

Foliküler Lenfoma ve Folliküler Hiperplazi Ayırıcı Tanısında BCL-2 Proteini ve Prolifere Hücre Nükleer Antijenin (PCNA) Katkısı

Dr. Semin Ayhan¹, Dr. Saliha Soydan², Dr. Mine Hekimgil²,

Dr. Sibel Çetinkaya Kılıçalp², Dr. Seçkin Çağırınan³

ÖZET

Foliküler lenfoma (FL) ve folliküler hiperplazi (FH) arasındaki ayırım, hematopatolojide en sık karşılaşılan ayırıcı tanı sorunlarından birisidir. Bu çalışmada monoklonal antikolar olan bcl-2 ve PCNA'nın FL ve FH ayırıcı tanısında bir yöntem olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

İmmunohistokimyasal incelemede bcl-2 pozitifliği FL olgularının %87.8'inde saptanırken FH olgularının hiçbirinde izlenmemiştir. İstatistiksel açıdan FL ve FH olguları arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0.005$). PCNA indeksi FL olgularında 13.28 ± 1.7 iken FH olgularında 46.8 ± 2.2 olarak belirlenmiştir. FH ve FL olguları karşılaştırıldığında FH'de PCNA indeksi FL olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.005$).

Anahtar Kelimeler : Foliküler lenfoma, folliküler hiperplazi, bcl-2, PCNA, immunohistokimya

GİRİŞ

Foliküler lenfoma (FL) ve reaktif folliküler hiperplazi (FH) arasındaki ayırım hematopatolojinin geleneksel tanı sorunlarından birisini oluşturmaktadır. Folliküler lenfoma için önerilen morfolojik kriterler ve sitolojik ayrıntılar iyi tanımlanmış olmasına karşın hiçbir kriterin özgül olmayışı ve yalnızca ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirme yapılabilmesi, tümünde olmasa bile bazı olgularda ayırıcı tanıyı olanaksızlaştırmaktadır. Oysa tanı, sağaltımı ve prognozu tümüyle değiştirmektedir. Bu sorunlar nedeniyle FL ve FH ayırımında yeni belirleyiciler aramak kaçınılmaz hale gelmiş ve immunopatolojideki gelişmeler bu konudaki çalışma alanını yaratmıştır.

1980'lerin sonları ve 1990'larda moleküler biyolojik ve sitogenetik çalışmaların yoğunlaşması ile FL'larda 14. ve 18. kromozomlar arasında translokasyon bulunduğu ortaya

THE ROLE OF PCNA AND BCL-2 IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND FOLLICULAR HYPERPLASIA.

One of the frequent problems of differential diagnosis in haematopathology is the differentiation of follicular lymphoma (FL) and follicular hyperplasia (FH). In this study the roles of bcl-2 and PCNA monoclonal antibodies, in the differentiation of FL and FH was investigated.

bcl-2 immunoreactivity was found in 87.8% of FL cases, while none of FH showed any staining. Statistically, a significant difference was found between the bcl-2 immunoreactivities of FLs and FHs ($p<0.005$). The PCNA index of FLs and FHs was $13.28\pm1.7\%$ and $46.8\pm2.2\%$, respectively. A significantly higher PCNA index was detected in FH cases compared to FLs ($p<0.005$).

Key Words : Follicular lymphoma, follicular hyperplasia, bcl-2, PCNA, immunohistochemistry

konmuştur⁽¹⁾. Kırılma noktalarının moleküler analizi ile 18. kromozom üzerinde lokalize bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) geni saptanmıştır⁽²⁾. FL'ların yaklaşık 2/3'sinde saptanan t(14;18) koromozomal translokasyonu sonucunda aktive olan bcl-2 geni bcl-2 onkoproteinini sentezlemektedir. Bu onkoprotein immunohistokimyasal olarak saptanması ayırıcı tanıyı desteklemektedir⁽³⁾. Öte yandan proliferatif durumun değerlendirilmesi de birçok malign tümörü tanımlamak ve prognozu belirlemek açısından yararlı olabilir. 1980'lerde bulunan "Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)", DNA replikasyonunda yer alan DNA polimeraz enziminin aktivitesi için gerekli bir doku antijenidir⁽⁴⁾. PCNA'nın lenfomaların histolojik tipi ile anlamlı bir ilişki gösterdiği ve pozitifliğin yüksek dereceli histolojik tiplerde düşük dereceli gruplara oranla çok daha yüksek olduğu öne sürülmektedir⁽⁵⁾.

