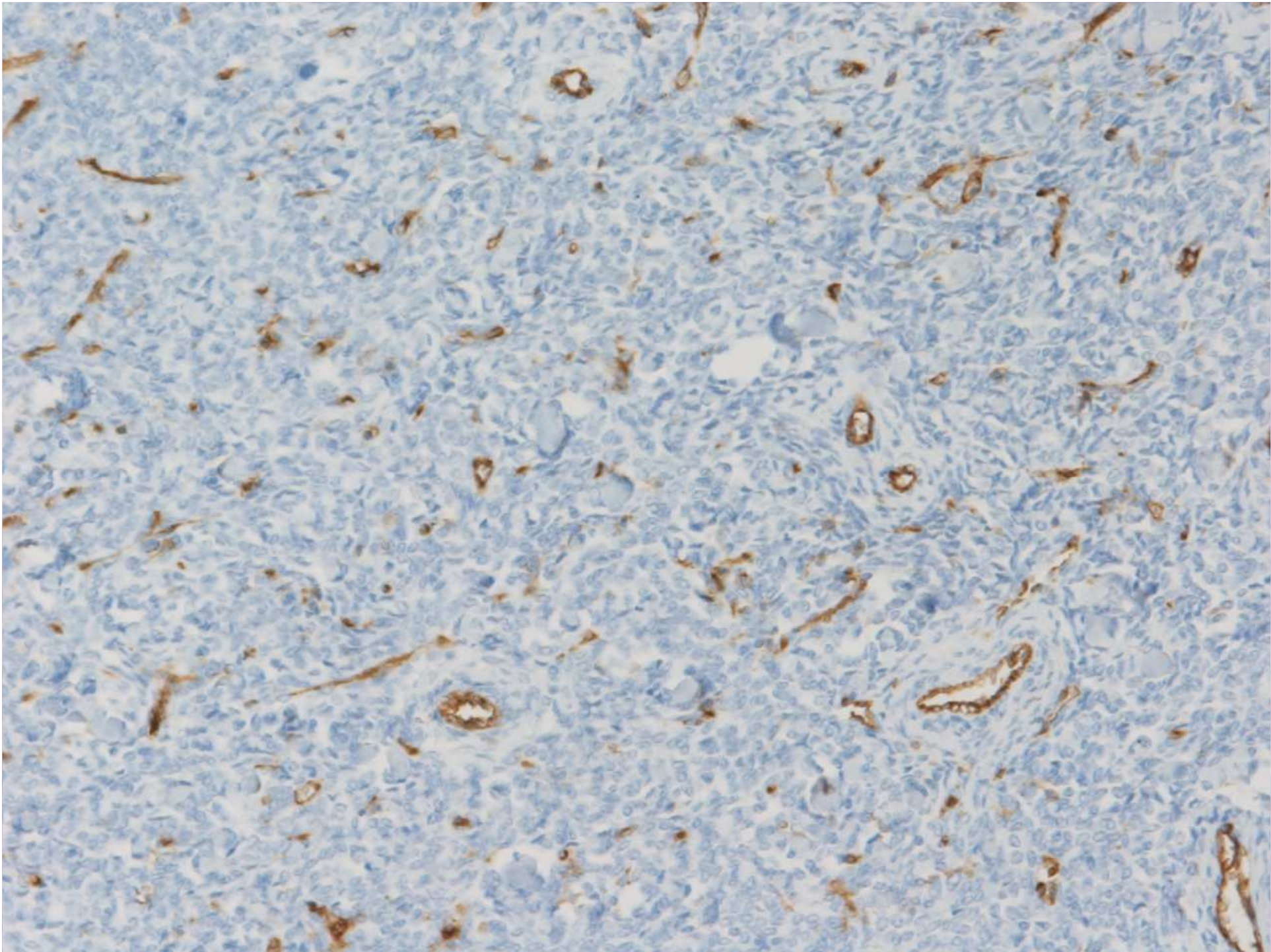
MYC, BCL2, CCND1 (BCL1), BCL6

BCL3

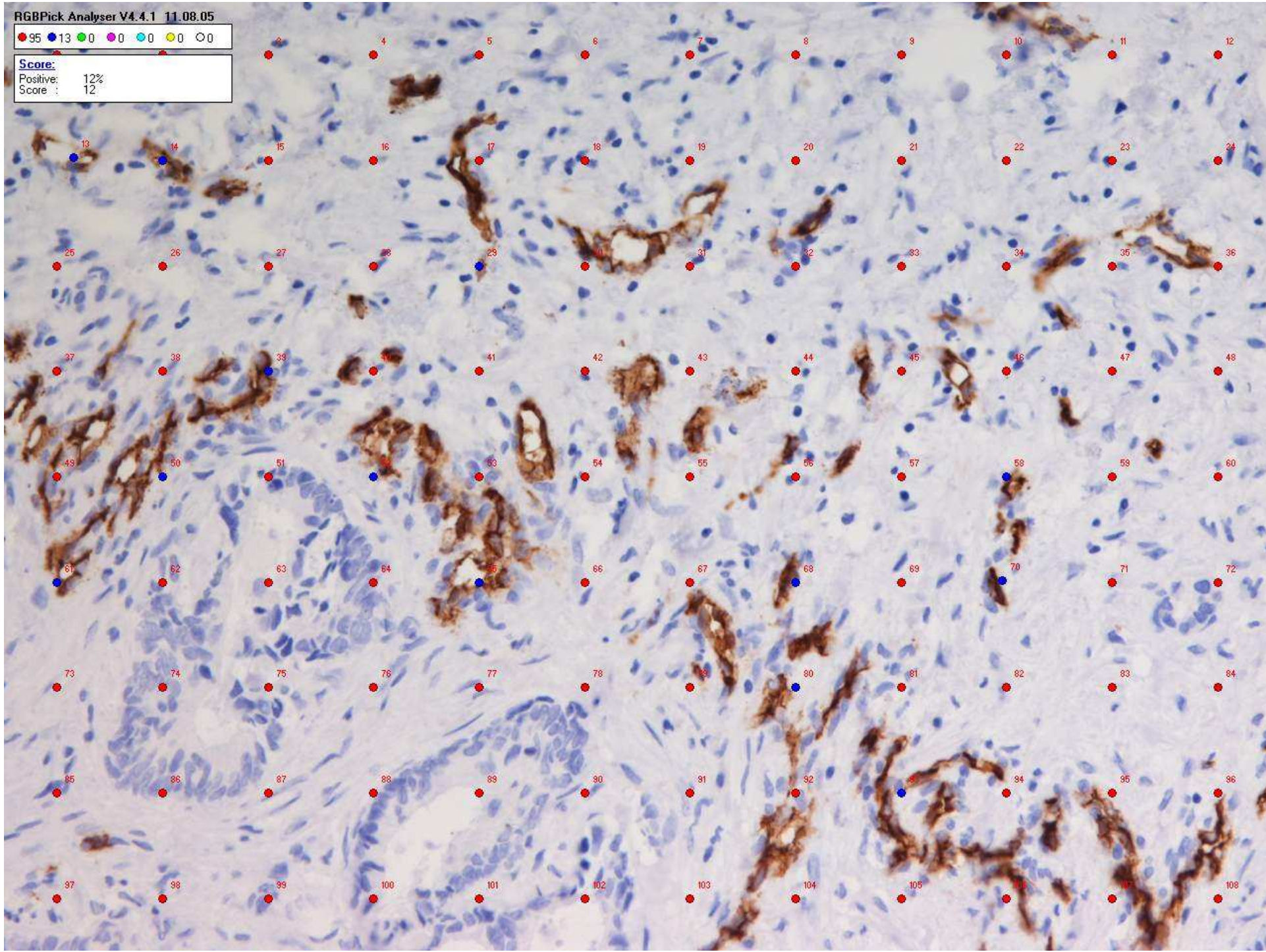
- lokalizován v pozici 19q13
- člen rodiny I κ B
- vyšší exprese ve zralých než nezralých B buňkách
- účastní se vytváření GC
- translokace t(14;19) se vyskytuje u řady leukémií a lymfomů

