

## IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCIA PROTEÍNU ZAP-70 A JEJ VÝZNAM V DIAGNOSTIKE B-CLL

Urbánová A.<sup>1</sup>, Janega P.<sup>1,2</sup>, Masárová K.<sup>3</sup>, Štefániková Z.<sup>3</sup>, Babál P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>2</sup>Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

<sup>3</sup>Klinika hematológie a transfúziológie, Fakultná nemocnica s poliklinikou, pracovisko sv. Cyrila a Metoda, Bratislava, Slovenská republika

### Souhrn

Chronická B-lymfocytová leukémia (B-CLL) je jedna z najčastejších chorôb lymfatického systému u dospelých pacientov. Je známa rôznorodým klinickým priebehom – od benígnych až po infaustné formy. Pre spresnenie diagnózy a určenie správnej terapie sú potrebné spoľahlivé prognostické markery. Perspektívnym sa ukázal byť proteín ZAP-70, ktorý môže byť vo zvýšenej miere exprimovaný leukemickými bunkami pacientov s B-CLL. Dáva sa do súvisu s horšou prognózou pacienta vyžadujúcou intenzívnejšiu terapiu už v začiatkových štádiách.

Základ prezentovanej štúdie tvorilo 20 prípadov biopsií kostnej drene od pacientov s diagnostikovanou B-CLL a 20 kontrolných prípadov bez nádorovej transformácie. Pri spracovaní materiálu bol okrem štandardnej imunohistochemickej metódy využitý aj amplifikačný systém (firmy DakoCytomation®). Výsledok bol hodnotený semikvantitatívne; ako negatívny (menej ako 5 % pozitívnych leukemických buniek), pozitívny (viac ako 30 % pozitívnych leukemických buniek) a nepravidelne pozitívny (medzi 5 % a 30 % pozitívnych leukemických buniek) a následne korelovaný s klinickým hodnotením prognózy pacienta. Výsledok pozitivity bol kontrolovaný aj morfológickou analýzou, určením plochy pozitivity markera ZAP-70 voči celkovej ploche jadier v preparáte. V kontrolných prípadoch bola pozorovaná pozitívita markera ZAP-70 viazaná čisto na T-lymfocyty. Miera jadrovej pozitivity proteínu ZAP-70 pozorovaná v transformovaných B-lymfocytoch vykazovala signifikantnú súvislosť s horšou klinickou prognózou pacienta v prípadoch ak bola hodnotená ako jednoznačne pozitívna, resp. negatívna pri oboch spôsoboch spracovania preparátu. Prípady s nepravidelnou pozitivitou nevykazovali jednoznačnú klinickú koreláciu. Použitie amplifikačného systému s možnosťou využiť nižšiu koncentráciu primárnej protilátky a potlačiť pozitívitu pozadia, zvýšilo kontrast nálezů a redukovalo počet prípadov s hodnotenou nepravidelnou pozitivitou z 30 % (pri bežnom imunohistochemickom spracovaní) na 10 %. Možno konštatovať, že ZAP-70 predstavuje hodnotný prognostický marker chronickej B-lymfocytovej leukémie. Jeho hodnotenie pomocou imunohistochemie je vhodnou metódou pre klinickú prax. Problematickým sa však stáva hodnotenie hranične a nepravidelne pozitívnych prípadov, pri ktorých môže byť nápomocným využitie histochemického amplifikačného systému. Minimalizácia výskytu falošnej pozitivity, resp. negativity vyžaduje striktné kritériá pri hodnotení nálezů.

**Kľúčové slová:** chronická B-lymfocytová leukémia – ZAP-70 – prognóza - imunohistochemia

### Summary

#### Immunohistochemical Detection of ZAP-70 Protein and its Importance in the Diagnostics of B-CLL

Chronic B-lymphocytic leukemia (B-CLL) is one of the most frequent diseases of the lymphatic system in adults. It is known for its variable course – from benign to prospectless forms. Reliable prognostic markers are needed to precify the diagnosis and the correct therapy. The ZAP-70 protein, as a prospective marker, can be highly expressed in leukemic cells of B-CLL patients. It is related to a worse prognosis requiring intense therapy from the beginning.

The present study includes 20 cases of bone marrow trephine biopsy from patients with diagnosed B-CLL and 20 control cases without neoplastic infiltration. The specimens were investigated with standard immunohistochemical technique and with the use of the amplification system (DakoCytomation®). The results were evaluated semiquantitatively as negative (less than 5 %), positive (above 30 %), and irregularly positive (5–30 % of positive leukemic cells) and consecutively correlated with clinical evaluation of prognosis of the patient. The evaluation of the positivity was controlled also by morphometric analysis by determination of the area of ZAP-70 positivity related to the whole area of nuclei in the section. In the control specimens the ZAP-70 positivity was restricted to T-lymphocytes only. The level of the nuclear positivity of ZAP-70 protein detected in transformed B-lymphocytes showed significant correlation with the worse or the better clinical prognosis, respectively. Cases with irregular positivity did not show unambiguous clinical correlation. The use of the amplification system allowed to apply lower concentration of the primary antibody, reduction of background staining and increased the contrast of the findings leading to reduction of irregularly positive cases from 30 % (with routine histochemistry) to 10 %. It can be concluded that ZAP-70 represents a valuable prognostic marker for the chronic B-lymphocytic leukemia. Its evaluation by histochemistry is a suitable method for clinical praxis. Problematic may be the evaluation of borderline irregularly positive cases, in which the use of the histochemical amplification system is helpful. Strictly determined criteria are needed for limitation of inaccurate interpretation of the results.