Bu çalışmada, FL ve FH arasında bcl-2 ve PCNA değerleri yönünden ortaya çıkan farklar, bunların morfolojik bulgular ile

1 İzmir Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi

2 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

3 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ilişkileri, patolojik tanıya katkıları ve prognoz üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya 1989 - 1995 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Patoloji Anabilim Dalı'nda lenf nodu materyali incelenen 33'ü FL, 30'u FH olarak tanı alan toplam 63 olgu alınmıştır. FH olguları ise bu tanıyı alan çok sayıda olgu arasından seçilmiştir. FL ve FH olgularının histopatolojik ayrımı genel kabul gören morfolojik kriterler temelinde yapılmıştır.

Immunohistokimyasal boyama için %10'luk tamponlanmış formalinde tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan, 5 mikron kalınlığında hazırlanan kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra 0.01 M sodyum sitrat solüsyonu (pH 6.0) içinde, mikrodalga fırında, en yüksek enerjide (720 Watt), 5'er dakikalık iki siklusa tutulmuştur. Bunun ardından 20 dakika sıcak sitrat solüsyonunda soğumaya bırakılan ve sonra sırasıyla distile su ve Tris tampon solüsyonu (TBS) ile yıkanarak hazırlanan kesitler APAAP (Alkalen fosfataz-anti-alkalen fosfataz) yöntemi kullanarak boyanmıştır. Kesitler insan bcl-2 onkoproteinine yönelik predilüe monoklonal anti-bcl-2 (DAKO, Danimarka) ile bir saat, monoklonal anti-PC10 (DAKO, Danimarka) ile otuz dakika inkübe edilmiştir. Primer antikorlar ile inkübasyondan sonra, tüm kesitlere streptavidin-biotin yöntemi (LSAB-2 Kit, DAKO, Danimarka) ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Kromojen olarak new-fuksin-substrate (DAKO, Danimarka) kullanılmıştır. Uygulama sırasındaki tüm inkübasyonlar oda ısısında, nemli ve kapalı bir ortamda yapılmıştır. Inkübasyonlar arasındaki tüm yıkamalarda TBS (pH 7.6, 0.05 M) kullanılmıştır. Anti-PCNA ve anti-bcl-2 monoklonal antikorları ile yapılan boyamalarda, her dokudan hazırlanan yedek kesitlere monoklonal antikor yerine negatif kontrol olarak DAKO firmasından sağlanan negatif kontrol solüsyonu (non-immune serum) uygulanmıştır. PCNA boyamasında pozitif kontrol olarak, PCNA ile boyanması önceden saptanmış ve indeksi çıkarılmış olan kolon adenokarsinomu tanısı almış bir olgunun doku kesitleri kullanılmıştır. Anti-bcl-2 ile boyamada ise reaktif FH olguları pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Her iki antijenin immun reaktivitesinin değerlendirilmesinde mikroskopik inceleme körleme olarak olguların klinik ve patolojik bulguları bilinmeksizin yapılmıştır. PCNA değerlendirmesi ve PCNA boyanmasının sayımı standart ışık mikroskopunda x40 objektif ile yapılmıştır. Sayım için reaktif hiperplazilerde germinal merkezler, FL'larda ise neoplastik folliküller seçilmiştir. Doku kesitlerinde toplam 10 alanda rastgele seçilen 1000 hücre sayılmıştır. PCNA boyanma indeksi,

pozitif hücrelerin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Bcl-2 değerlendirmesinde mantle zonda ve interfolliküler bölgede boyanma gözlenirken follikül içi boyanma göstermeyen olgular negatif olarak değerlendirilmiştir. Hem follikül içinde hem de interfolliküler alanda boyanma gösteren olgular pozitif olarak kabul edilmiştir.

Klasik tanı kriterlerinin; bcl-2 ve PCNA immunreaktivitesi ile olan ilişkilerini belirlemede Fisher'in tam olasılık (exact) testi ve t testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Histopatolojik incelemede FL ve FH olguları arasındaki ayrım, klasik tanı kriterlerine göre ele alındığında tüm olgularda kesin sonuç elde edilememektedir. Folliküllerin uniform hücrelerden oluşması ve neoplastik hücrelerin kapsülü infiltre etmesi en güvenilir bulgular olarak saptanmıştır. Her iki bulgu da FL olgularının tümünde saptanırken FH olgularının hiçbirisinde izlenmemiştir (Tablo-1)

Çalışmada kullanılan iki immunohistokimyasal belirleyiciden birisi olan bcl-2'nin pozitifliği diffüz ya da ince granüler, sitoplazmik boyanma şeklinde izlenmiştir. Bcl-2 negatif olgularda folliküllerin içi negatif, mantle zon ve interfolliküler alanlar ise pozitif olarak saptanmıştır. Bcl-2 pozitif olgularda ise tam tersi bir boyanma izlenmiş; folliküllerin içi pozitif, interfolliküler alanlar negatif boyanmıştır. Bazı olgularda ise tüm alanlar pozitif boyanmıştır. Bu şekilde değerlendirildiğinde FL olgularının %87.8'i bcl-2 pozitif, %12.2'si bcl-2 negatif olarak saptanmıştır (Resim 1). FH olgularının ise tümü bcl-2 negatif olarak değerlendirilmiştir. (Resim 2) (Tablo-1). Bcl-2 boyanması

Morfolojik Özellikler	FL(%)	FH(%)
Lenf nodu yapısı silinmiş	78.8	-
Folliküller korteks - medullada	100	16.6
Folliküller düzenli-yuvarlak şekilde	93.9	13.3
Folliküller uniform boyutlarda	87.8	13.3
Follikül sınırları belirsiz	78.7	-
Mantle zon yok	87.9	-
Interfolliküler alan infiltre	90.9	-
"Yıldızlı gök" görünümü yok	75.8	-
Uniform hücre topluluğu	100	-
Kapsül infiltrasyonu var	100	-
Vasküler invazyon var	45.4	-
Immunohistokimyasal özellikler	FL(n)	FH(n)
Bcl-2 pozitif	29	0
Bcl-2 negatif	4	30

Tablo 1 : FL ve FH olgularında morfolojik bulguların oranı

yönünden kıyaslandığında, FH olgularının FL'ya göre istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde negatif boyandığı saptanmıştır ($p < 0.005$). FL ve FH olgularında izlenen bcl-2 boyanma oranları ayırıcı tanıda bcl-2'nin güvenilir bir kriter olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak olguların tümü klinik olarak izlenemediği için prognoza yönelik klinikopatolojik bir korelasyon kurulamamıştır.

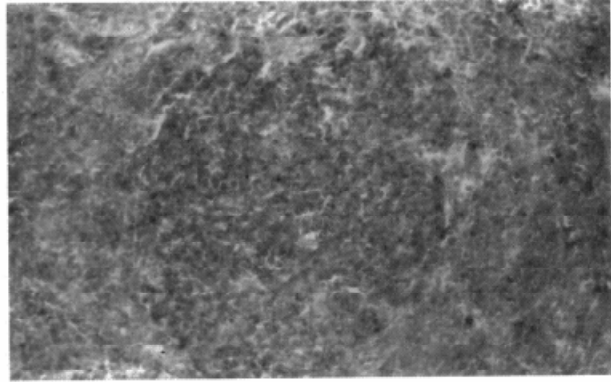
Diğer immunohistokimyasal belirleyici olan PCNA pozitifliği nükleuslarda granüler ya da diffüz boyanma şeklinde izlenmiştir. Proliferasyon kapasitesinin çok fazla olduğu germinal merkezler ve neoplastik folliküller çok yoğun boyanma gösterirken interfolliküler alanlarda az sayıda hücrede pozitiflik görülmüştür. FH olgularında germinal merkezlerdeki hücrelerin ortalama 46.8 ± 2.2 'sinde PCNA pozitifliği izlenmiştir (Resim 3). FL olgularında ise follikül merkezlerindeki PCNA indeksi 13.28 ± 1.7 olarak belirlenmiştir (Resim 4). FL ve FH olguları PCNA indeksleri yönünden istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde anlamlı bir fark gösterdikleri dikkati çekmiştir ($p < 0.005$).