Angiogeneze





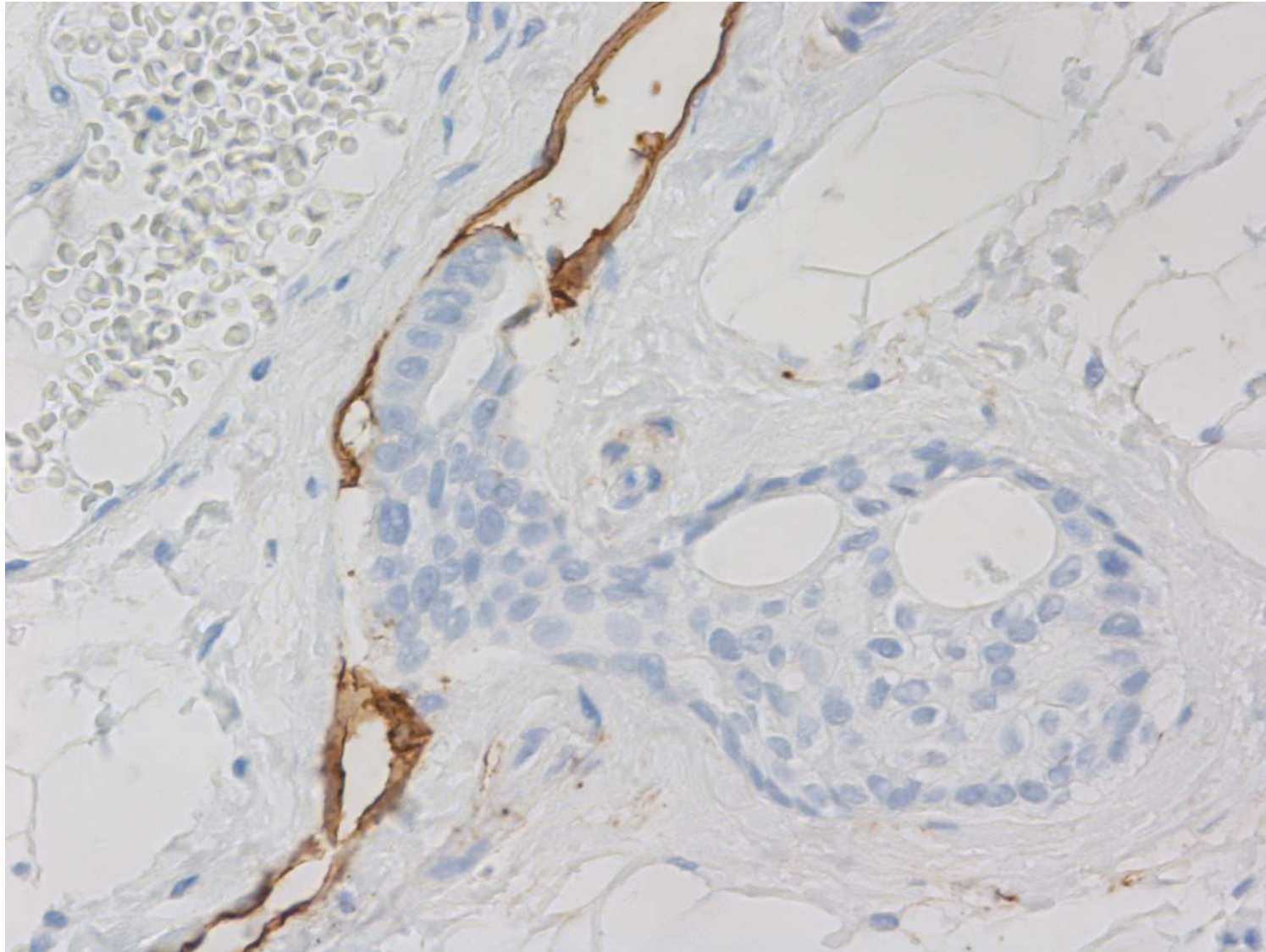
● 95	● 13	● 0	● 0	● 0	● 0	○ 0
Score:						
Positive: 12%						
Score: 12						



Angiogeneze vs. angiinvaze

- **Angiogeneze** - novotvorba cév (uvnitř tumoru a v jeho bezprostředním okolí) - pod vlivem proangiogenních faktorů - obecný znak nádorů, zejména ale nikoli výhradně maligních (např. v okolí prekanceróz)
- **Angiinvaze** - vrůstání nádorových buněk do lumen cév - znak výhradně maligních nádorů, klinicky významný faktor svědčící pro vysokou pravděpodobnost metastatického rozsevu. Uvádí se při histologickém vyšetření malignit a je součástí TNM klasifikace některých typů tumorů (např. ledviny, testes)