**Key words:** chronic B-lymphocytic leukemia – ZAP-70 – prognosis – immunohistochemistry

*Čes.-slov. Patol., 45, 2009, No. 2, p. 40–45*

Non-Hodgkinove lymfómy predstavujú asi 3,6 % všetkých nádorových ochorení. Ich výskyt rastie exponenciálne s vekom. Asi 90 % z týchto nádorov vychádza z B-buniek a ich prekursorov. Chronická B-lymfocytová leukémia je najčastejšie diagnostikovanou nádorovou chorobou lymfatického tkaniva u pacientov v dospelom veku. Charakterizuje ju značne rôznorodý klinický priebeh. Aj keď často prebieha indolentne a nevyžaduje prakticky žiadnu liečbu, u časti pacientov dochádza napriek skorej a intenzívnej terapii k rýchlej progresii s infaustným koncom (1).

Úspešnosť terapie B-CLL závisí od správneho a rýchleho stanovenia diagnózy a zvolenia vhodného terapeutického postupu. V tomto procese zohráva bioptická diagnostika nezaštupiteľnú úlohu (21). Všeobecné prognostické faktory využívané v klinickej praxi vrátane hodnotenia štádia ochorenia podľa Raia alebo Bineta (12) sa ukazujú byť nedostatočne prediktívne a nestačia na individuálne posúdenie prognózy každého pacienta (20). Zavádzanie nových markerov a ich korelácia s postupmi využívanými v bežnej praxi vytvára priestor pre lepšiu klasifikáciu ochorenia, umožňuje zrýchlenie a spresnenie diagnostických postupov, ako aj následného manažmentu pacienta a zlepšuje tým celkovú prognózu ochorenia (10).

S diagnózou B-CLL sa spája niekoľko dobre opísaných cytogenetických abnormalít. Viacerí autori zdôrazňujú prognostickú hodnotu prítomnosti, resp. absencie somatických mutácií v hypervariabilných úsekoch (IgV<sub>H</sub>) génov pre ťažké reťazce imunoglobulínov. Pacienti bez mutovanej formy IgV<sub>H</sub> génov majú kratší medián prežívania a vyžadujú intenzívnejšiu formu terapie. Súčasná technika sice umožňuje diagnostiku genetických aberácií charakteristických pre B-CLL, sú ale technicky a finančne náročné. Z týchto dôvodov rastie potreba hodnotenia fenotypových znakov ako prognostických markerov B-CLL. Viaceré z nich, vrátane pozitívne hodnoteného CD38, nepreukázali v posledných štúdiách jednoznačnú koreláciu s celkovou prognózou pacienta (9, 13).

Otázka jednoduchého a bežne dostupného prognostického znaku ostáva preto otvorená. Viaceré publikované práce naznačujú, že v nádorovo transformovaných leukemických bunkách môže byť vo zvýšenej miere exprimovaný zeta asociovaný proteín ZAP-70 (25). Ide o proteín patriaci do rodiny bunkových tyrozínkináz, ktorého prítomnosť bola opísaná vo fyziologických podmienkach v T-lymfocytoch, na NK-bunkách, v mastocytoch (26) a v bazofiloch (14). Význam ZAP-70 v B-lymfocytoch nebol doteraz jednoznačne definovaný. Predpokladá sa úloha v procesoch maturácie nezrelých B-lymfocytov, v procese premeny pro-B buniek na pre-B bunky (2). Zrelými B-lymfocytmi nie je však za fyziologických okolností vôbec exprimovaný. Bojarska-Junak a spol. (4) a Kim a spol. (15) opísali jeho asociáciu s neprítomnosťou mutácie v hypervariabilných úsekoch IgV<sub>H</sub> génov. Ukazuje sa, že prítomnosť exprese ZAP-70 v leukemických bunkách sa spája s agresívnejším klinickým priebehom ochorenia a s horšou úspešnosťou liečby pacientov (7). Pokles exprese ZAP-70 súčasne sleduje úspešnosť terapie.

Proteín ZAP-70 sa teda dá považovať za jeden z možných markerov určujúcich terapeutický prístup. Včasná liečba by bola prospešná pre pacientov s vysokou expresiou ZAP-70 v nádorových lymfocytoch, kým u pacientov s nízkou hladinou tohto proteínu sa nasadenie liečby môže oddialiť. Cieľom práce bolo posúdiť možnosti hodnotenia a následnej kvantifikácie

expresie proteínu ZAP-70 metódou imunohistochemie, s následnou koreláciou výsledkov s klinickou prognózou pacienta.

## MATERIÁL A METÓDY

Základom štúdie je archívny formalínom fixovaný a v parafíne zaliaty bioptický materiál z diagnostických trepanobiopsií kostnej drene z archívu Ústavu patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, odobratý v období od roku 2000 do roku 2005. Základný súbor tvorilo 20 pacientov s diagnózou B-CLL (12 mužov a 8 žien) vo veku od 47 do 81 rokov (medián 59 rokov). Do tohto súboru boli zaradení len tí pacienti, u ktorých boli k dispozícii dostatočné klinické údaje umožňujúce určiť klinickú prognózu ochorenia. Ako kontrola bolo hodnotených 20 prípadov bez nádorového ochorenia, s reaktívnymi zmenami kostnej drene.

Prognóza pacienta bola stanovená na základe štandardne používaných klinických prognostických faktorov, zaradením do klasifikácie podľa Bineta a/alebo Raia (tab. 1, 2) a s ohľadom na ostatné klinické nálezy vrátane rýchlosti progresie ochorenia, prežívania a reakcie na terapiu. Na základe klasifikácie podľa Bineta, resp. Raia malo 35 % pacientov štádium A, resp. 0–I, 20 % štádium B, resp. II a 45 % štádium C, resp. III–IV B-CLL. Po zohľadnení aj ostatných klinických náleзов boli pacienti zaradení podľa prognózy do dvoch skupín: s dobrou prognózou (resp. nízke riziko) – 12 pacientov (60 %) a so zlou prognózou (resp. stredné až vysoké riziko) – 8 pacientov (40 %).