TARTIŞMA

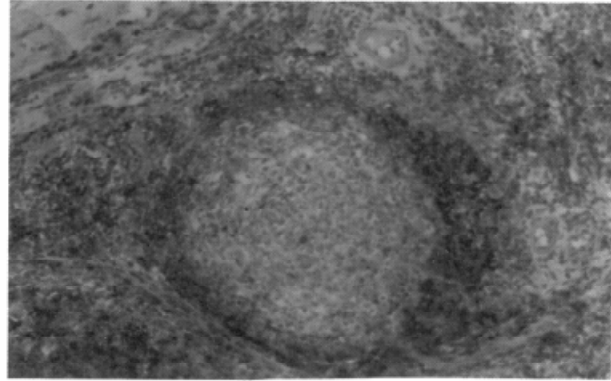
Hematopatolojideki klasik tanı sorunlarından birisini oluşturan FL ve FH arasındaki ayırım son yıllara kadar temel histolojik tanı kriterlerin ışığında yapılmıştır. Ancak bu çalışmada değerlendirilen FL olgularında da vurgulandığı gibi histolojik bulguların hiçbirisi tanı için mutlak ve kesin bir kriter olarak değerlendirilemez. Bu nedenle morfolojik tanı kriterleri yanısıra yeni immun belirleyicileri kullanmak ayırıcı tanıda yardımcı olabilir.

FL olguları histolojik tanı kriterlerine göre incelendiğinde ayırıcı tanıda en güvenilir bulgunun uniform hücrelerden oluşmuş folliküller ve kapsül invazyonu olduğu görülmektedir. Bu iki bulgu tüm FL olgularında saptanırken FH olgularının hiçbirisinde izlenmemiştir. Görüldüğü gibi yalnızca histolojik bulgularla tanı koyarken tüm kriterlerin ayrı ayrı dikkatle değerlendirilmesi mutlak bir zorunluluktur.

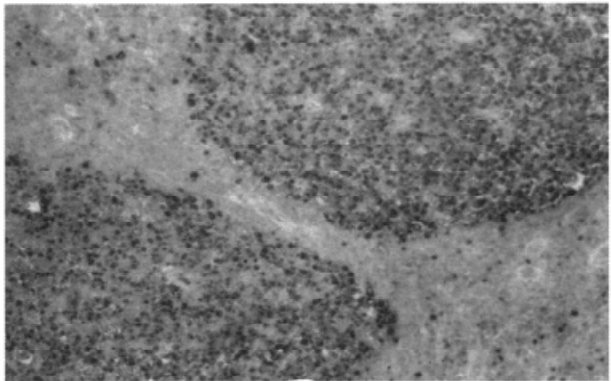
Ayırıcı tanıda histolojik kriterlerin kesin sonuç vermediği olgularda kullanılabilecek belirleyiciler arandığında yeni bir onkoprotein olan bcl-2 çalışma alanına girmiştir. Bcl-2'nin lokalizasyonunu araştıran çalışmalarda, bunu diğer tüm onkoproteinlerden ayıran bir özelliği olduğu, bcl-2 onkoproteininin iç mitokondrial membranda yerleştiği saptanmıştır⁽⁶⁾. Bu lokalizasyon bcl-2 onkoproteininin hücresel yaşam düzeneğindeki etkisi ile uyumludur. Deneysel çalışmalarda bcl-2'nin apoptozisi önlediği ve bir anlamda "apoptozis antidotu" olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür⁽⁷⁾. Bu



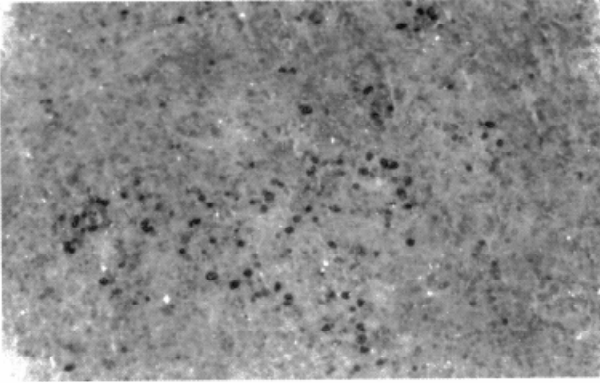
Resim 1 : FL'da bcl-2 immunreaktivitesi. Follikül içi pozitif, interfolliküler alan negatif olarak izlenmekte (Anti-bcl-2x200).



Resim 2 : FH'de bcl-2 immunreaktivitesi. Germinal merkez negatif, mantle zon pozitif olarak izlenmekte (Anti-bcl-2x200).



Resim 3 : FH'de germinal merkezlerde yoğun PCNA pozitifliği (Anti-PCNAx200).



Resim 4 :FL'da düşük yoğunlukta PCNA boyanması (Anti-PCNAx200)

olayın düzenekleri tam olarak ortaya konmamış olmakla birlikte serbest oksijen radikallerinin hasarı sonucu ortaya çıkan apoptozisi önlemek için bcl-2'nin öncelikle antioksidan süreçleri düzenlendiği düşünülmektedir⁽⁶⁾. Bu etki bir yandan ortamdaki hücre sayısının artışına yol açarken bir yandan da yaşam sürelerinin uzamasına bağlı sekonder genetik değişikliklere zemin hazırlamaktadır. Hücrelerin proto-onkogenleri ve tümör süpresör genleri etkileyen farklı mutasyonlarla karşı karşıya kaldığı kabul edilmektedir⁽⁹⁾. Bcl-2'nin FL patogenezindeki yerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Sonuçlar, bcl-2 aktivasyonunda yalnızca t(14;18) translokasyonunun rolü olmadığını düşündürmekte, onkoproteini aktive eden henüz saptanamamış somatik mutasyonların ya da kırılma noktalarının varlığı olasılığını güçlendirmektedir⁽¹⁰⁾.

Farklı hematopoetik tümörlerde ve reaktif lenfoid hiperplazilerde bcl-2 boyanmasını değerlendiren Zutter FL'da %100, Utz ise %89 bcl-2 pozitifliği saptamış iken FH olgularında bcl-2'yi tamamen negatif bulmuşlardır (Tablo-2)^(3,11). Çalışmamızdaki FH olgularının tümünde Zutter ve Utz'un

sonuçlarıyla uyumlu olarak bcl-2 boyanması negatiftir. FL olgularında ise istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde bcl-2 pozitifliği görülmektedir. Yalnızca FL serisinde çalışan Gaulard 140 olgunun 119'unda (%85), Pezzella ise 43 olgunun 37'sinde (%86) bcl-2 pozitifliği saptamışlardır⁽¹²⁻¹³⁾. Bu sonuçlar, yalnızca morfolojik bulgular ile ayırıcı tanı yapılamayan soğunlu olgularda bcl-2 immunreaktivitesinin güvenilir bir belirleyici olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada araştırılan ikinci konu FH ve FL ayırımında proliferatif belirleyicilerin tanıyı desteklemekdeki rolüdür. Birçok tümörde incelenen proliferasyon antijenleri arasında en sık kullanılanlar Ki 67 ve PCNA'dır. Bu belirleyiciler, aktif proliferasyon gösteren hücrelerden oluşan lenfoid dokudaki germinal merkez hücrelerinde yoğun bir boyanma gösterirler. Dolayısıyla reaktif FH'de çok yoğun pozitiflik beklenmektedir. FL'da ise germinal merkez hücrelerini blastik transformasyonu aşamasında farklı proliferasyon kapasitesine sahip hücre klonlarından birinin çoğalması söz konusudur. Bu nedenle ortaya çıkan tümörün proliferatif aktivitesi değişken olmaktadır.

Smith ve arkadaşlarının⁽¹⁴⁾ yapılan çalışmada reaktif germinal merkezlerde PCNA indeksi %43-50 arasında değerlendirilmiştir. Kamel ve arkadaşları da⁽¹⁵⁾ reaktif germinal merkezlerdeki PCNA indeksini yaklaşık %50 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda FH'de elde edilen %46.8 oranındaki PCNA indeksi, Smith ve Kamel'in PCNA değerleri ile uyumludur. Çalışmamızda FL grubundaki PCNA indeksi ise %13.28 olarak belirlenmiştir. FL ve FH olguları, elde edilen PCNA indeksleri açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde FH'de PCNA indeksinin anlamlı şekilde yüksek bulunduğu görülmüştür. (p<0.005). PCNA boyanması FL'da neoplastik folliküllerde, FH'de ise germinal merkezlerde yoğunlaşmaktadır. NHL'larda proliferatif belirleyici olarak PCNA'yi kullanan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sebon'un⁽¹⁶⁾ çalışmasında, PCNA indeksinin lenfomanın histolojik tipi ile orantılı olarak değiştiği, lenfomanın histolojik derecesi yükseldikçe PCNA indeksinin de yükseldiği gösterilmiştir. Krokolopoulou ve arkadaşları⁽¹⁷⁾ da düşük, orta ve yüksek dereceli NHL'lar arasında PCNA indeksi yönünden anlamlı bir farkın varlığına işaret etmekte, yüksek dereceli histolojik tiplerde PCNA skorunun da yüksek olduğunu vurgulamaktadır.

Yaptığımız çalışmada, FL ve FH ayırımında etkinliği araştırılan bcl-2 ve PCNA'nın, histolojik bulgulara ek olarak kullanılabilecek iki güvenilir belirleyici olduğu gözlenmiştir. Özellikle PCNA'nın histolojik altgrup ile uyumlu ilişki göstermesi nedeniyle prognostik bir belirleyici olarak kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Ancak bcl-2'nin prognostik açıdan değerinin kesin olarak anlaşılabilmesi için ayrıntılı klinikopatolojik çalışmalara gerek vardır.

Araştırmacı	FL		FH (%)
	n	%	
Zutter (11)	16	100	0
Utz (3)	46	89	0
Ayhan	33	87.8	0
Gaulard (12)	140	85	-
Pezzella (13)	43	86	-

Tablo 2 :Farklı serilerde FL ve FH olgularında bcl-2 pozitifliği

KAYNAKLAR

1. Weiss L.M., Warnke R.A., Sklar J, Cleary ML: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Eng J Med* 1987; 317:1185-1189.
2. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM : Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation, *Science* 1984; 226: 1097-1099.
3. Utz GL, Swerdlow SH: Distinction of follicular hyperplasia from follicular lymphoma in B5 fixed tissues: Comparison of MT2 and bcl-2 antibodies. *Human Pathol* 1993; 24: 1155-1158.
4. Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonalds - Bravo H: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326: 515-517.
5. Swerdlow SH, Westermann CD, Pelstring RJ, Saboorian MH, Williams ME; Growth fraction in centrocytic and follicular center cell lymphomas. *Human Pathol* 1993; 24: 540-546.
6. Hockenbery DM, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-336.
7. Kondo E, Nakamura S, Onoue H, Matsuo Y, Yoshino T, Aoki H et al: Detection of bcl-2 protein and bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Blood* 1992; 80: 2044-2051.
8. Hockenbery DM: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
9. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.
10. Seto M, Jaeger U, Hockett RD, Graninger W, Bennet S, Goldman P et al; Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the bcl-2-lg fusion gene in lymphoma. *EMBO J* 1988; 7: 123-131.
11. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ: Immunolocalization of the bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 1991; 78: 1062-1068.
12. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny WP et al: bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 140: 1089-1095, 1992.
13. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-232.
14. Smith FG, Murray PG, Crocker J: Correlation between PCNA and AgNOR scores in nonHodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol* 46:28-31, 1993.
15. Kamel OW, LeBrun DP, Davis RE, Berry GJ, Warnke RA: Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin - embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2. *Am J Pathol* 1991; 138: 1471-1477.
16. Sebo TJ, Roche PC, Witzig TE, Kurtin PJ: Proliferative activity in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol*; 99; 668-672.
17. Korkolopoulou P, Patsouris E, Pangalis G, Tsenga A, Elemanglou J, Tsangli ET et al; A comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen, c-myc, p53 and nucleolar organizer region staining in non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 1993; 24: 371-377.