
Problematika molekulárně genetického stanovení prognostických faktorů u karcinomu prostaty: pilotní studie

Dvořáčková J., Uvírová M.
CGB laboratoř spol. s r.o., Ostrava

Souhrn

Ztráta části chromosomu 8p22 a amplifikace oblasti 8q24 (oblast onkogenu c-myc) jsou nejčastější chromosomální aberace pozorované u karcinomu prostaty. Cílem bylo prokázat častost těchto chromosomálních abnormalit a posoudit jejich souvislost s prognózou pacientů s karcinomem prostaty.

Ze sledovaného souboru 130 pacientů byla vybrána skupina 17 pacientů, kteří zemřeli do pěti let po stanovení diagnózy. Pro nedostatek nádorových buněk v punkčních biopsiích se podařilo uskutečnit hybridizaci in situ a objektivně posoudit výsledek u 9 pacientů. V 7 případech byla nalezena amplifikace oblasti pro onkogen c-myc, avšak u 5 z nich byla prokázána zároveň polyploidie chromosomu 8. Delece části chromosomu 8p22 (oblasti pro gen LPL) byla nalezena u 5 případů. Normální nález byl prokázán u 2 případů. Při analýze však nebylo možno dodržet literárně požadovaný počet 300 vyšetřených nepřekrývajících se nádorových buněk vzhledem ke kvalitě archívního bioptického materiálu. Doporučujeme proto vždy zvážit, zda odebraný materiál je pro tuto metodiku dostatečně reprezentativní a zda fixace tkáně není neúměrná nebo nedostatečná.

Klíčová slova: ztráta části chromosomu 8p22 – amplifikace oblasti 8q24 – karcinom prostaty – prognóza

Summary

The Molecular Genetic Assessment of Prognostic Factors in Carcinoma of the Prostate: a Pilot Study

The loss of the 8p22 chromosome part and amplification of the 8q24 region (c-myc oncogene region) are the most frequent chromosomal aberrations observed in prostate carcinoma. We aimed to demonstrate the frequency of these chromosomal abnormalities and to assess how they correlate with the prognosis in patients with prostate carcinoma.

From a set of 130 patients, we selected a group of 17 who died within five years after the diagnosis had been determined. Due to the lack of tumor cells in puncture biopsies, we managed to carry out in situ hybridization and assess the result objectively for 9 patients only. In seven cases, amplification of the region for c-myc oncogene was found; however, in five of them, polyploidy of chromosome 8 was manifested simultaneously. Deletion of the 8p22 chromosome part (region for the LPL gene) was found in five cases. A normal finding was detected in two cases. However, the analysis was carried out on a small number of cells gained from paraffin slices, so it was impossible to meet the requirement to examine 300 interphase cell nuclei. Therefore, we recommend to always determine whether the material taken is representative enough for this methodology and whether the tissue fixation is not inadequate or insufficient.

Key words: loss of the 8p22 chromosome part – amplification of the 8q24 region – prostate carcinoma – prognosis

Čes.-slov. Patol., 42, 2006, No. 3, p. 130–132

Je prokázáno, že s progresí karcinomu prostaty je spojeno mnoho chromosomálních abnormalit. Nejčastěji postiženým chromosomem u karcinomu prostaty je chromosom 8 a nejčastějšími chromosomálními změnami jsou delece

8p22 a amplifikace oblasti 8q24. Tyto změny na lokusu 8p22, kde se nachází gen pro nádorový supresor LPL (lipoprotein lipase) jsou u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty spojeny se špatnou prognózou (3). Ztráta heterozygotnosti,

která je popisována až u 69 % karcinomů prostaty, je pak zodpovědná za vznik změn vedoucích ke karcinomu prostaty. Část chromosomu 8q24 je oblastí, na které je lokalizován oncogen c-myc, regulující buněčnou proliferaci a apoptózu. Amplifikace tohoto genu je častější u nádorů s vyšším Gleasonovým skóre (1).