Materiál bol spracovaný štandardne: po deparafinizácii boli rezy revitalizované v citrátovom pufrí (pH 6,0) mikrovlnným žiarením s energiou 750 W počas doby 4,5 minút tak, aby nedošlo k vreniu roztoku. Proces sme opakovali za 60 minút po dobu 3 minúty. Rezy boli následne inkubované cez noc pri izbovej teplote s monoklonálnou protilátkou proti ZAP-70 (anti-ZAP-70, clone 2F3.2 mouse, Upstate Cell Signaling Solution, Lake Placid, NY, USA) pri riedení 1:100 (štandardná imunohistochemická metóda), resp. 1:200 (amplifikačná metóda) v roztoku TRIS (0,05M, pH 7,4). Na detekciu primárnej protilátky boli použité dve metódy: štandardná metóda – detekcia myšou sekundárnou protilátkou značenou chrenovou peroxidázou (Envision HRP mouse, Dako Cytomation, Carpinteria, USA) a amplifikačná metóda (Catalyzed Signal Amplification System®, Dako Cytomation, Carpinteria, USA). Pri nej sa po primárnej inkubácii tkaniva so sekundárnou biotinylovanou protilátkou pristupuje k enzymatickej amplifikácii počtu biotí-

**Tab. 1. Klinický štádiovací systém podľa Bineta. Postihnutými oblasťami sa rozumie zväčšenie krčných, axilárnych či inguinálnych lymfatických uzlín (12)**

ŠTÁDIUM	KLINICKÝ NÁLEZ
A	< 3 postihnuté oblasti
B	> 3 postihnuté oblasti
C	anémia (Hb < 100 g/l) a/alebo trombocytopenia (Tr < 100x10 <sup>9</sup> /l)

**Tab. 2. Klinický štádiovací systém podľa Raia (12)**

Štádium 0	lymfocytóza (> 15,000/mm <sup>3</sup> )
Štádium 1	lymfocytóza (> 15,000/mm <sup>3</sup> ) a lymfadenopatia
Štádium 2	lymfocytóza (> 15,000/mm <sup>3</sup> ), hepato- a/alebo splenomegalia, s/bez lymfadenopatie
Štádium 3	lymfocytóza (> 15,000/mm <sup>3</sup> ), anémia (Hb < 11 g/dL), s/bez hepato- a/alebo splenomegalie, lymfadenopatie
Štádium 4	lymfocytóza (> 15,000/mm <sup>3</sup> ), trombocytopenia (< 100,000/mm <sup>3</sup> ), s/bez hepato- a/alebo splenomegalie, lymfadenopatie



nových molekúl. Tento postup zvyšuje senzitivitu metodiky a umožňuje detekciu aj malého množstva antigénu. Na vizualizáciu reakcie bol použitý 3,3'-diaminobenzidín (Dako, Cytomation, Carpinteria, USA). Následne boli rezy dofarbené hematoxylínom. Ako negatívna kontrola boli použité preparáty bez inkubácie s primárnou protilátkou, ako pozitívna kontrola vzorky kostnej drene pacientov s akútnou T-lymfocytovou leukémiou.

Po spracovaní a zafarbení boli rezy hodnotené optickým mikroskopom (Leica DM 2000, Wetzlar, Germany). Ako špecifická bola hodnotená jadrová pozitivita ZAP-70 leukemických buniek. Bunky sme identifikovali prostredníctvom fenotypových znakov (pozitivita CD5, CD20, CD43, CD45, CD79a), ktoré sú pre nádorový infiltrát charakteristické. Pri hodnotení sme sa sústredili na histologické charakteristiky nálezu: typ a percento infiltrácie nádorovými bunkami a pozitivitu ZAP-70. Vzhľadom na rôznorodú intenzitu pozitivity boli stanovené kritériá hodnotenia nasledovne: ako negatívny bol označený nálež v prípade keď bolo menej ako 5 % nádorových buniek pozitívnych, ako pozitívny v prípade, že pozitívnych bolo viac ako 30 % nádorových buniek. V ostatných prípadoch bol nálež hodnotený ako nejednoznačne pozitívny.