Angioinvaze - nádorový čep invaduje stěnu lymfatické kapiláry a šíří se v jejím lumen (immunohistochemicky znázorněny endothelie lymfatické cévy, protilátka anti-podoplanin - D2.40)

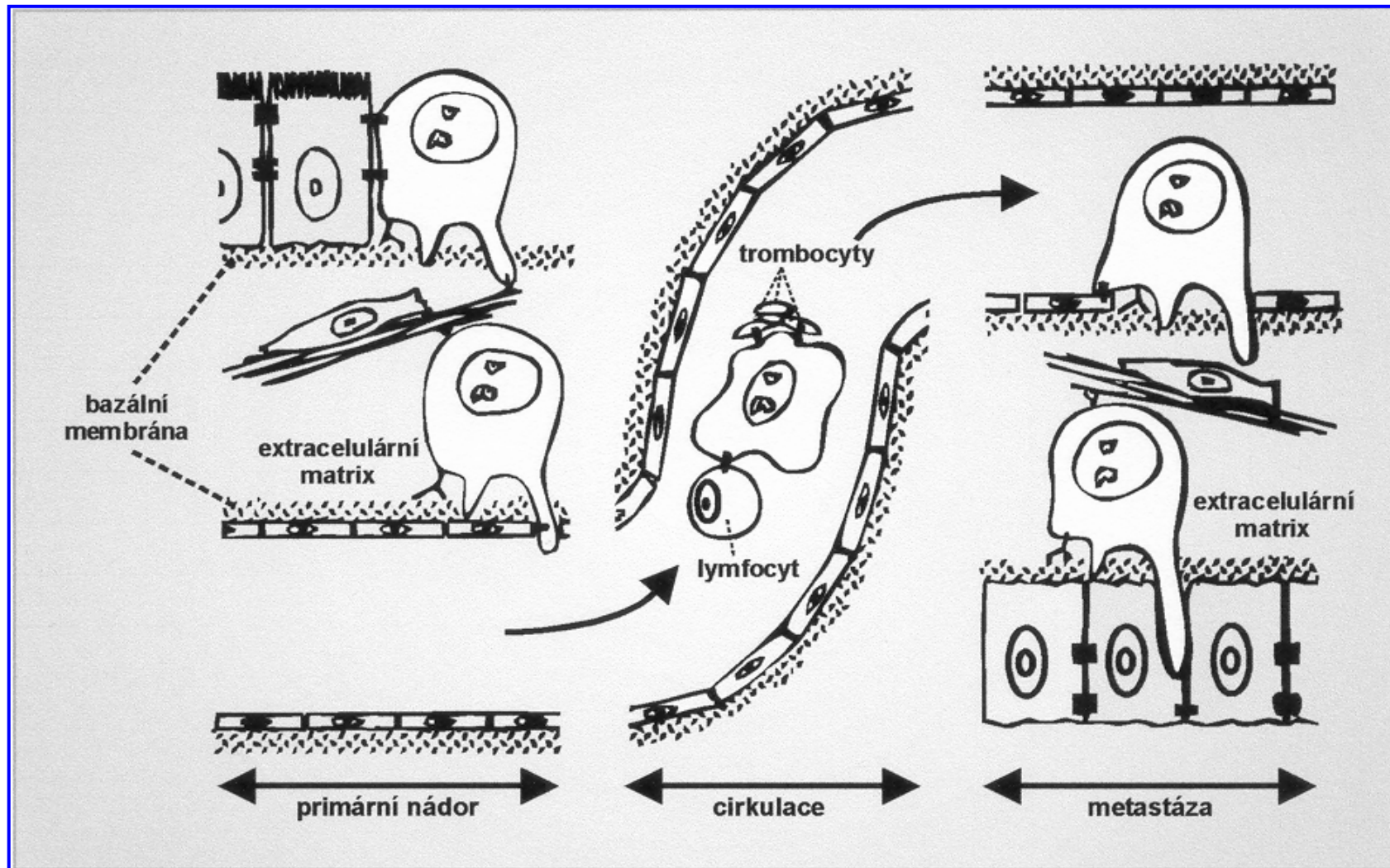


Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression

Modern Pathology (2005)

Microvessel density was assessed microscopically and by image cytometry, and was compared with tumor histology, grade, stage, lymph node metastasis, hormone receptors, HER2/neu status, and expression of VEGF, VEGF-C and VEGF-D by immunohistochemistry or quantitative RT-PCR. Strong correlation was observed between visual and image cytometric microvessel density using D2-40 but not CD31 ($P=0.016$ and 0.1521 , respectively). Image cytometric **CD31 microvessel density correlated with tumor size, grade, stage and lymph node metastasis** ($P=0.0001$, 0.0107 , 0.0035 and 0.0395 , respectively). **D2-40 microvessel density correlated with tumor stage ($P=0.0123$ by image cytometry) and lymph node metastasis ($P=0.0558$ by microscopy)**. Immunohistochemical VEGF signal in peritumoral blood vessels correlated with image cytometric CD31 and D2-40 microvessel density ($P=0.022$ and 0.0012 , respectively), consistent with the role of VEGF in blood and lymphatic vascular growth. Intratumoral VEGF-C and VEGF-D expression by quantitative RT-PCR correlated with D2-40 ($P=0.0291$ by image cytometry) but not with CD31 microvessel density, which could suggest a selective role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis. CD31 and D2-40 microvessel density correlated significantly with several prognostic factors, including lymph node metastasis. **Thus, measurements of angiogenesis and lymphangiogenesis may have utility for breast cancer pathology, particularly for estimation of metastatic risk.**

Metastatická kaskáda



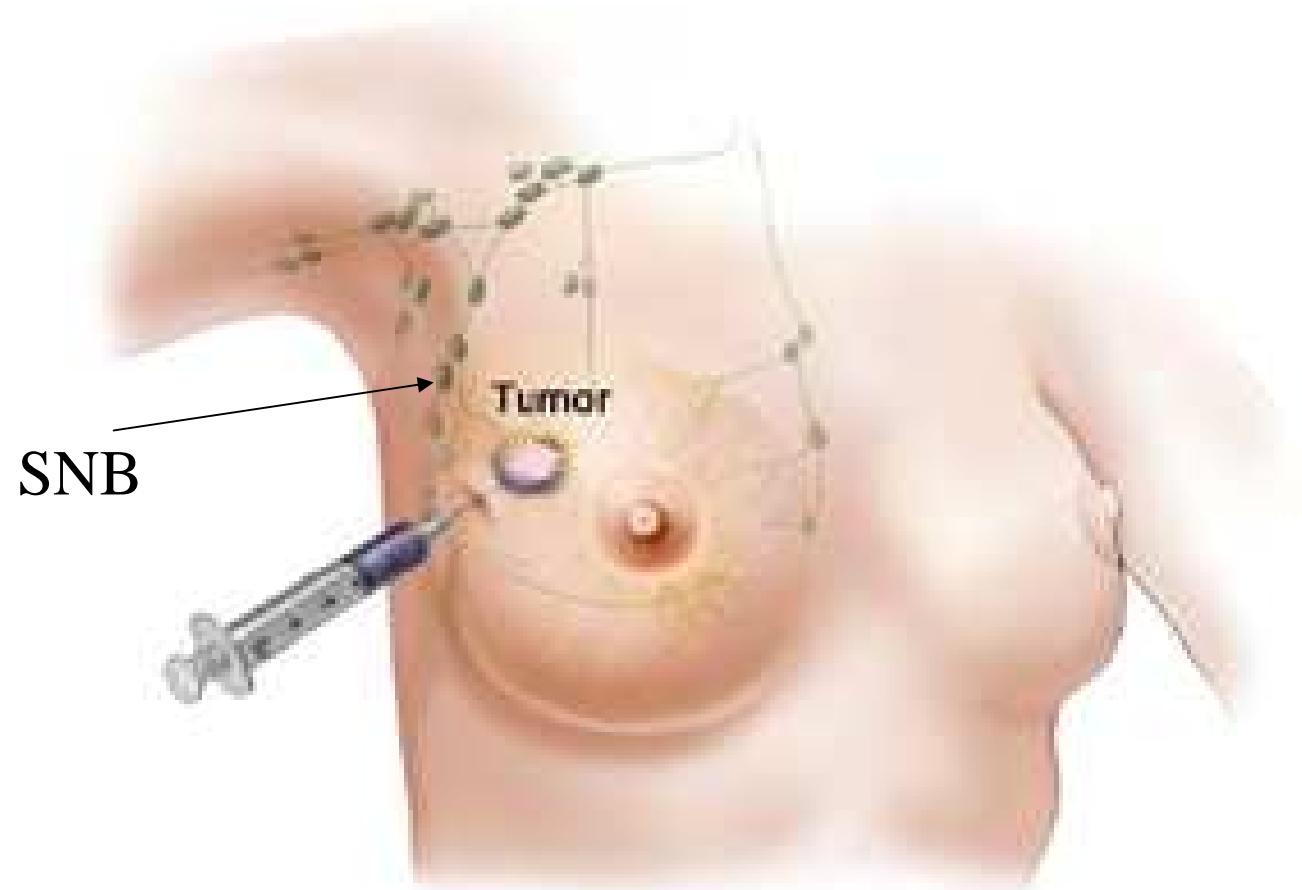
Sentinelová lymfatická uzlina (SLU)

- Koncept SLU je založen na teorii, že invaze nádoru do první uzliny ve svodném lymfatickém povodí předurčuje nádorový stav celého povodí.
- Pokud tedy není metastáza zjištěna v první uzlině, je bez metastáz i celé regionální lymfatické povodí.
- Pokud je první uzlina metastatická, je nutná radikální disekce uzlin.
- ⇒ Celkový stav uzlin je možno určit excizí jediné z nich. Lze tak předejít zbytečné radikální excizi uzlin (např. u ca prsu až 70% případů)
- Poprvé popsáno 1960 u karcinomu parotidy.
- Identifikace SLU pomocí injikace kontrastní látky (radioaktivní indikátory, patentní modř).

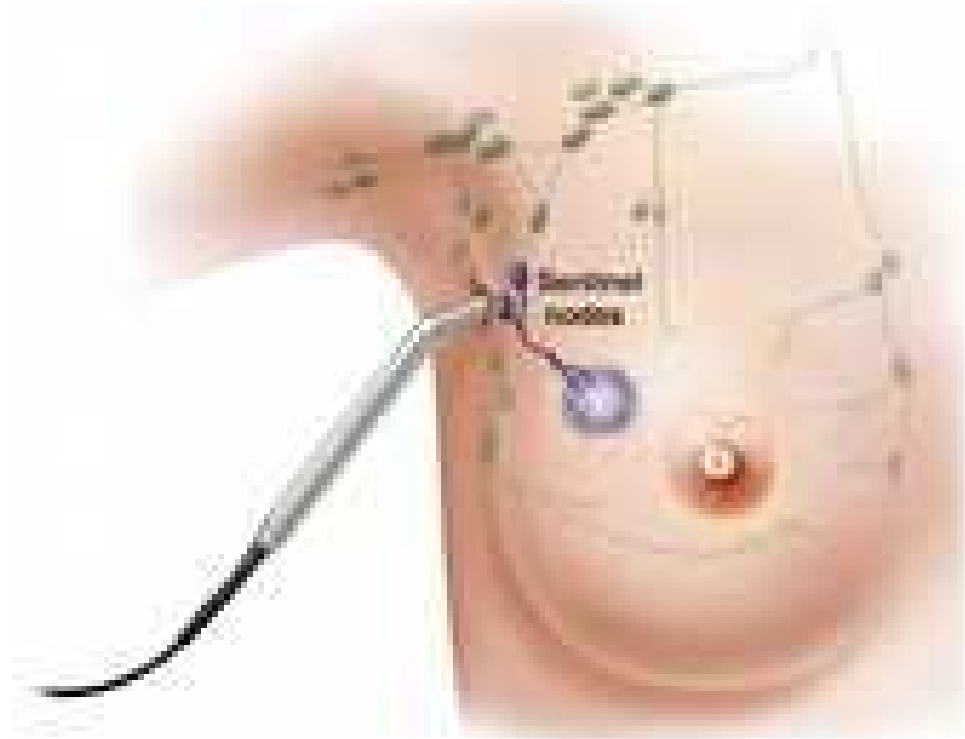
Co je to sentinelová uzlina?

- První mízní uzlina, která drenuje mízu z ložiska nádoru.
- Nemusí být nejbližší.
- Může jich být více než jedna.

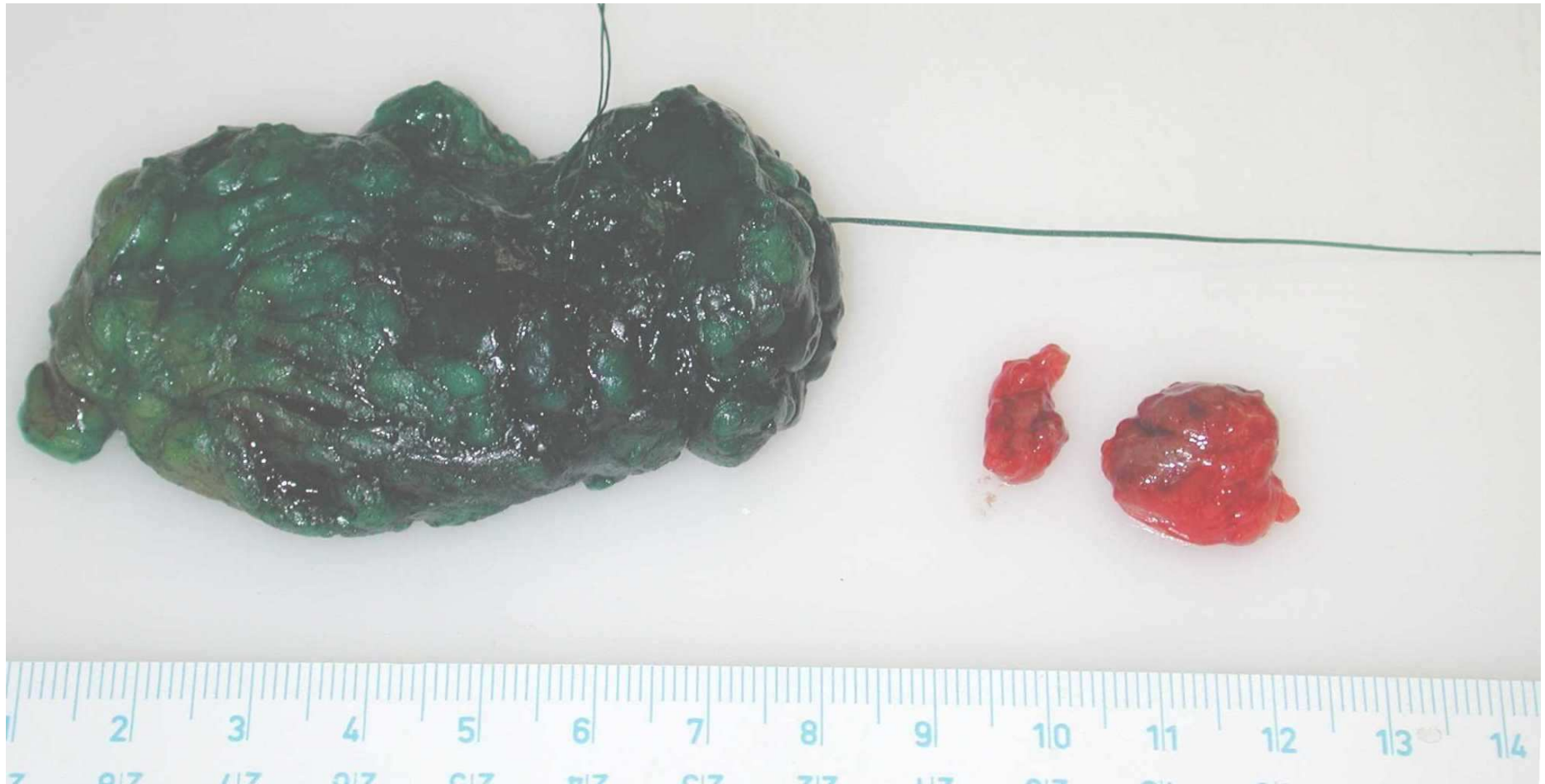
Sentinelová uzlina



Vyhledání SNB - radioaktivně značený albumin a patentní modř



Vyšetření SNB



Smysl vyšetření SNB

- Ušetřit pacientku disekce axilárních uzlin...
- ...a tím dlouhodobých následků, především lymfedému.





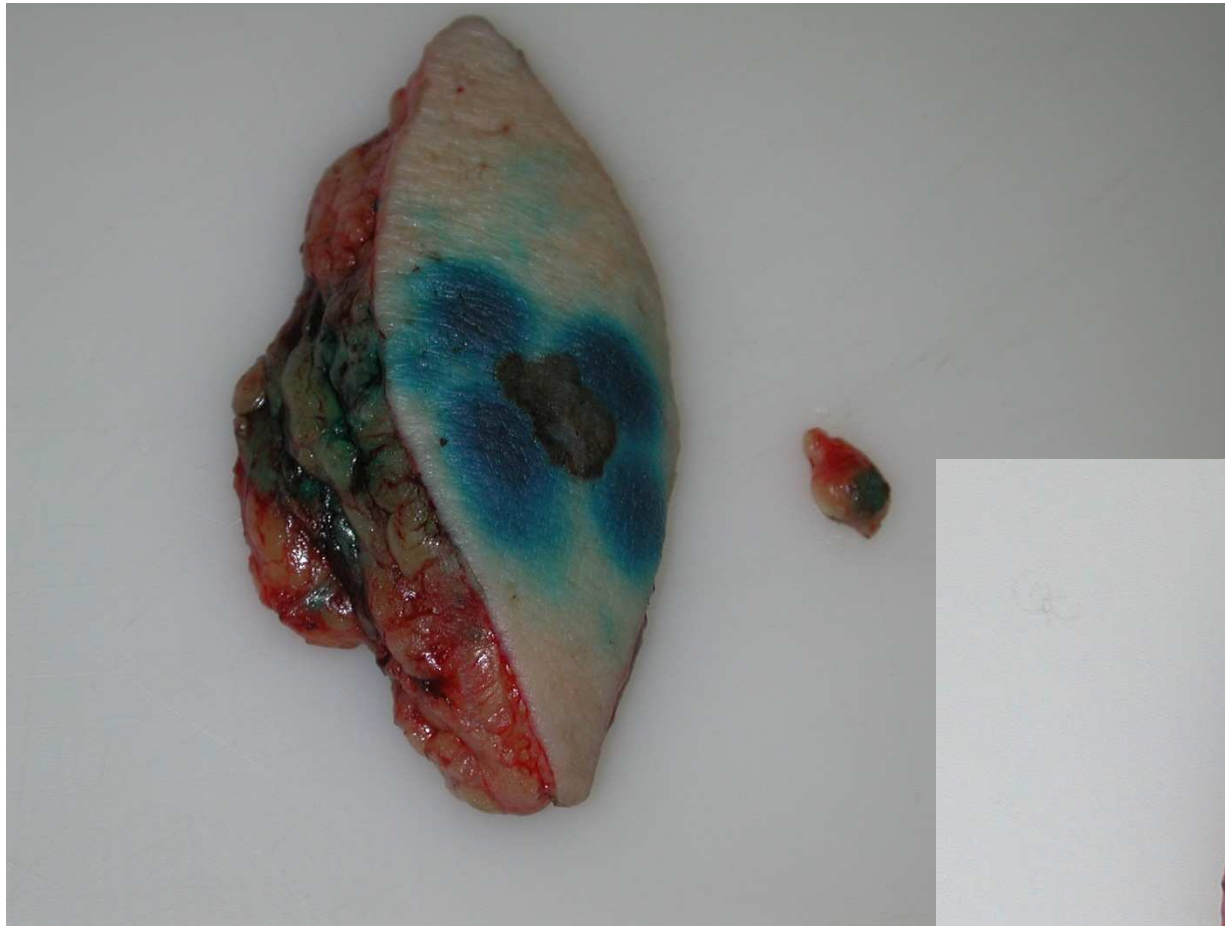
Smysl vyšetření SNB

- Správně rozpoznat metastazující onemocnění.
 - Indikována disekce axily (chrání před recidivou v axile).
 - Metastazující karcinom prsu nutně vyžaduje chemoterapii (chrání před vzdálenými metastázami).

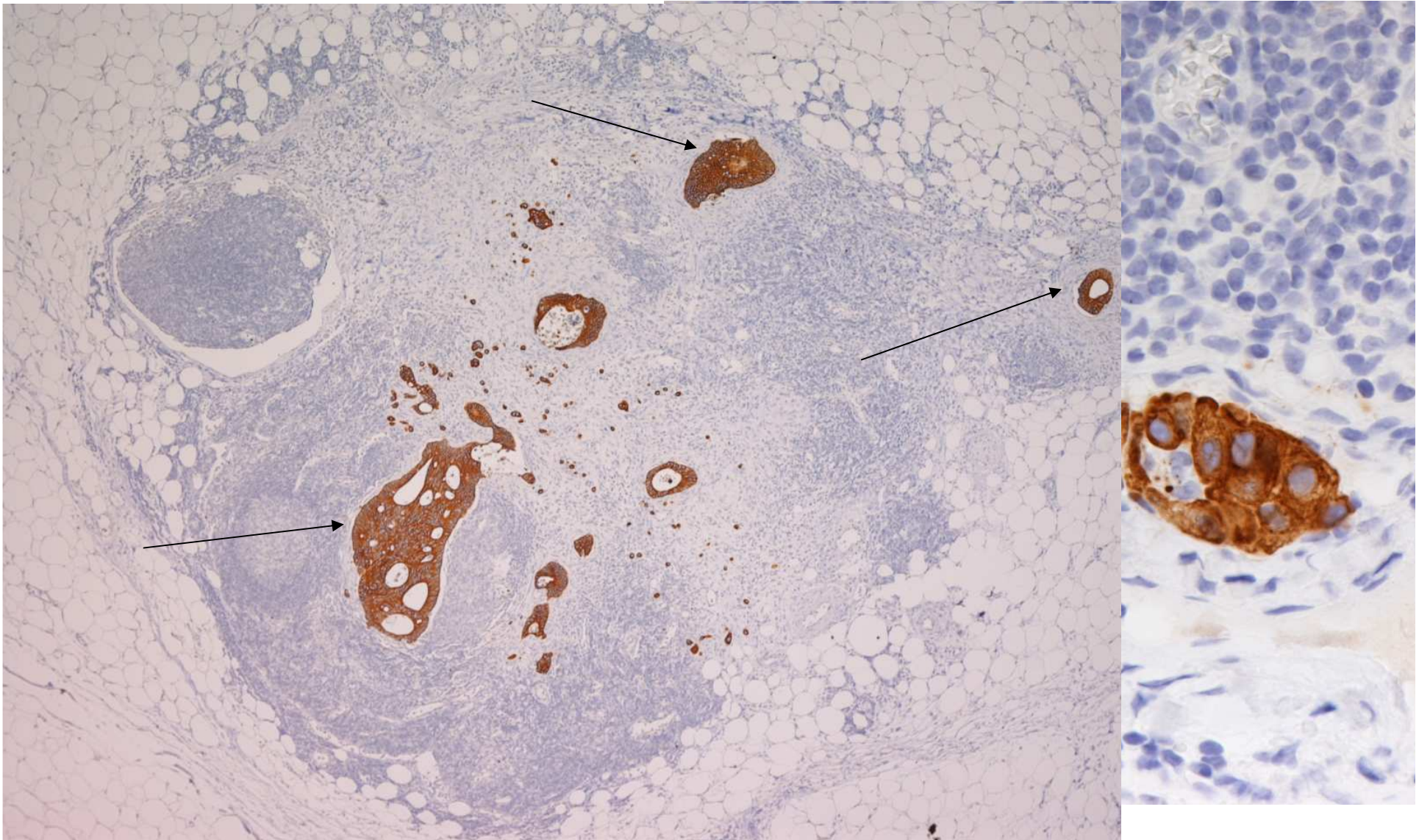
Velikost metastáz v SNB

- Už od jednotlivých nádorových buněk!
 - ITC - isolated tumor cells
 - Jednotlivé buňky nebo klastry buněk do 0,2mm, bez známek invazivního růstu, obvykle v periferním splavu uzliny.
 - Mikrometastáza 0,2mm - 2,0mm
 - Makrometastáza >2,0mm
- Klinický význam
 - Stran lokální recidivy
 - Stran celkového přežití

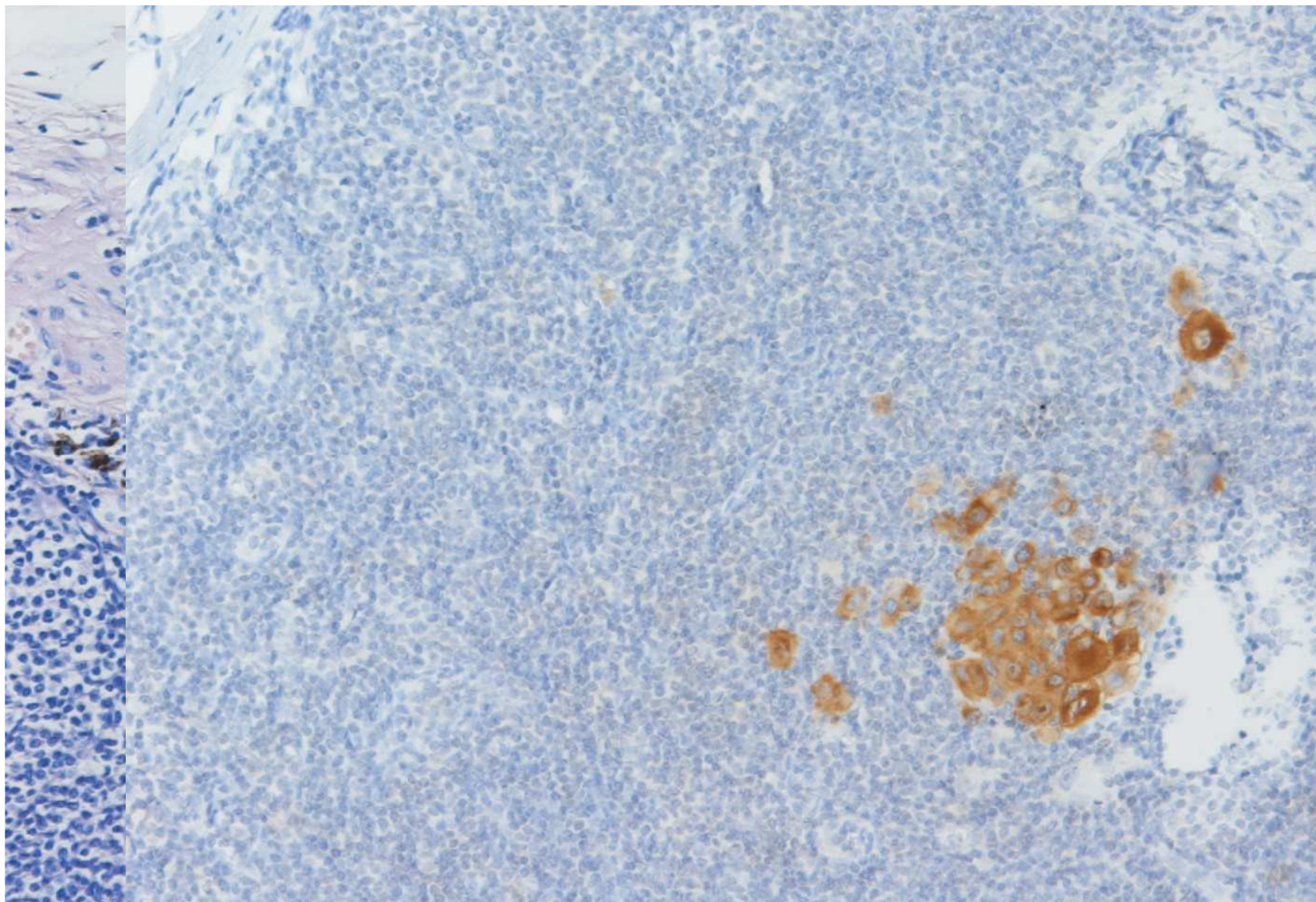
Makroskopický obraz excidovaného kožního melanomu a sentinelové uzliny, materiály zbarveny patentní modří



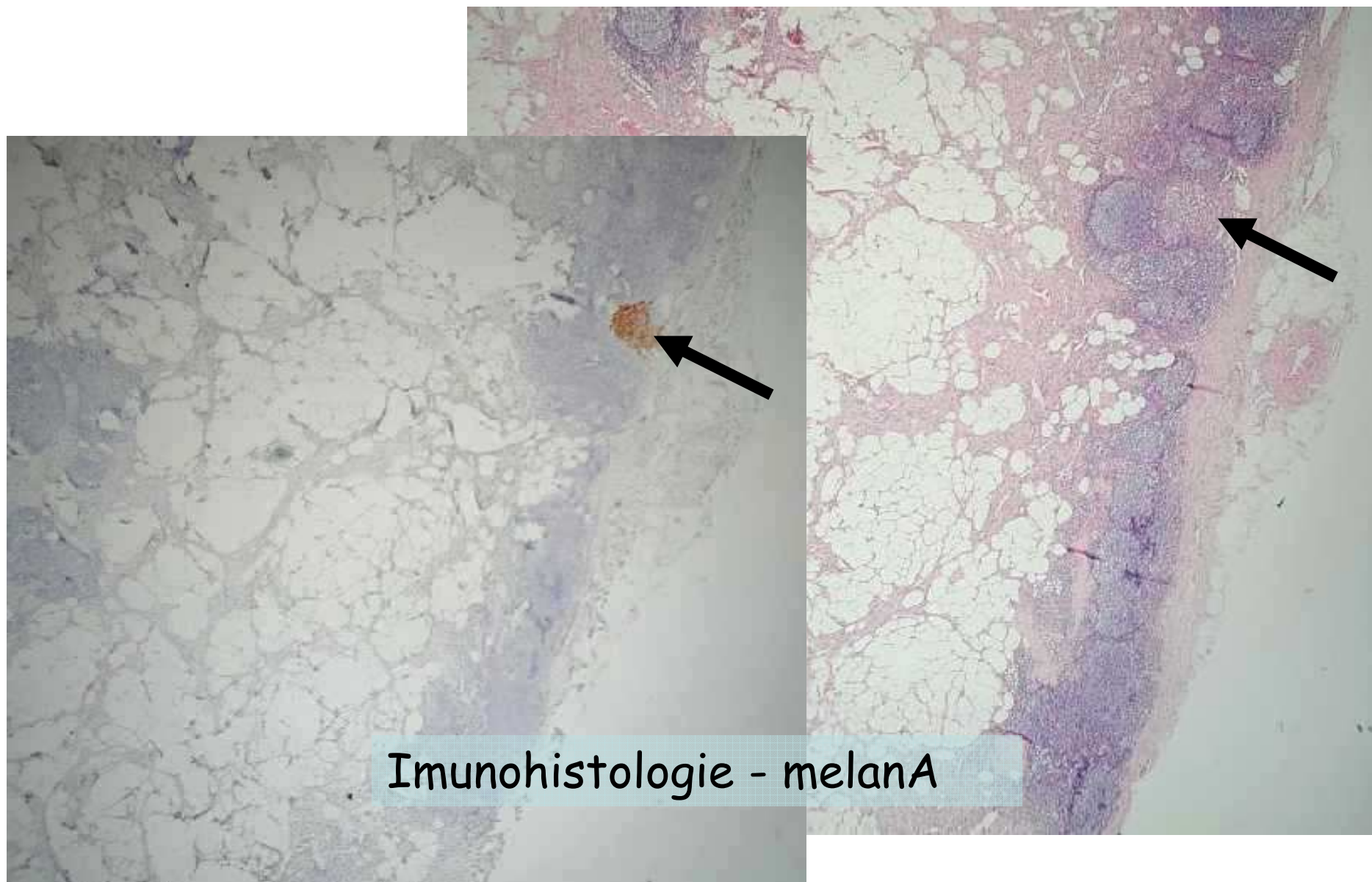
(Mikro) metastázy



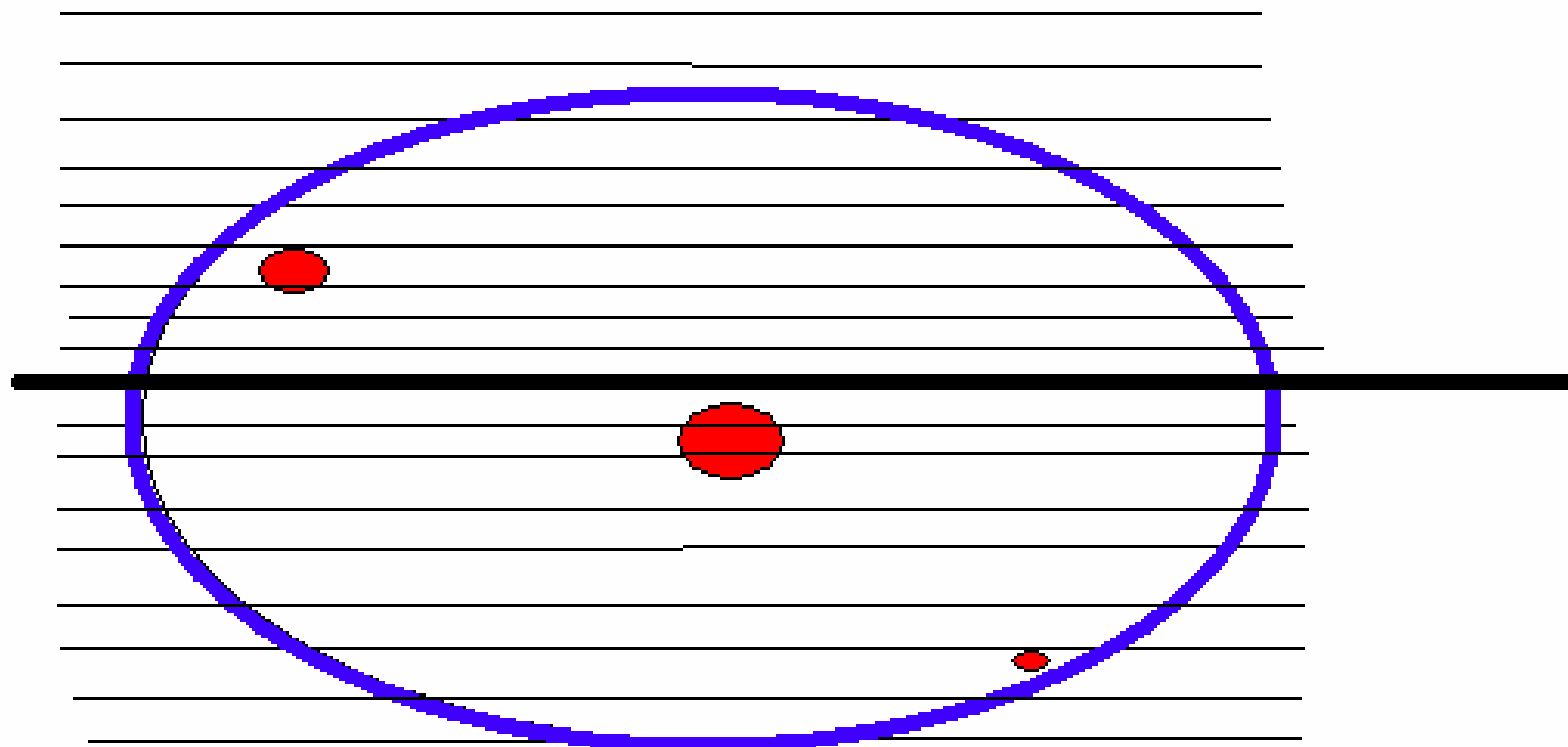
Mikrometastáza melanomu v sentinelové uzlině – v HE a
po imunoreakci s protilátkou proti HMB-45



Ne všechno je vidět v HE



Kompletně vyšetřená uzlina



Algoritmus vyšetření SNB

- ČAS / PŘESNOST
- A) peroperačně (20 minut)
 - zatíženo falešnou negativitou, zejména v případě malých metastatických ložisek
- B) klasicky (3 dny)
 - nutnost druhé operace (příjem do nemocnice, anestezie...)
- C) kombinace
 - Kompletní včetně IHC metod - zcela vyjíměčný postup
 - Makroskopické posouzení + peroperační histologie - zachytí velké metastázy (většina), u malých meta se v současné době v definovaných případech ustupuje od další operace

Děkujeme za pozornost

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