Materiál a metoda

Postup FISH metody: Pro stanovení amplifikace 8q24 nebo delece oblasti 8p22 byla použita metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) na parafinových řezech s využitím sondy Pro Vision Multi-Color Probe firmy Vysis, která obsahuje tři různě značené úseky DNA chromosomu 8. Tenké řezy byly deparafinovány, inkubovány v 0,2 M HCl při laboratorní teplotě 20 minut, inkubovány v roztoku 1M NaSCN (thiocyanát sodný, 98–102 %, titration, Sigma) při 80 °C, natráveny proteázou (protease II, Vysis) při 37 °C po dobu 95 minut, fixovány v 10% pufovaném formalínu při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a usušeny na vyhřívací plotně při 45–50 °C. Sondy a DNA vyšetřovaného vzorku byly současně denaturovány při teplotě 85 °C po dobu 1 minuty a vzorky byly inkubovány po dobu 8–24 hodin při teplotě 37 °C ve vlhké komůrce. Po ukončení hybridizace byla přebytečná a nehybridizovaná sonda vymyta v 0,4x SSC (salt sodium citrate, Vysis)/ 3 % NP (nonylphenylpolyethylene glycol, Vysis) pufru při teplotě 73 °C po dobu 2 minut, vzorky byly opláchnuty v 2xSSC/0,1% NP pufru při laboratorní teplotě 1 minutu a s ohledem na nestabilní fluorochrom usušeny ve tmě. Po dobarvení jader pomocí DAPI II (4,6diamidino-phenylindole, Vysis) byly vzorky přikryty krycím sklem. Bylo hodnoceno 50–100 nepřekrývajících se jader nádorových buněk. Pro každé jádro byl stanoven počet signálů pro oblast 8p22, centromeru chromosomu 8 a oblast 8q24 (gen c-myc).

Hodnocení

- Normální nález: < 10 % buněk s 3 a více signály a < 55 % buněk s jedním nebo 0 signály pro centromeru chromosomu 8.
- Ztráta signálu pro centromeru chromosomu 8: > 55 % buněk s 1 nebo 0 signály pro centromeru chromosomu 8.
- Ztráta signálu pro oblast 8p22: poměr signálů pro oblast 8p22/ signály pro centromeru chromosomu 8 < 0,85.
- Ztráta signálu pro oblast c-myc: poměr sig-

nálů pro oblast 8q24/ signálu pro centromeru chromosomu 8 < 0,9.

- AI (additional increase) tzv. zmnožení signálů: poměr signálů pro oblast 8q24/ signálu pro centromeru chromosomu 8 > 1,3 a > 10 % buněk se 3 a více signály pro oblast 8q24.
- 300 nepřekrývajících se jader.

Sledovaný soubor

K našemu zpracování byl vybrán soubor 17 pacientů s karcinomem prostaty, zemřelých do 5 let od stanovení diagnózy. Z tohoto souboru nádorů bylo úspěšně hybridizováno pouze 9 případů.

Výsledky úspěšné hybridizace jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1. Korelace FISH nálezů s Gleasonovým skóre

Věk (roky)	Skupina Gleason skóre	Delece 8p22	Amplifikace 8q24	Polysomie 8. chromosomu
60	3	ano	ano	ne
90	1	ne	ne	ne
53	3	ano	ano	ano
81	1	ne	ano	ano
68	1	ne	ne	ne
80	2	ano	ano	ne
67	1	ano	ano	ano
65	1	ne	ano	ano
67	2	ano	ano	ano

Skupina GS:

- Skupina č. 1 Gleasonovo skóre 2-4
Dobře diferencovaný adenokarcinom
- Skupina č. 2 Gleasonovo skóre 5-7
Středně diferencovaný adenokarcinom
- Skupina č. 3 Gleasonovo skóre 8-10
Nízce diferencovaný adenokarcinom

Závěr

Z celkového počtu devíti úspěšně hybridizovaných byla v sedmi případech pozorována amplifikace oblasti 8q24, avšak u pěti z nich byla prokázána zároveň polysomie chromosomu 8. Tato situace byla však zaznamenána jak u skupiny nízce diferencovaného adenokarcinomu, tak i u dobře diferencovaného adenokarcinomu. Delece oblasti 8p22 byla nalezena u pěti případů, kde u čtyř bylo zaznamenáno Gleasonovo skóre vyšší než 5. Normální nález byl prokázán u dvou pří-

padů. Analýza však byla provedena na relativně malém počtu nádorových buněk a nebylo možno vyhovět požadavku 300 vyšetřených interfázních jader. Vzhledem k malému počtu vyšetřených případů nebylo zatím prováděno statistické zhodnocení výsledků.