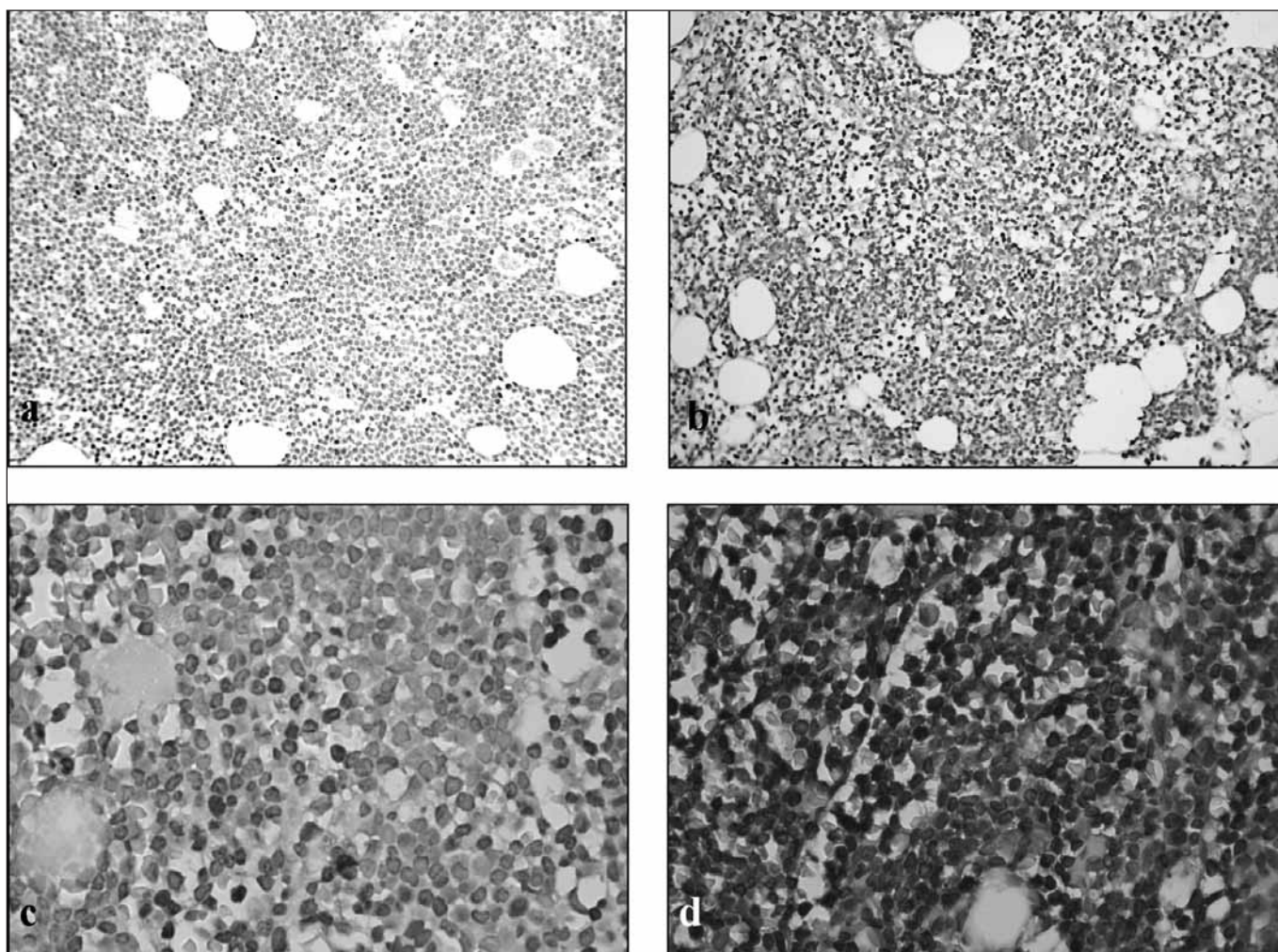
Okrem semikvantitatívneho spôsobu hodnotenia bol materiál hodnotený aj morfológicky. Vzhľadom na riziko falošnej pozitivity prípadných T-lymfocytov sme do úvahy brali len prípady s nodulárnym typom infiltrácie. Hodnotili sme ložiská tvorené homogénnou populáciou nádorových buniek. Obraz sme analyzovali pomocou dvojrozmerného obrazového analyzáto-

ra (ImageJ 1.34n, National Institute of Health, USA). Digitálnou farebnou subtrakciou sme z obrazu izolovali celkovú plochu jadier a následnou farebnou analýzou sme určili podiel DAB pozitivity (hnedá farba) voči celkovej ploche jadier.

Výsledky sme štatisticky zhodnotili prostredníctvom  $\chi^2$ -testu, resp. Fischerovho testu a nepárovým t-testom s Welchovou korekciou.

## VÝSLEDKY

Proteín ZAP-70 vykazoval dobre hodnotiteľnú jadrovú pozitivitu nádorových buniek u všetkých pacientov s B-CLL. Priesorová distribúcia pozitivity markera v preparáte a percento pozitívnych nádorových buniek sa však v jednotlivých prípadoch odlišovali. Výsledky boli hodnotené samostatne v preparátoch farbených štandardnou a amplifikačnou metódou (obr. 1). Pri použití štandardnej imunohistochemickej metódy bola v 9 prípadoch (45 %) pozorovaná jednoznačná ZAP-70 negativita nádorových buniek, v 5 prípadoch (25 %) jednoznačná pozitivita a 6 prípadov (30 %) vykazovalo nepravidelnú pozitivitu ZAP-70. Výsledky získané použitím amplifikačného systému sa v prípadoch s jednoznačnou ZAP-70 pozitivitou a negativitou zhodovali s nálezmi pozorovanými pri štandardnej imunohistochemickej metóde. Vzhľadom na zosilnenie signálu, možnosť použitia vyššieho riedenia protilátky a následnú redukciu nešpecifickej pozitivity pozadia sa dali zatriediť aj 4

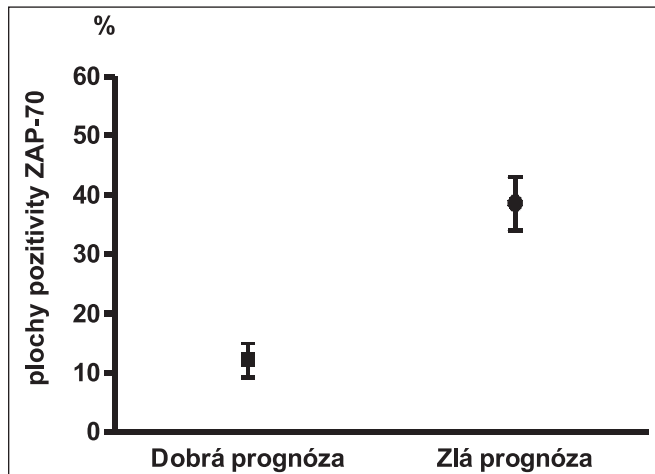


Obr. 1. Histologický obraz jadrovej pozitivity markera ZAP-70 vo vzorkách s B-CLL. Jednoznačne negatívny nálež - menej ako 5 % buniek pozitívnych (a), jednoznačne pozitívny nálež - viac ako 30 % buniek s pozitívnymi jadrami (b). V prípadoch nepravidelnej pozitivity pri štandardnom imunohistochemickom farbení (c) bolo možné zatriediť prípady po použití amplifikačnej metódy spracovania – pozitívny nálež (d). Avidin-biotin-peroxidázový komplex, diaminobenzidín, a, b: 200-krát, c, d: 400-krát

prípady zo 6 hodnotených v predchádzajúcej metodike ako nejednoznačné – 3 prípady ako negatívne a 1 prípad ako pozitívny. V dvoch prípadoch (10 %) sa nález nedal jednoznačne zaradiť a bol hodnotený ako nepravidelne pozitívny (obr. 1).

Infiltrácia kostnej drene nádorovými bunkami tvorila v jednotlivých vzorkách 20 až 90 %. Bol pozorovaný nodulárny, difúzny, ako aj kombinovaný difúžno-nodulárny typ infiltrácie. V 2 prípadoch kombinovanej difúžno-nodulárnej formy infiltrácie sme pozorovali prítomnosť 2 oddelených populácií buniek – ZAP-70 pozitívnych a ZAP-70 negatívnych. Percentuálne zastúpenie ZAP-70 pozitívnych buniek v oboch prípadoch presahovalo viac ako 30 %, preto nálezy boli hodnotené ako pozitívne. Vzájomná korelácia typu a percenta infiltrácie nepreukázala jednoznačnú súvislosť. Vyššie percento infiltrácie kostnej drene sa však signifikantne spájalo so zvýšenou pozitivitou ZAP-70 ( $p < 0,05$ ).

Hodnotenie pozitivity proteínu ZAP-70 nepreukázalo štatistické rozdiely vo frekvencii pozitívnych nálezov medzi jednotlivými pohlaviami ( $p = 0,38$ ), ani z hľadiska rozvrstvenia v rôznych vekových skupinách pacientov ( $p = 0,8$ ). Vzťah medzi pozitivitou markera a klinickým štádiom ochorenia podľa Bineťa bol na hranici štatistickej signifikantnosti ( $p < 0,05$ ). Po zohľadnení aj ostatných klinických nálezov bol preukázaný signifikantný vzťah medzi mierou pozitivity ZAP-70 a celkovo horšou klinickou prognózou pacienta pri použití štandardnej imunohistochemickej techniky ( $p < 0,01$ ), (tab. 3) ako aj v prípadoch, keď bola použitá amplifikačná metóda ( $p < 0,001$ ), (tab. 3). Tieto výsledky boli potvrdené histomorfometrickou analýzou expresie proteínu ZAP-70 v jednotlivých vzorkách (obr. 2). Prípady s klinicky horšou prognózou sa vyznačovali signifikantným vzrastom plochy pozitivity markera ZAP-70 ( $41 \pm 3 \%$ ) oproti prípadom s dobrou prognózou ( $12 \pm 2,7 \%$ ).



Obr. 2. Morfológická kvantitatívna analýza percenta plochy jadrovej pozitivity proteínu ZAP-70 v závislosti od prognózy ochorenia,  $p < 0,05$

Krober a spol. (16). Biologický základ tohto nálezu však zatiaľ nebol objasnený, naznačuje však potrebu opatrného hodnotenia nálezov aj s ohľadom na prítomnosť iných diagnostických znakov.

Napriek dobrej korelácii vyššej pozitivity tohto proteínu s celkovou horšou klinickou prognózou pacienta, problematickým zostáva hodnotenie nejednoznačne pozitívnych nálezov vyplývajúcich z variabilnej intenzity expresie ZAP-70. Exaktné hodnotenie expresie vyžaduje opatrné stanovenie presných hraníc pozitivity, ktoré svedčia pre dobrú, resp. zlú prognózu

Tab. 3. Distribúcia pozitivity proteínu ZAP-70 v korelácii s rozdelením pacientov podľa ich klinickej prognózy pri použití štandardnej imunohistochemickej a amplifikačnej metódy. Nálezy hodnotené ako ZAP-70 pozitívne (+), negatívne (-), resp. nepravidelne pozitívne (+/-)

Klinická prognóza pacientov	ZAP-70 -	ZAP-70 +/-	ZAP-70 +
<b>Klasická imunohistochemická metóda (<math>p &lt; 0,01</math>)</b>			
Dobrá	40 %	20 %	0 %
Zlá	5 %	10 %	25 %
<b>Amplifikačná metóda (<math>p &lt; 0,001</math>)</b>			
Dobrá	55 %	5 %	0 %
Zlá	5 %	5 %	30 %

## DISKUSIA

Detekcia nových perspektívnych markerov chronickej B-lymfocytovej leukémie, ktoré by presnejšie určili možnosti cielej liečby pacienta a zvyšovali tým jej úspešnosť, je významným trendom súčasnej modernej hematológie. Vzhľadom na zavádzanie metodík molekulárnej patológie počet kandidátnych diagnostických markerov neustále rastie. Vyžadujú však kritické zhodnotenie možností ich reálneho využitia v praxi. ZAP-70 sa už v minulosti ukázal ako potentný marker. Súčasný výskum sa orientuje na overenie jeho prognostickej hodnoty, a to aj v porovnaní s inými bežne využívanými markermi (25). Vysoké percento korelácie ZAP-70 pozitivity nádorových buniek so zlou prognózou pacienta sa ukázalo aj v našej hodnotenej skupine. Väčšina publikovaných prác potvrdzuje túto koreláciu. ZAP-70 nie je však jednoznačným diagnostickým znakom. Admirand a spol. (2) označili ZAP-70 ako vysoko špecifický (98 %) marker s nižšou senzitivitou (78 %), čo by mohlo vysvetľovať aj nami sledovaný nález ZAP-70 negativity u jedného pacienta, ktorý bol klinicky jednoznačne zaradený do vysoko rizikovej skupiny so zlou prognózou. Podobnú diskordanciu pozitivity u vysoko rizikového pacienta opisujú aj

pacienta. Rôznorodosť intenzity expresie tohto markera bola opísaná medzi jednotlivými prípadmi, a to aj u pacientov s rovnakým prognostickým zaradením (17). Potreba štandardizovaných princípov hodnotenia sa preto stáva základným problémom pre zavedenie tohto markera do bežnej diagnostickej praxe. Základom našej práce bolo semikvantitatívne hodnotenie expresie ZAP-70. Takýto spôsob hodnotenia je bežne používaný v imunohistochemickej praxi. Ako ZAP-70 pozitívne sme hodnotili bunky s nukleárnou pozitivitou, bez ohľadu na intenzitu a stupeň cytoplazmatickej pozitivity. Podobný spôsob hodnotenia opisujú vo svojej práci Admirand a spol., (2). Na rozdiel od menovanej práce, ktorej autori hodnotili nález ako pozitívny ak obsahoval viac ako 20 % pozitívnych buniek a ako negatívny ak ich bolo menej, sme stanovili prísnejšiu percentuálnu hranicu ZAP-70 negativity a pozitivity (5 %, resp. 30 % pozitívnych buniek). Toto hodnotenie bolo vybrané s cieľom jednoznačne rozlíšiť pozitívne prípady od negatívnych a minimalizovať tak riziko výskytu falošnej pozitivity. Na možnosť zvýšeného výskytu falošnej pozitivity, resp. falošnej negativity práve v prípadoch intermediálnej ZAP-70 pozitivity upozornili vo svojej práci aj Wiestner a spol. (25).

Vzhľadom na zvolené prísne kritériá, v časti prípadov po štandardnom spracovaní materiálu nebolo možné jednoznačne zaradiť nález (medzi 5–30 % pozitívnych nádorových



buniek). V týchto prípadoch sa ukázala byť užitočná amplifikačná metóda. Výhodou tejto metódy nie je len väčšia senzitivita, ale aj vyššia špecificita hodnotenia, zabezpečená možnosťou použitia nižšej koncentrácie primárnej protilátky. Zvýšením kontrastu nálezu a elimináciou pozitivity pozadia bolo možné jednoznačne zatriediť 4 prípadoch zo 6 s neurčitou pozitívou. Zdá sa, že využitie amplifikačnej metodiky môže byť prospešné práve v prípadoch s nejednoznačnou pozitívou nálezu.

V dvoch prípadoch s kombinovaným difúzo-nodulárnym typom infiltrácie sme pozorovali prítomnosť 2 populácií nádorových buniek – ZAP-70 pozitívnych aj negatívnych – vytvárajúcich morfológicky oddelené skupiny. Keďže percentuálne zastúpenie ZAP-70 pozitívnych buniek v týchto prípadoch presahovalo nami určenú hranicu pozitivity, hodnotili sme tieto preparáty ako pozitívne. Daný nález by však mohol svedčiť pre výskyt 2 klonov nádorových buniek u chronickej B-lymfocytovej leukémie. V závislosti od prítomnosti somatických mutácií v hypervariabilných úsekoch génov pre ťažké reťazce imunoglobulínov sa rozlišujú 2 podtypy chronickej B-lymfocytovej leukémie. Bunky, ktoré nevykazujú túto mutáciu vznikajú klonovou proliferáciou naivnej (pregerminálnej) B-bunky, naproti tomu bunky s prítomnosťou týchto mutácií pochádzajú z vyzretých pamätových (postgerminálnych) B-buniek (19). Nie je možné vylúčiť súčasnú koexistenciu oboch nádorových populácií u jedného pacienta. Takýto nález dokázaný ďalšími markermi bol už v minulosti opísaný v iných prácach (11).

Imunohistochemia je vhodnou metódou pri stanovovaní pozitivity proteínu ZAP-70. Kľúčovým problémom zostáva ale interpretácia výsledkov aj s ohľadom na rozdielnu špecificitu a senzitivitu nálezov. Wiestner a spol. (25) preukázali veľmi dobré výsledky v citlivosti hodnotenia expresie ZAP-70 použitím metód molekulárnej genetiky. Ich technická a finančná náročnosť však znižuje možnosť širšieho využitia v diagnostike. Prietoková cytometria, ako najčastejšie používaná metóda, vykazuje nižšiu konkordanciu s pozitívou proteínu ZAP-70 (6) a vyžaduje opatrnosť pri interpretácii vzhľadom na možný výskyt falošne pozitívnych výsledkov (17). Zaujímavá by sa mohla stať metodika priamej detekcie hladiny proteínu Western-blotom, naráža však na potrebu dokonalej separácie nádorových buniek. Kontaminácia vzorky T-bunkami vedie k falošnej pozitívite nálezu. Imunohistochemia predstavuje jednoduchú a relatívne lacnú metódu na detekciu expresie proteínu ZAP-70. Jej výhoda spočíva v možnosti posúdenia nielen intenzity pozitivity, ale aj v možnosti morfológického odlíšenia jednotlivých buniek. Naše výsledky poukazujú na potrebu kritického hodnotenia najmä prípadov s intermediálnou expresiou ZAP-70. Podobné závery pri použití imunohistochemie na detekciu ZAP-70 publikovali aj Wiestner a spol. (25).

Aby bolo možné objektivizovať nálezy expresie proteínu ZAP-70, pokúsili sme sa využiť okrem semikvantitatívneho hodnotenia aj kvantitatívne hodnotenie pomocou digitálnej morfometrie. Takýto prístup nebol doteraz v dostupnej literatúre publikovaný. Predstavuje potenciálne možný spôsob exaktniejšieho hodnotenia markera. Preukázali sme významný nárast pozitivity markera v prípadoch s nodulárnym typom infiltrácie kostnej drene u pacientov so zlou klinickou prognózou. Pre reálne využitie tejto metódy aj v prípadoch s iným ako nodulárnym typom infiltrácie však bude potrebné prístupit k hodnoteniu koexpresie markera ZAP-70 a fenotypových znakov charakteristických pre B-lymfocyty. Tento prístup si vyžaduje overenie na širšom súbore pacientov.

Nezodpovedanou otázkou zostáva, či zvýšenie tvorby ZAP-70 je výsledkom malígnej transformácie, alebo sa na nej priamo podieľa. Súčasné vedomosti naznačujú, že zmeny v dráhe aktivácie lymfocytov, v ktorej hrá ZAP-70 kľúčovú úlohu, môžu úzko súvisieť aj s aktiváciou apoptózy. Tento fakt je pri B-CLL mimoriadne dôležitý. Bolo dokázané, že narušená regulácia apoptózy sa významnou mierou podieľa na akcelerovanej proliferácii leukemických buniek. Naš nález nehomogénnej ZAP-70 pozitivity poukazuje aj na možnosť aktivácie expresie

ZAP-70 ako na následok rôzneho stupňa diferenciácie nádorovo transformovanej bunky. Zodpovedanie týchto otázok zostáva výzvou do budúcnosti. Pochopenie procesov, ktoré sa odohrávajú v bunkách pri nádorovej transformácii, je dôležité aj pri vývoji nových terapeutických možností u pacienta.

ZAP-70 predstavuje pomerne hodnotný prognostický marker chronickej B-lymfocytovej leukémie. Jeho histochemické určovanie prináša špecifickú a senzitivnú metódu pre využitie v praxi, vyžaduje však kritické hodnotenie nálezu na základe štandardizovaných diagnostických princípov.

## Podakovanie

Realizované s finančnou podporou grantu UK 312/2007

## LITERATÚRA

1. **Abbott, B.L.:** Advances in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2, 2004, s. 448–454.
2. **Admirand, J.H., Rassidakis, G.Z., Abruzzo, L.V., Valbuena, J.R., Jones, D., Medeiros, L.J.:** Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Modern Pathology*, 17, 2004, s. 954–961.
3. **Bogner, C., Sandherr, M., Perker, M. et al.:** Cyclin E but not bcl-2, bax or mcl-1 is differentially expressed in ZAP 70-positive and ZAP 70-negative B-CLL cells. *Ann. Hematol.*, 85, 2006, s. 458–462.
4. **Bojarska-Junak, A., Rolinski, J., Kawiak, J.:** Modification of immunocytochemical ZAP-70 assay for potential clinical application in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 43, 2005, s. 19–23.
5. **Castro, J.E., Prada, C.E., Loria O. et al.:** ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106, 2005, s. 2506–2512.
6. **Catherwood, M.A., Matthews, C., Niblock, R., Dobbin, E., Morris, T.C., Denis Alexander H.:** ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur. J. Haematol.*, 76, 2006, s. 294–298.
7. **Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L. et al.:** Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100, 2002, s. 4609–4614.
8. **Chen, Z., Aston, E., Yu, M.K.:** Loss of Zap-70 and low molecular weight phosphotyrosine phosphatase occurs after therapy in a patient with B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 19, 2005, s. 1503–1505.
9. **Chevalier, P.:** CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.*, 116, 2002, s. 142–150.
10. **Gascoyne, R.D.:** Hematopathology approaches to diagnosis and prognosis of indolent B-cell lymphomas. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 2005, s. 299–306.
11. **Gonzalez-Campos, J., Rios-Herranz, E., De Blas-Orlando, J.M., Martin-Noya, A., Parody-Ruiz-Berdejo, R., Rodriguez-Fernandez, J.M.:** Chronic lymphocytic leukemia with two cellular populations: a biphenotypic or biclonal disease. *Ann. Hematol.*, 74, 1997, s. 243–246.
12. **Hahn, J.M.:** *Innere Medizin*, 3.ed., Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000, s. 556–557.
13. **Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Gardiner, A., Oscier, D.G., Davis, Z., Stevenson, F.K.:** Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood*, 95, 2000, s. 2455–2457.
14. **Kepley, C.L., Wilson, B.S., Oliver, J.M.:** Identification of the Fc epsilonRI-activated tyrosine kinases Lyn, Syk, and Zap-70 in human basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102, 1998, s. 304–315.
15. **Kim, S.Z., Chow, K.U., Kukoc-Zivojnov, N., et al.:** Expression of ZAP-70 protein correlates with disease stage in chronic lymphocytic leukemia and is associated with, but not generally restricted to, non-mutated Ig VH status. *Leuk. Lymphoma*, 45, 2004, s. 2034–2045.
16. **Krober, A., Bloehdorn, J., Hafner, S. et al.:** Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation

- status in chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Oncol.*, 24, 2006, s. 969–975.
17. **Laurenti, L., Petlickovski, A., Rumi, C. et al.:** Comparison of ZAP-70/Syk mRNA levels with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 90, 2005, s. 1533–1540.
  18. **Mačák, J., Plank, L.:** Ne-hodgkinské lmfomy (od Rappaporta po WHO 2001 a dnešek). *Čes.-slov. Patol.*, 43, 2007, s. 39–49.
  19. **Müller-Hermelink, H.K., Catovsky, D., Montserrat, E., Harris, N.L.:** Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In: Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W., ed. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press, 2001, s. 127–130.
  20. **Neil, E.K., Jelinek, D.F.:** B-CLL: is the enigma of disease heterogeneity about to be revealed? *Blood*, 100, 2002, s. 1110–1111.
  21. **Plank, L.:** Possibilities of the prognostic evaluation of lymph node biopsies in chronic lymphocytic leukemia of B origin. *Bratisl.Lek.Listy*, 82, 1984, s. 1180–1189.
  22. **Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G. et al.:** Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 194, 2001, s. 1639–1647.
  23. **Sanz, L., Garcia-Marco, J.A., Casanova, B. et al.:** Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 2004, s. 562–567.
  24. **Schweighoffer, E., Vanes, L., Mathiot, A., Nakamura, T., Tybulewicz, V.L.:** Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity*, 18, 2003, s. 523–533.
  25. **Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S. et al.:** ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome and distinct gene expression profile. *Blood*, 101, 2003, s. 4944–4951.
  26. **Zhang, J., Siraganian, R.P.:** CD45 is essential for Fc epsilon RI signaling by ZAP-70, but not Syk, in Syk-negative mast cells. *J. Immunol.* 163, 1999, s. 2508–2516.

*MUDr. Andrea Urbánová,  
Ústav patologickej anatómie,  
Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave  
Sasinkova 4,  
SK-813 72 Bratislava, Slovenská Republika;  
phone: \*421 2 5935 7249; fax: \*421 2 5935 7592;  
e-mail: andrea.urbanova@fmed.uniba.sk*

## OSOBNÍ ZPRÁVY

### IN MEMORIAM LADISLAV SOKOL

Dvadsaťateho januára tohto roku nás navždy opustil skvelý patológ, dlhoročný primár oddelenia patológie a legenda československého vodného póla Ladislav Sokol. Narodil sa v Užhorode 31. augusta 1941, zmaturoval na strednej všeobecnovzdelávacej škole (SVŠ) v Košiciach. Štúdium medicíny začal v Hradci Králové. Po dvoch rokoch sa z rodinných dôvodov vrátil do Košíc, kde v roku 1964 promoval na Lekárskej fakulte UPJŠ. Jeho prvé miesto na Katedre patologickej anatómie LF UPJŠ mu ponúkol docent Kutlík. V rokoch 1968–1970 pracoval ako sekundárny lekár a od roku 1971 ako primár Ústavu patológie Fakultnej nemocnice v Košiciach. Podieľal sa na riešení úloh klinického výskumu v odbore polychemoterapie malígnych novotvarov. V prvej polovici roku 1971 priniesol profesor Kunštadt z onkológie v Košiciach návrh a projekt na komisionálne riešenie najfrekvencovanejších problémov v onkológii prsníka. Bola zriadená príslušná komisia, pozostávajúca zo zainteresovaných onkológov, chirurgov, gynekológov, rádiológov, endokrinológov ako aj patológov. To sa mu stalo „osudovým“. Diagnostike ochorenia prsníka ostal verný až do konca svojho života. Bol uznávaným odborníkom v tejto problematike v celom Československu, ako aj mimo republiky. V roku 1999 napísal svoje celoživotné dielo *Biopsia mammy*, ktoré venoval svojej manželke a dvom dcéram, ktoré nadovšetko miloval.

Roky 1981–1986 strávil pracovne v Líbii, kde založil a viedol oddelenie patológie. Po návrate na Slovensko založil oddelenie patológie v novej Fakultnej nemocnici na Triede SNP 1 v Košiciach, kde pracoval do konca svojho života, a to doslovne. Počas svojho pôsobenia, prakticky vždy ako primár, vďačne odovzdával svoje vedomosti mladším kolegom. Vedel pomôcť nielen v odbornom ale i súkromnom živote.

Popri vykonávaní náročného povolania, sa stihol aktívne venovať aj športu - vodnému pólu. V rokoch 1954–1962 bol členom TJ VSS Košice a od roku 1962 Červenej hviezdy Košice. Tomuto klubu zostal verný až do konca aktívnej športovej kariéry. Po jej ukončení pracoval dlhé roky ako klubový lekár. So svojím klubom bol v rokoch 1962 – 1975 trinásťnásobným majstrom republiky. Bol stonásobným československým reprezentantom. V roku 1965 dostal ocenenie majster športu a v r. 1972 zaslúžilý majster športu.

Emeritný primár Ladislav Sokol bol skromnou, ale bezpochyby charizmatickou osobnosťou. Neodmysliteľne k jeho osobe patrili aj bicykel, na ktorom sa vozieval denne celý rok, a to aj keď pršalo či snežilo a fúkal vietor.

Rozlúčili sme sa s ním s pocitmi žiaľu a ľútosť. Ostáva však v pamäti a srdci nielen svojich najbližších, ale všetkých, čo ho osobne poznali a mali možnosť s ním spolupracovať a viesť užitočné dialógy.

*Helena Baumöhlová, Košice*

Z obce českých a slovenských patológov jsem znal Ladislava (Laca, Buxiho) Sokola pravděpodobně nejdéle. Na podzim roku 1958 jsme oba nastoupili ke studiu medicíny na Lékařskou fakultu UK v Hradci Králové. On navíc jako student Vojenské lékařské akademie. Laco byl již na začátku studií nepřehlédnutelnou osobností; bylo všeobecně známo, že se vrcholově věnuje vodnímu pólu. Kromě studia a vojenských povinností proto často docházel do zdejších lázní na plavecké tréninky.

Po druhém ročníku se Laco, hlavně z důvodů sportovních, vrátil do Košic, kde na tamní lékařské fakultě dokončil studia. Až později jsem se dozvěděl, že se dal na dráhu patologa. Je zajímavé, že z našeho malého studijního ročníku, který jsme zahájili v Hradci Králové, vzešli čtyři patologové – kromě Laca i Judita (Dita) Florkiewiczová (provd. Suchomelová), Josef Špaček a autor těchto řádků.

S Lacem jsme se pak setkávali nejen profesně, na různých patologických akcích, ale též soukromě – i s rodinami jsme se vzájemně navštěvovali v Hradci i v Košicích. Při těchto příležitostech jsem měl možnost obdivovat, jak velmi miloval svou manželku Júlíi i obě dcery, pro jejichž vzdělání neváhal vynaložit nemalé prostředky.

Laco těžce nesl rozdělení Československa a s českými patology udržoval časté a přátelské styky. Nezapomenutelné bylo slavnostní vědecké, pracovní a přátelské setkání při příležitosti jeho 60. narozenin v roce 2001, které uspořádal v krásném prostředí Vysokých Tater a které pojal jako akci československých patológů. Byl i častým účastníkem Semináře mladých patológů v Lito-myšli.

Jměnem českých patológů se loučím s Ladislavem Sokolem, výborným patologem, přítelem a sportovcem, ale zejména – vzácným člověkem.

*Ivo Šteiner, Hradec Králové*