Použití punkční biopsie však pravděpodobně vzhledem k nestandardní fixaci neposkytuje nejvhodnější materiál pro výše uvedenou metodu. Doporučujeme předem standardizovat fixační proceduru, a to používáním pufrovaného formalínu a doby fixace do 24 hodin nebo spíše používat vzorky po prostatektomii.

Diskuse

Nálezy potvrzují literární údaje, podle kterých genetické změny na chromosomu 8 (del 8p22 a amplifikace 8q24) jsou přítomny u karcinomů prostaty ve vysokém procentu (66,7 %) případů. V literatuře však není zmiňována problematika technického zpracování vzorků (délka fixace, použitý konzervační roztok, příprava preparátů pro hybridizaci), která se nám jeví jako významný činitel ovlivňující úspěšnost a standardnost vyhodnocování preparátů po provedené fluorescenční in situ hybridizaci.

Poděkování

Děkujeme pracovníkům laboratoře experimentální medicíny Dětské kliniky FN a LFUP v Olomouci MUDr. M. Hajduchovi a RNDr. R. Trojanovi za cenné rady při zavádění metodiky sondy Pro Vysion Multi-Color Probe firmy Vysis na našem oddělení.

Literatura

1. Kazunari S., Qian S.J., Slezak J.M. et al.: Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, 91, 1999, s. 1574–1580. – 2. Qian J., Hirasawa K., Bostwick D.G. et al.: Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T2-3N1-3M0 prostate cancer are potential markers for cancer progression. *Modern Patol.*, 15, 2002, s. 35–44. – 3. Tsuchiya N., Slezak J.M., Liber M.M., Bergstralh E.J., Jenkins R.B.: Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ, confined prostate cancer genes. *Chrom. Cancer*, 34, 2002, s. 363–371. – 4. Van Deklem H., Alers J.C., Damen I. A. A. J. et al.: Genetic evaluation of localized prostate cancer in a cohort of forty patients: gain of distal 8q discriminates between progressors and nonprogressors. *Lab. Invest.*, 83, 2003, s. 789–796.

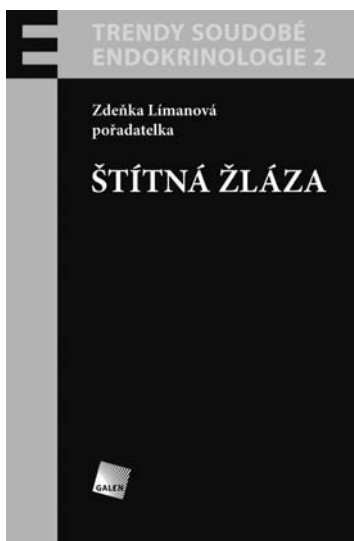
MUDr. Jana Dvořáčková

Na Nivách 23

700 30 Ostrava 3

tel.: 602 724 223, +420 595 700 170

e-mail: dvorackova@pathology.cz



ŠTÍTNÁ ŽLÁZA

Trendy soudobé endokrinologie. Svazek 2

Zdeňka Límanová, pořadatelka

Druhý svazek edice Trendy soudobé endokrinologie je věnován problematice štítné žlázy. Autorský kolektiv zkušených odborníků z několika klinických pracovišť zpracoval dané téma komplexně, od diagnostiky, přes popis jednotlivých onemocnění štítné žlázy až po terapii a genetiku. Publikaci uvítají nejen endokrinologové, ale zajme jistě i praktické lékaře, internisty a lékaře jiných odborností, kteří se s onemocněním štítné žlázy setkávají.

Vydal Galén v roce 2006, ISBN 80-7262-400-8, format 155 x 225 mm, váz., bar., 3712 str., cena 490 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz