

## Συσχέτιση των πρωτεϊνών *bcl-2* και *bax* με την απόπτωση στα αδενώματα της υπόφυσης του ανθρώπου\*

**ΣΚΟΠΟΣ** Το ογκογονίδιο *bcl-2* και το γονίδιο *bax* και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά τους προϊόντα παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της δράσης των πρωτεϊνών *bcl-2* και *bax* και η σχέση τους με την απόπτωση σε 81 αδενώματα υπόφυσης του ανθρώπου. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Οι 60 περιπτώσεις λειτουργικών αδενωμάτων περιελάμβαναν 19 σωματοτρόπα, 16 γαλακτοτρόπα, 10 μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα και 15 κορτικοτρόπα αδενώματα. Οι υπόλοιπες 21 περιπτώσεις αφορούσαν κλινικώς μη λειτουργικά αδενώματα. Οι πρωτεΐνες *bcl-2* και *bax* μελετήθηκαν ανοσοϊστοχημικά και τα αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση συστήματος HistoScore (HSC), που υπολογίστηκε από το γινόμενο του βαθμού του ποσοστού θετικών κυττάρων (1–4) με το βαθμό έντασης της χρώσης (1–3). Τα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν με την τεχνική *in situ* σήμανσης των τελικών υδροξυλομάδων του DNA (ISEL) σε τομές παραφίνης και υπολογίστηκε ο αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ). **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η πρωτεΐνη *bcl-2* ανιχνεύθηκε σε 58% των όγκων, που αφορούσαν 32 (53,5%) λειτουργικά και 15 (71,5%) μη λειτουργικά αδενώματα. Η πρωτεΐνη *bax* ανιχνεύθηκε σε 65 (80%) συνολικά όγκους, από τους οποίους 50 (83,5%) ήταν λειτουργικοί και 15 (71,5%) μη λειτουργικοί. Το *bcl-2* HSC ήταν υψηλότερο στα μη λειτουργικά (4,95) από ό,τι στα λειτουργικά (2,76) αδενώματα σε βαθμό στατιστικώς σημαντικό ( $P=0,02$ ). Όσον αφορά το *bax* HSC, δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ λειτουργικών (5,91) και μη λειτουργικών (5,58) αδενωμάτων. Συνολικά, 45 από τα 81 (55,5%) αδενώματα περιελάμβαναν θετικούς αποπτωτικούς πυρήνες με την τεχνική ISEL. Τα λειτουργικά αδενώματα είχαν υψηλότερο ΑΔ (5,7%) από ό,τι οι μη λειτουργικοί όγκοι (1,92%) και αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P=0,03$ ). Το υψηλότερο ποσοστό θετικών πυρήνων παρατηρήθηκε στα κορτικοτρόπα αδενώματα (6,81%), ακολουθούμενα από τα γαλακτοτρόπα (5,57%), σωματοτρόπα (5,51%) και μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα (4,59%) αδενώματα. Παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση του ΑΔ με την έκφραση της πρωτεΐνης *bcl-2* σε όλους σχεδόν τους τύπους αδενωμάτων και σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό μόνο στα κορτικοτρόπα αδενώματα ( $P=0,02$ ). Αντίθετα, ο βαθμός της απόπτωσης δεν έδειξε να σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης *bax*. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η απόπτωση απαντά κυρίως στα λειτουργικά αδενώματα, με στατιστικώς σημαντική διαφορά από τα μη λειτουργικά. Η έκφραση της πρωτεΐνης *bcl-2* είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή της *bax* και, επιπλέον, είναι στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στα μη λειτουργικά αδενώματα και παρουσιάζει αντίστροφη σχέση με τον αποπτωτικό δείκτη. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το ετεροδιμερές *bcl-2/bax* εμπλέκεται στη ρύθμιση των αποπτωτικών μηχανισμών στα αδενώματα της υπόφυσης του ανθρώπου.

\* Πηγές χρηματοδότησης:

– Ερευνητικό Πρόγραμμα ΚΕΣΥ Ε-52/96 και Ε-53/96

– Εθνικό Πρόγραμμα Ορμονών και Υπόφυσης (NHPP) των Διεθνών Ινστιτούτων Υγείας (NIH), Bethesda, MD, USA

Δ. Σαμπαζιώτης,<sup>1</sup>  
Γ. Κοντογεώργος,<sup>1</sup>  
Ν. Καπράνος<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Παθολογοανατομικό Εργαστήριο,  
ΠΓΝΑ «Γεώργιος Γεννηματάς»  
<sup>2</sup>Μονάδα Μοριακής Παθολογικής  
Ανατομικής, Νοσοκομείο  
«Αμαλία Φλέμινγκ»

Correlation of *bcl-2* and *bax* protein  
expression with apoptosis in human  
pituitary adenomas

*Abstract at the end of the article*

### Λέξεις ευρετηρίου

Αδένωμα υπόφυσης  
Απόπτωση  
*bax*  
*bcl-2*  
Υπόφυση

Υποβλήθηκε 25.10.1999

Εγκρίθηκε 30.10.1999

Η απόπτωση ή «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος» αποτελεί φαινόμενο με μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που διαφέρουν από την τυπική νέκρωση.<sup>1-4</sup> Απαντά σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων και των νεοπλασματικών εξεργασιών.<sup>5</sup>

Στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο εμπλέκονται πολλαπλά γονίδια, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων δρουν ως μοριακοί ρυθμιστές που καθορίζουν το θάνατο ή τη ζωή του κυττάρου μετά από την επίδραση ενός ερεθίσματος. Πολλά από τα γονίδια αυτά είναι ομόλογα μεταξύ διαφόρων ειδών εμβίων όντων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι βασικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί της απόπτωσης έχουν διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Μια από τις κύριες οικογένειες των ανωτέρω γονιδίων είναι αυτή του ογκογονιδίου *bcl-2*. Η *bcl-2* είναι μια πρωτεΐνη 24–26 kD, που εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και ανακαλύφθηκε αρχικά ως γονιδιακή έκφραση χρωμοσωματικής αντιμετάθεσης στο οζώδες λέμφωμα.<sup>6</sup> Η *bcl-2* βρέθηκε ότι συμβάλλει στη νεοπλασματική αύξηση, αναστέλλοντας την απόπτωση,<sup>7</sup> που προάγεται από ορμόνες και κυτταροκίνες, με αποτέλεσμα να παρατείνεται η ζωή του κυττάρου.<sup>8</sup> Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η *bcl-2* αναστέλλει την έκλυση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια,<sup>9-10</sup> το οποίο απαιτείται για την ενεργοποίηση των κασπασών/ICE πρωτεασών, που είναι απαραίτητες στην απόπτωση.<sup>11</sup>

Έχουν αναγνωριστεί αρκετά μόρια ομόλογα της *bcl-2*, ορισμένα από τα οποία (*bcl-xL*, *mcl-1* και *ced-9*) αναστέλλουν επίσης την απόπτωση, ενώ άλλα (*bcl-xS*, *bad*, *bak* και *bax*) την ευοδώνουν. Η ενεργός ισορροπία μεταξύ των αναστολέων και ευοδωτών της δράσης της *bcl-2* αποτελεί έναν από τους κύριους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.<sup>12,13</sup>

Η *bax* (*bcl-2-associated protein X*) είναι η πρώτη πρωτεΐνη που βρέθηκε να εμφανίζει ομολογία με την *bcl-2* σε δύο εξελικτικά διατηρούμενες περιοχές.<sup>14</sup> Η *bax* μπορεί να αυτοδιμεριστεί με το ίδιο το μόριο (ομοδιμερές) ή με την *bcl-2* (ετεροδιμερές) και όταν υπερπαράγεται, τα ομοδιμερή της προάγουν την απόπτωση.<sup>12,15</sup> Αντίθετα, όταν η *bcl-2* είναι σε περίσσεια, τα ομοδιμερή της επικρατούν και τα κύτταρα προστατεύονται από τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η *bcl-2* αναστέλλει την απόπτωση, χωρίς αντίστοιχη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ρυθμίζει αρνητικά την αποπτωτική δράση της *bax* με το σχηματισμό *bcl-2/bax* ετεροδιμερών.<sup>15</sup> Η αναλογία, επομένως, των *bcl-2/bax* αποτελεί ένα ρυθμιστή που ελέγχει το θάνατο ενός κυττάρου ως απάντηση σε ένα αποπτωτικό ερέθισμα.<sup>16</sup>

Χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης *bax* στα κύτταρα καρκινώματος μαστού θεωρείται ότι συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου,<sup>17</sup> ενώ ποντίκια με ανεπάρκεια της *bax* αναπτύσσουν λεμφοειδή υπερπλασία, αλλά παραδόξως και θάνατο των γεννητικών κυττάρων.<sup>18</sup> Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι η *bax* μπορεί να επάγει ή να αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου στο οποίο εκφράζεται, σε συνδυασμό με την παρουσία ή ενεργοποίηση και άλλων μελών της οικογένειας *bcl-2*. Απώλεια επίσης της *bax* προάγει την ογκογένεση στα ποντίκια<sup>19</sup> και πιθανώς στους ανθρώπους.<sup>20</sup> Μελέτες του mRNA και της πρωτεΐνης *bax* έχουν δείξει ότι το μόριο αυτό εκφράζεται ευρέως στους ιστούς σε σχέση με την *bcl-2*, στοιχείο που υποδηλώνει ότι η *bax* έχει και άλλες λειτουργίες εκτός από την αναστολή της δράσης της *bcl-2*.<sup>21,22</sup> Για παράδειγμα, η *bax* έχει αποδειχθεί πως επάγεται άμεσα από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης, σε κύτταρα ευαίσθητα στην ακτινοβολία και πιθανώς να παίζει κάποιο ρόλο στην αποπτωτική εξάλειψη των κυττάρων μετά την έκθεσή τους σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη του DNA.<sup>23</sup>

Αν και το φάσμα των κυτταρικών μεταβολών της απόπτωσης με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι χαρακτηριστικό, είναι δύσκολο να αναγνωριστεί με ακρίβεια ο θάνατος μεμονωμένων κυττάρων με το οπτικό μικροσκόπιο. Η ανίχνευση του κατακερματισμένου ενδονουκλεωσωματικού DNA με την τεχνική της *in situ* σήμανσης των τελικών υδροξυλομάδων (ISEL)<sup>24,25</sup> και η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση των προϊόντων των γονιδίων *bcl-2* και *bax* αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική προσέγγιση της μελέτης της απόπτωσης. Αυτό μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες γύρω από την αποπτωτική κατάσταση και τη ρύθμιση της απόπτωσης. Στα αδενώματα της υπόφυσης το φαινόμενο αυτό παραμένει ακόμα ανεξερεύνητο, δεδομένου ότι οι υπάρχουσες μελέτες είναι περιορισμένες και έχουν κατεξοχήν ερευνητικό περιεχόμενο.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση των επιδράσεων των πρωτεϊνικών προϊόντων του ογκογονιδίου *bcl-2* και του γονιδίου *bax* και η συσχέτισή τους με την αποπτωτική κατάσταση των αδενωμάτων της υπόφυσης του ανθρώπου.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Περιπτώσεις

Μελετήθηκαν 81 χειρουργικά εξαιρεθέντα υποφυσιακά αδενώματα, που συγκεντρώθηκαν από το αρχείο όγκων υπόφυσης του Παθολογοανατομικού Τμήματος του ΠΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς». Η διάγνωση βασίστηκε στην ιστολογική μελέτη

και ανοσοϊστοχημική ανάλυση για όλες τις αδενούποφυσιακές ορμόνες. Για την περαιτέρω ακριβή μορφολογική ταξινόμηση, επιλεγμένα δείγματα μελετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Οι 60 περιπτώσεις λειτουργικών αδενωμάτων περιελάμβαναν 19 σωματοτρόπα, 16 γαλακτοτρόπα, 10 μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα και 15 κορτικοτρόπα αδενώματα, ενώ οι λοιπές 21 αφορούσαν κλινικά μη λειτουργικά αδενώματα. Επιπλέον, μελετήθηκαν 3 μη νεοπλασματικές υποφύσεις προερχόμενες από υλικό νεκροτομών. Σαράντα πέντε από τους ασθενείς ήταν άνδρες και 36 γυναίκες. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 49,93 (εύρος 14–73) έτη στους άνδρες και 44,37 (εύρος 18–65) έτη στις γυναίκες. Στα λειτουργικά αδενώματα, τα επίπεδα των αντίστοιχων υπερπαραγομένων αδενούποφυσιακών ορμονών ήταν κατά κανόνα αυξημένα στον ορό όλων των ασθενών. Ένας ασθενής με μικτό σωματοτρόπο-γαλακτοτρόπο αδένωμα έπασχε από πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 1. Επιπλέον, δύο ασθενείς με κορτικοτρόπα αδενώματα είχαν σύνδρομο Nelson, ενώ οι υπόλοιποι από την ίδια ομάδα είχαν διαγνωστεί με νόσο Cushing. Οι ασθενείς με μη λειτουργικά αδενώματα εμφάνιζαν κυρίως κεφαλαλγίες και οπτικές διαταραχές.

Το μέγεθος του όγκου ήταν γνωστό σε 77 περιπτώσεις. Εννέα από τους 56 λειτουργικούς όγκους ήταν μικροαδενώματα, με μέγεθος κάτω του 1 cm, ενώ οι υπόλοιποι 47, όπως και οι 21 μη λειτουργικοί όγκοι, ήταν μακροαδενώματα. Πληροφορίες που αφορούσαν τη φαρμακευτική αγωγή των ασθενών με σωματοτρόπα, γαλακτοτρόπα και μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα αδενώματα πριν από τη χειρουργική επέμβαση ήταν διαθέσιμες σε 27 περιπτώσεις. Από αυτούς, 23 ασθενείς είχαν λάβει προεγχειρητική αγωγή. Οι ασθενείς με αδενώματα που υπερέκριναν GH είχαν λάβει ανάλογα σωματοστατίνες (οκτρεοτρίδη), ενώ αυτοί που παρήγαγαν PRL είχαν αντιμετωπιστεί με αγωνιστές της ντοπαμίνης (κυρίως βρωμοκρυπτίνη).

### Ιστολογική μελέτη

Για την ιστολογική μελέτη, ο ιστός από το αδένωμα που εξαιρέθηκε κατά την επέμβαση, μονιμοποιήθηκε σε διάλυμα 4% ουδέτερης φορμολής, αφυδατώθηκε σε ανιούσες συγκεντρώσεις αλκοόλης, διαυγάστηκε σε ξυλόλη και στη συνέχεια εμπεδώθηκε και εγκλείστηκε σε παραφίνη. Τομές πάχους 4–6 μm επιστρώθηκαν σε πλακίδια προεργασμένα με κόλλα Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) και χρώστηκαν με αιματοξυλίνη-πωσίνη και με την ιστοχημική μέθοδο PAS.

### Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η κλασική τεχνική του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC) σε τομές παραφίνης (Elite Vectastain ABC, Vector). Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικοί αντιοροί έναντι όλων των βασικών αδενούποφυσιακών ορμονών ή των α- και β-υπομονάδων (SU) των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών: GH (1:4000), PRL (1:3000), κορτικοτροπίνης (ACTH, 1:2000), β-θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (β-TSH, 1:2000), β-θυλακιοτρόπου ορμόνης (β-FSH, 1:2000), β-ωχρινοτρόπου

ορμόνης (β-LH, 1:2000) και α-SU (1:2000). Για την επανάκτηση της αντιγονικότητας, προ της εφαρμογής του κύριου αντιορού οι τομές επώαστηκαν σε 0,25 mg/mL διάλυμα προνάσης (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) για 5 min, σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2 και bax, προηγήθηκε ειδικό πρωτόκολλο προεργασίας των τομών για την επανάκτηση της αντιγονικότητας, με επώασή τους σε διάλυμα 0,2% κιτρικού οξέος σε PBS (pH 6,0) για 1 min σε χύτρα πίεσεως. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης bcl-2 (1:350, κλώνος 124, DAKO, Copenhagen, Denmark) και πολυκλωνικός αντιορός έναντι της πρωτεΐνης bax (1:1500, Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ως θετικοί μάρτυρες για την bcl-2 χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί λεμφαδένες και οζώδες Β μη-Hodgkin λέμφωμα και για την bax φυσιολογικό επιθήλιο μαζικού αδένου και πορογενές καρκίνωμα μαστού.

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος περιελάμβανε τα εξής: Προετοιμασία των τομών με αποπαραφίνωση σε κλίβανο 56 °C για 12 ώρες και ξυλόλη, ενυδάτωση σε κατιούσες συγκεντρώσεις αλκοόλης και εκπλύσεις σε νερό βρύσης, φυσιολογικό ορό και PBS (phosphate buffer saline, pH 7,6). Ακολούθησε εξουδετέρωση της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση σε διάλυμα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 20 min σε σκοτεινό θάλαμο, εκπλύσεις σε PBS και εφαρμογή του πρωτοκόλλου επανάκτησης της αντιγονικότητας. Οι τομές, αφού εκπλύθηκαν σε PBS, επώαστηκαν για 20 min σε ορό ίππου ή ορό αίγας, για μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα αντίστοιχα, και ακολούθησε επώαση για 16 τουλάχιστον ώρες με το κύριο αντίσωμα, στους 4 °C σε υγρό περιβάλλον. Ακολούθησαν ενδιάμεσες εκπλύσεις με PBS και επώαση με το συνδεδεμένο με βιοτίνη δευτερογενές αντίσωμα για 40 min και με το διάλυμα συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης για 30 min. Στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν για 4 min σε διάλυμα 0,06% χρωμογόνου 3,3-διαμινοβενζιδίνης (Sigma) σε PBS και 1 μL/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που έδωσε μια έντονη καφέ χρώση στις θέσεις σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος. Τέλος, ακολούθησε αντίχρωση με αιματοξυλίνη Harris για 2 min, ανιούσα αφυδάτωση, διαύγαση, επίστρωση με Eukitt (O. Kinder GmbH & Co, Freiburg, Germany) και επικάλυψη των τομών.

### Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Για την υπερμικροσκοπική μελέτη, επιλεγμένα ιστοτεμαχίδια διαμέτρου περίπου 0,2–0,3 cm από το νερό υλικό του αδενώματος μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 2,5% γλουταραλδεϋδης, σε Sorensen's buffer για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα ιστοτεμαχίδια εκπλύθηκαν σε Sorensen's buffer για 40 min, επαναμονιμοποιήθηκαν σε τετροξειδίο του οσμίου σε σκοτεινό περιβάλλον για 1 ώρα, εκπλύθηκαν με Millioning's buffer για 40 min, αφυδατώθηκαν σε αλκοόλες, διαποτίστηκαν με οξειδίο του προπυλενίου και εμπεδώθηκαν σε μίγμα εποξικών ρητινών (Epon-Araldite). Ημιλεπτες τομές από τους κώνους πλαστικού χρώστηκαν με 1% κυανού της τολουιδίνης και επιλέχθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο οι κατάλληλες θέσεις

για υπερμικροσκοπική μελέτη. Υπέρλεπτες τομές από τους επιλεγμένους κώνους πλαστικού χρώστηκαν με οξικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο. Η μελέτη και φωτογράφιση αντιπροσωπευτικών θέσεων έγινε με τη χρήση διαβιβαστικού μικροσκοπίου τύπου Philips 410LS ή JEM-100CX2 (JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Λεπτομέρειες από τις παραπάνω μεθόδους έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη.<sup>26</sup>

Η υπερμικροσκοπική μελέτη αφορούσε 5 σωματοτρόπα, 3 γαλακτοτρόπα, 3 μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα, 5 κορτικοτρόπα και 13 μη λειτουργικά αδενώματα. Τα τελευταία περιελάμβαναν 8 γοναδοτρόπα αδενώματα και 4 αδενώματα null κυττάρων, από τα οποία 4 ογκοκυτταρικά.

### Μελέτη της απόπτωσης

Ο χαρακτηριστικός περιοδικός ενδονουκλεωσωματικός κατακερματισμός του DNA των αποπτωτικών κυττάρων εκτιμήθηκε με το σύστημα ApopTag (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), με τη χρήση της τεχνικής *in situ* σήμανσης των τελικών υδροξυλομάδων του DNA (ISEL). Τομές παραφίνης πάχους 5  $\mu\text{m}$ , αφού αποπαραφινώθηκαν, ενυδατώθηκαν σε αλκοόλες και εκπλύθηκαν με αποσταγμένο νερό, επωάστηκαν με 60 mg/mL διάλυμα πρωτεΐνης K (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ακολούθησε εξουδετέρωση της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης με διάλυμα 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε σκοτεινό περιβάλλον για 15 min και έκπλυση με PBS. Στη συνέχεια, οι τομές επωάστηκαν με το equilibration buffer, αφού καλύφθηκαν με πλαστική καλυπτρίδα, σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 20 min, και ακολούθως με μίγμα 1:3 ενζύμου τελικής μεταφοράς σε reaction buffer στους 37 °C για 1 ώρα. Η αντίδραση τερματίστηκε σε προθερμασμένο διάλυμα αναστολής (stop/wash buffer) στους 37 °C για 30 min. Οι τομές εκπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με σύμπλεγμα αντι-διγοξινενης-υπεροξειδάσης σε υγρό περιβάλλον για 30 min, αφού καλύφθηκαν με πλαστική καλυπτρίδα. Ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS και εφαρμογή διαλύματος 0,06% χρωμογόνου 3,3-διαμινοβενζιδίνης σε PBS και 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , εμπλουτισμένου με 1 mg/mL χλωριούχο νικέλιο (Sigma). Το τελευταίο προσέδωσε μαύρο χρώμα στις θέσεις σύνδεσης με το DNA. Για αντίχρωση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 2% πράσινου του μεθυλίου σε οξικό νάτριο με προσθήκη 10% διαλύματος οξικού οξέος (τελικό pH 4,0) και ακολούθησε έκπλυση, γρήγορη αφυδάτωση σε αλκοόλες, διαύγαση σε ξυλόλη, επίστρωση και επικάλυψη των τομών. Φυσιολογικοί λεμφαδένες και δείγματα βλεννογόνου λεπτού εντέρου χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, ενώ τομές στις οποίες το διάλυμα της τελικής μεταφοράς υποκαταστάθηκε με reaction buffer, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

### Μετρήσεις

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 και bax ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος Histocore (HSC), που κυμαινόταν από 0 έως 12 βαθμούς, και υπολογίστηκε από το γινόμενο του βαθμού του ποσοστού θετικών κυττάρων (0–5%=0, 5–25%=1, 26–50%=2, 51–75%=3 και 76–100%=

4) με το βαθμό έντασης της χρώσης (1=ήπια, 2=μέτρια και 3=έντονη ανοσοθετικότητα). Αυτές οι μέθοδοι διαβάθμισης έχουν χρησιμοποιηθεί, με καλά αποτελέσματα, σε μελέτες καρκινωμάτων παχέος εντέρου<sup>27</sup> και μη-Hodgkin λεμφωμάτων.<sup>28</sup>

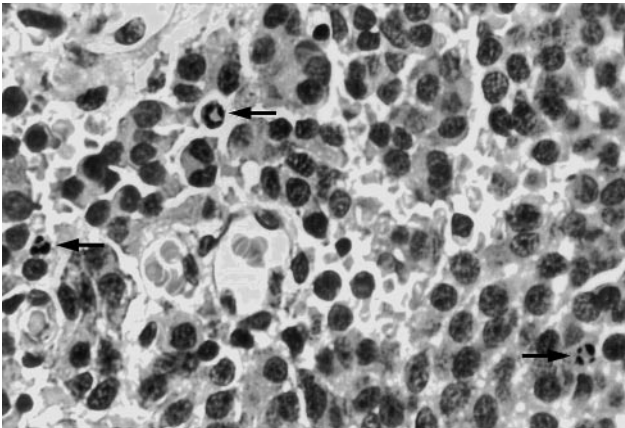
Για την εκτίμηση του αποπτωτικού δείκτη (ΑΔ) φωτογραφήθηκαν περιοχές κάθε όγκου με τελική μεγέθυνση 400 $\times$  και εξετάστηκαν τουλάχιστον 500 πυρήνες. Θετικοί θεωρήθηκαν μόνο πυρήνες που ήταν έντονα, διάχυτα ή μερικά σηματοδωμένα με χαρακτηριστική εικόνα απόπτωσης, όπως περιθωριοποίηση της χρωματίνης ή ημισελήνοειδείς σχηματισμοί. Για την αποφυγή υποεκτίμησης λόγω της ετερογένειας και της σπανιότητας των αποπτωτικών κυττάρων, υπολογίστηκε ο ΑΔ μετρώντας θετικούς πυρήνες από καλά σηματοδωμένες περιοχές. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη χρησιμοποιηθεί, με ικανοποιητικά αποτελέσματα, στην εκτίμηση και άλλων πυρηνικών δεικτών, όπως η βρωμοδεξουριδίνη.<sup>29</sup> Θα πρέπει ωστόσο να τονιστεί ότι ο ΑΔ δεν αποτελεί ακριβή προσδιορισμό του βαθμού απόπτωσης, αλλά βοηθά στην ευχερή εκτίμηση πιθανών διαφορών ανάμεσα στους διάφορους τύπους των αδενωμάτων. Οι μετρήσεις έγιναν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, που αγνοούσαν το μορφολογικό τύπο των όγκων και ο ΑΔ εκφράστηκε ως ο μέσος όρος του ποσοστού των θετικών προς το σύνολο των πυρήνων που μετρήθηκαν.

### Στατιστική ανάλυση

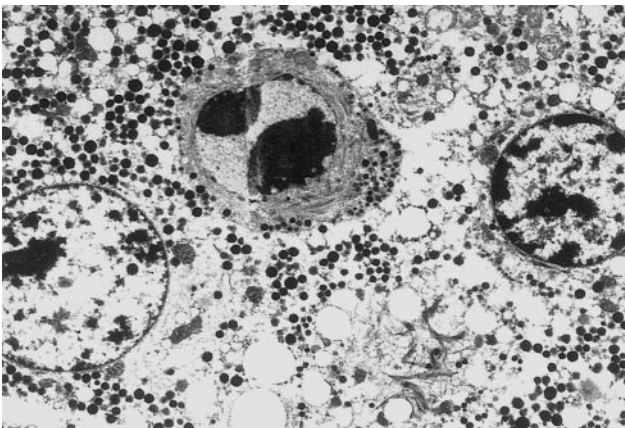
Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test και το Pearson product moment-correlation test. Τιμές P μικρότερες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Επιπλέον, υπολογίστηκε ο συντελεστής συμφωνίας κ για τα ζεύγη τιμών ανάμεσα στους δύο παρατηρητές.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με το οπτικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν ελάχιστα διάσπαρτα αποπτωτικά κύτταρα, συνήθως λιγότερα του 1% του κυτταρικού πληθυσμού. Τα κύτταρα αυτά εμφάνιζαν ελάττωση του κυτταρικού όγκου με συρρίκνωση και νωσινοφιλία του κυτταροπλάσματος, πύκνωση και περιθωριοποίηση της χρωματίνης, ως αποτέλεσμα του κατακερματισμού του DNA. Σε προχωρημένα στάδια, λίγα κύτταρα χαρακτηρίζονταν από απώλεια των μεσοκυττάρων συνάψεων με τα προσκείμενα κύτταρα και από σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων (εικ. 1). Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναγνωρίστηκαν πρώιμες αποπτωτικές αλλοιώσεις, όπως πύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης με ημισελήνοειδείς σχηματισμούς, περιπυρηνική διαύγαση, απώλεια κυτταρικών συνάψεων και αυτολυτικές κυτταροπλασματικές αλλοιώσεις (εικ. 2). Προχωρημένα στάδια χαρακτηρίζονταν από σχηματισμό αποπτωτικών



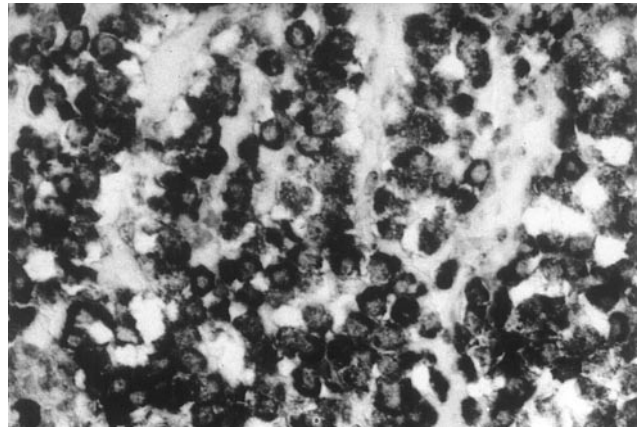
**Εικόνα 1.** Αποπτωτικά κύτταρα (βέλη) σε γαλακτοτρόπο αδένωμα. Παρατηρείται ελάττωση του όγκου των κυττάρων, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, πύκνωση ή περιφερική κατανομή της χρωματίνης και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων. Παρατηρείται επίσης διαυγής άλω λόγω απώλειας των μεσοκυττάρων συνάψεων με τα προσκείμενα κύτταρα (χρώση αιματοξυλίνης-νωσίνης×100).



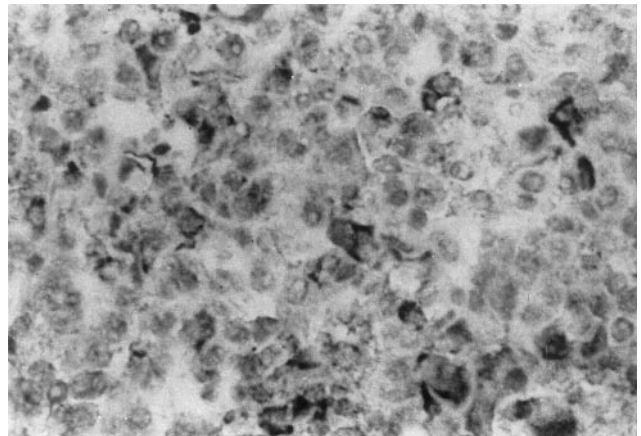
**Εικόνα 2.** Χαρακτηριστική υπερμικροσκοπική εικόνα απόπτωσης σε κύτταρο κορτικοτρόπου αδενώματος. Παρατηρείται πύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης με δύο ημισελήνοειδείς σχηματισμούς στην περιφέρεια. Στο κυτταρόπλασμα αναγνωρίζονται ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης, που φέρονται παράλληλα και σχηματίζουν δεμάτια. Τα ινίδια αυτά αποτελούν μορφολογικό χαρακτηριστικό των κορτικοτρόπων κυττάρων (μεγέθυνση×3000).

σωματίων και αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα των παρακείμενων κυττάρων.

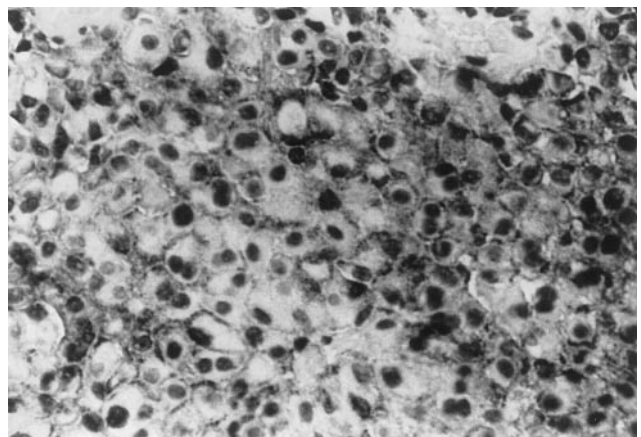
Η ανοσοθετικότητα για bcl-2 και bax εντοπίζονταν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, τόσο στη φυσιολογική αδενούπόφυση, όσο και στα αδενώματα. Επιπλέον, η πρωτεΐνη bcl-2 εμφάνιζε χαρακτηριστική παραπυρηνική ή περιπυρηνική δακτυλιοειδή κατανομή (Golgi pattern) (εικ. 3). Αν και η ανοσοθετικότητα ήταν ομοιογενής, ο βαθμός της έντασης παρουσίαζε διακύμανση (εικ. 4). Η πρωτεΐνη bcl-2 ανιχνεύθηκε σε 58% των όγκων, που αφορούσαν 32 (53,5%) λειτουργικά και 15 (71,5%) μη λειτουργικά αδενώματα. Ειδικότερα, ανοσοθετικότητα



**Εικόνα 3.** Διάχυτη και έντονη ανοσοθετικότητα για πρωτεΐνη bcl-2 στο κυτταρόπλασμα κυττάρων σωματιότροπου αδενώματος με χαρακτηριστική περιπυρηνική δακτυλιοειδή κατανομή (Golgi pattern) (×60).



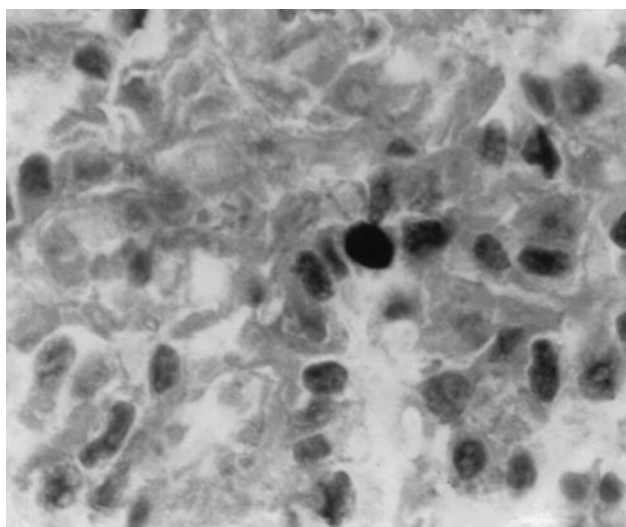
**Εικόνα 4.** Ανοσοθετικότητα για πρωτεΐνη bcl-2 στα κύτταρα γαλακτοτρόπου αδενώματος, κυρίως με σχηματισμό χαρακτηριστικού παραπυρηνικού βολίου (Golgi pattern), με ετερογένεια στην κατανομή και διακύμανση του βαθμού της έντασης της ανοσοχρώσης (×40).



**Εικόνα 5.** Ήπια διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή ανοσοθετικότητας για πρωτεΐνη bax σε μικτό σωματιότροπο γαλακτοτρόπο αδένωμα (×100).

για bcl-2 βρέθηκε σε 10 (52,5%) σωματοτρόπα, 10 (62,5%) γαλακτοτρόπα, 5 (50%) μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα και 7 (46,5%) κορτικοτρόπα αδενώματα. Η πρωτεΐνη bax είχε διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή και σε μερικές περιπτώσεις ήταν ιδιαίτερα έντονη κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (εικ. 5). Η πρωτεΐνη bax ανιχνεύθηκε σε 65 (80%) συνολικά όγκους, από τους οποίους 50 (83,5%) ήταν λειτουργικοί και 15 (71,5%) μη λειτουργικοί και, ειδικότερα, σε 13 (68,5%) σωματοτρόπα, 15 (94%) γαλακτοτρόπα, 8 (80%) μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα και 14 (93,5%) κορτικοτρόπα αδενώματα. Το bcl-2 HSC (πίν. 1) ήταν υψηλότερο στα μη λειτουργικά (4,95) από ό,τι στα λειτουργικά (2,76) αδενώματα σε βαθμό στατιστικώς σημαντικό ( $P=0,02$ ). Επιμέρους στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο bcl-2 HSC βρέθηκαν μεταξύ μη λειτουργικών (4,95) και κορτικοτρόπων (1,2) αδενωμάτων ( $P=0,002$ ), καθώς και μεταξύ γαλακτοτρόπων (3,56) και κορτικοτρόπων αδενωμάτων ( $P=0,01$ ). Όσον αφορά το bax HSC (πίν. 1), δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ λειτουργικών (5,91) και μη λειτουργικών (5,58) αδενωμάτων. Η συγκριτική ανάλυση της έκφρασης της bax στους διαφόρους τύπους λειτουργικών αδενωμάτων έδειξε σημαντικώς υψηλότερο bax HSC στα κορτικοτρόπα (6,98) από ό,τι στα σωματοτρόπα (4,40) αδενώματα ( $P=0,05$ ).

Συνολικά, 45 από τα 81 (55,5%) αδενώματα περιελάμβαναν θετικούς αποπτωτικούς πυρήνες με την τεχνική ISEL, από τα οποία 39 (65%) αφορούσαν λειτουργικούς και 6 (28,5%) μη λειτουργικούς όγκους. Ειδικότερα, για τους λειτουργικούς όγκους, θετικότητα παρατηρήθηκε σε 14 (73,5%) σωματοτρόπα, 11 (69%) γαλακτοτρόπα, 5 (50%) μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα και 9 (60%) κορτικοτρόπα αδενώματα. Όλοι οι τύποι αδενωμάτων περιελάμβαναν κυμαινόμενο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων με εστιακή ή διάσπαρτη κατανομή (εικ. 6). Ο συντελεστής συμφωνίας  $k$  στην εκτίμηση του ΑΔ μεταξύ των δύο ανεξάρτητων



**Εικόνα 6.** Ανίχνευση αποπτωτικού κυττάρου σε μη λειτουργικό αδένωμα με την τεχνική ISEL, με παρουσία έντονης πυρηνικής χρώσης. Κύτταρα με ηπιότερη χρωστική σήμανση δεν καταμετρήθηκαν ( $\times 160$ ).

παρατηρητών ήταν 0,87. Ένα ευρύ φάσμα ΑΔ παρατηρήθηκε στους περισσότερους τύπους αδενωμάτων (πίν. 1). Τα λειτουργικά αδενώματα είχαν υψηλότερο ΑΔ (5,7%) από ό,τι οι μη λειτουργικοί όγκοι (1,92%) και αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P=0,03$ ). Το υψηλότερο ποσοστό θετικών πυρήνων παρατηρήθηκε στα κορτικοτρόπα αδενώματα (6,81%), ακολουθούμενα από τα γαλακτοτρόπα (5,57%), σωματοτρόπα (5,51%) και μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα (4,59%) αδενώματα. Ο ΑΔ κάθε τύπου λειτουργικού αδενώματος διέφερε σημαντικά από τον ΑΔ των μη λειτουργικών όγκων και παρουσίαζε στατιστικώς σημαντική διαφορά με τα κορτικοτρόπα αδενώματα ( $P=0,02$ ). Αναφορικά με το μέγεθος του όγκου, υψηλότερος ΑΔ παρατηρήθηκε στα μικροαδενώματα (8,7%) από ό,τι στα μακροαδενώματα (5,58%) της ομάδας των λειτουργικών όγκων, αλλά οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές. Σύγκριση μεταξύ αδενωμάτων που παρήγαγαν GH ή και

**Πίνακας 1.** Αποτελέσματα έκφρασης πρωτεϊνών bcl-2 και bax, καθώς και αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ).

	bcl-2		bax		ΑΔ
	%	HSC	%	HSC	
Σωματοτρόπα	52,5	3,00	68,5	4,40	5,51%
Γαλακτοτρόπα	62,5	3,56	94,0	6,69	5,57%
Μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα	50,0	3,40	80,0	6,00	4,59%
Κορτικοτρόπα	46,5	1,20	93,5	6,98	6,81%
Λειτουργικά	53,5	2,76	83,5	5,91	5,70%
Μη λειτουργικά	71,5	4,95	71,5	5,58	1,92%

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα έκφρασης πρωτεϊνών bcl-2 και bax (HSC) και αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ) σε σχέση με την προεγχειρητική ή μη φαρμακευτική αγωγή σε αδενώματα με παραγωγή GH ή και PRL.

		Με αγωγή			Χωρίς αγωγή		
		bcl-2	bax	ΑΔ	bcl-2	bax	ΑΔ
Σωματοτρόπα	(9/0)*	2,55	3,66	7,18%	-	-	-
Γαλακτοτρόπα	(6/3)	2	6,66	2,12%	4,33	6	8,73%
Μικτά σωματοτρόπα-γαλακτοτρόπα	(8/1)	2,25	5,50	4,64%	4	8	0
Σύνολο	(23/4)	2,30	5,08	4,97%	4,25	6,50	6,54%

\* (Με/χωρίς) προεγχειρητική φαρμακευτική αγωγή

PRL σε ασθενείς με ή χωρίς προεγχειρητική φαρμακευτική θεραπεία δεν έδειξε επίσης σημαντικές διαφορές, αν και παρατηρήθηκε υψηλότερος ΑΔ στα αδενώματα ασθενών χωρίς θεραπεία και, ειδικότερα, στα γαλακτοτρόπα (πίν. 2). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν αποπτωτικά κύτταρα στις μη νεοπλασματικές νεκροτομικές υποφύσεις και στα μη νεοπλασματικά ιστοτημμάτια που περιλαμβάνονταν στο υλικό των αδενωμάτων.

Παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση του ΑΔ με την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 σε όλους τους τύπους αδενωμάτων, εκτός από τα γαλακτοτρόπα αδενώματα, και μάλιστα σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό στα κορτικοτρόπα αδενώματα (Pearson product moment correlation,  $r=-0,59$  και  $P=0,02$ ). Αντίθετα, ο βαθμός της απόπτωσης δεν έδειξε να σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης bax.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται περιορισμένος αριθμός μελετών που ερευνούν την απόπτωση στην υπόφυση και βασίζονται κυρίως σε σειρές αδενούποφυσιακών κυττάρων<sup>30-37</sup> και υποφύσεις τρωκτικών.<sup>38-41</sup> Αναφορικά με τα υποφυσιακά αδενώματα στον άνθρωπο, η ρύθμιση και η σημασία της απόπτωσης παραμένει ως επί το πλείστον άγνωστη.<sup>42,43</sup> *In vivo* μορφολογικές μελέτες σε ποντίκια με υπερπλασία γαλακτοτρόπων κυττάρων προκλήθισα μετά από χορήγηση οιστρογόνων, έδειξαν αύξηση της απόπτωσης μετά την απόσυρση των οιστρογόνων.<sup>38</sup> Ακόλουθη χορήγηση βρωμοκρυπίνης προκάλεσε το διπλασιασμό του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε φαρμακευτική αγωγή. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι οι αγωνιστές των υποδοχέων ντοπαμίνης μπορεί να επάγουν την απόπτωση και να επηρεάζουν τις φαγοκυτταρικές ικανότητες των ασπεροειδών κυττάρων της αδενούποφυσης. Σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιώντας την τεχνική ISEL, βρέθηκε ότι η βρωμοκρυπίνη προάγει την απόπτωση στα σωματοτρόπα κύτταρα αδενώματος (GH1) του αρουραίου<sup>30</sup> και στα κορτικοτρόπα κύτταρα αδενώματος (AtT-20) του ποντικού.<sup>31</sup> Οι Yonezawa et al<sup>40</sup> βρήκαν ότι η βρωμοκρυπίνη και η τεργκουρίδη (terguride) μπορούν να καταστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να επάγουν την απόπτωση στην αδενούποφυση του θηλυκού Wistar αρουραίου, μετά από οιστρογονική διέγερση. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι το ανάλογο της σωματοστατίνης SMS 201-995 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με την επαγωγή της απόπτωσης, στα AtT-20 υποφυσιακά κύτταρα που συνεχίζουν να

πολλαπλασιάζονται, εκτός αυτών που σταματούν στην G1 ή G2 φάση του κύκλου.<sup>32</sup> Έχει προταθεί ότι η αύξηση του c-myc, που προκαλεί η σωματοστατίνη, σχετιζόμενη με απενεργοποίηση των υποδοχέων των κινασών των αυξητικών παραγόντων, μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης.<sup>33</sup> Επιπλέον, διάφοροι άλλοι παράγοντες μπορούν να δρουν αποπτωτικά σε κυτταρικές σειρές υποφυσιακών αδενωμάτων, όπως ο αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C υπερεισίνη (hypericin) στα AtT-20 και GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> κύτταρα,<sup>34</sup> καθώς και οι αναστολείς των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης οκαδαϊκό οξύ (okadaic acid) και καλικουλίνη A (calyculin A) στα GH3 κύτταρα.<sup>36,37</sup> Τέλος, οι Guo et al,<sup>39</sup> σε μελέτη της βλαπτικής επίδρασης της ακτινοβολίας σε υπόφυση αρουραίου, διαπίστωσαν αυξημένη απόπτωση μετά από ορμονική και φαρμακευτική απόσυρση, παρατήρηση που υποδηλώνει ότι η αποτελεσματικότητα των παραγόντων που επάγουν την ελάττωση του μεγέθους του όγκου *in vivo* μπορεί να οφείλεται σε ταχεία κυτταρική απόπτωση.

Οι Green et al,<sup>42</sup> με την τεχνική ISEL, διαπίστωσαν απόπτωση στα αδενώματα υπόφυσης του ανθρώπου συχνότερα σε μη λειτουργικούς όγκους, αλλά χωρίς στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τους λειτουργικούς. Στη μελέτη αυτή δεν διαπιστώθηκε σχέση της απόπτωσης με την έκφραση της πρωτεΐνης p53, καθώς και με το μέγεθος ή τον τύπο του αδενώματος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας, όσο και προηγούμενης μελέτης μας,<sup>43</sup> σχετικά με το φαινόμενο της απόπτωσης στα αδενώματα υπόφυσης του ανθρώπου, δείχνουν ότι η απόπτωση απαντά κυρίως στα λειτουργικά αδενώματα, με στατιστικώς σημαντική διαφορά από τα μη λειτουργικά. Είναι γνωστό ότι ιδιαίτερα τα μη λειτουργικά αδενώματα αυξάνουν βραδέως, λόγω χαμηλού βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού.<sup>44-46</sup> Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με το στατιστικώς σημαντικό υψηλότερο ΑΔ που παρατηρήθηκε στα λειτουργικά αδενώματα και υποδηλώνουν ότι ο ρυθμός της απόπτωσης εξαρτάται και από το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ο υψηλότερος αποπτωτικός δείκτης που παρατηρήθηκε στα κορτικοτρόπα αδενώματα θα μπορούσε μερικώς να αποδοθεί στην άμεση επίδραση των γλυκοκορτικοειδών που υπερπαραγονται λόγω υπερέκκρισης ACTH. Αν η υπόθεση αυτή είναι αληθής, ερμηνεύει το κατά κανόνα μικρό μέγεθος των κορτικοτρόπων αδενωμάτων<sup>45-47</sup> ως αποτέλεσμα αυξημένης αποπτωτικής δραστηριότητας. Μεταξύ μικροαδενωμάτων και μακροαδενωμάτων δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, αν και παρατηρήθηκε υψηλότερος ΑΔ στα πρώτα. Τέλος, υψηλότερος ΑΔ

παρατηρήθηκε σε αδενώματα ασθενών που δεν είχαν λάβει προεγχειρητική θεραπεία και ειδικότερα στα γαλακτοτρόπα, χωρίς όμως στατιστικώς σημαντικές διαφορές με την ομάδα ασθενών που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία. Οι διαφορές αυτές μπορεί να αποδοθούν στην παρουσία κυτταρικού υποπληθυσμού, που είναι πιο ευαίσθητος στην απόπτωση και απαντά ταχέως στο ερέθισμα της φαρμακευτικής αγωγής. Πιθανώς, το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού αυτού πληθυσμού απαλείφεται κατά το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έναρξη της θεραπείας μέχρι την εξαίρεση του όγκου και δεν ανιχνεύεται πλέον στον ιστό.

Οι μελέτες που αφορούν την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 στα αδενώματα υπόφυσης είναι ελάχιστες και κυρίως πειραματικές. Ανοσοϊστοχημικά, βρέθηκε ότι η ογκοπρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται στο 30% των υποφυσιακών αδενωμάτων.<sup>48</sup> Στην παρούσα μελέτη, η συχνότητα έκφρασης της bcl-2 ήταν 58%. Οι διαφορές αυτές πιθανώς αποδίδονται στα διαφορετικά πρωτόκολλα επανάκτησης της αντιγονικότητας, που χρησιμοποιήθηκαν. Οι Woloschak et al,<sup>35</sup> μελετώντας τα αποτελέσματα της βλάβης του DNA μετά από επίδραση γ-ακτινοβολίας σε σειρά υποφυσιακών κυτάρων ποντικού (AtT-20), έδωσαν προσοχή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, στην επαγωγή της απόπτωσης και στην έκφραση γνωστών ρυθμιστικών παραγόντων των φαινομένων αυτών, όπως η p53, το c-myc και η bcl-2. Παρατήρησαν αναστολή του πολλαπλασιασμού των AtT-20 κυτάρων στις G1 και G2 φάσεις του κύκλου και ότι σημαντικό ποσοστό αυτών οδηγούνταν σε απόπτωση. Η παραμονή στην G1 φάση συμβάδιζε με έντονη έκφραση της πρωτεΐνης p53, ενώ η έκφραση του c-myc ελαττωνόταν προοδευτικά. Η απόπτωση ήταν ανεξάρτητη από την έκφραση του γονιδίου bcl-2 στα κύτταρα αυτά, πιθανώς λόγω της υψηλής βασικής τιμής έκφρασης της bcl-2 στην κυτταρική σειρά. Τέλος, οι Ahlbom et al,<sup>41</sup> μελετώντας τους μηχανισμούς που υπεισέρχονται στην επαναφορά της φυσιολογικής λειτουργίας του προσθίου λοβού της υπόφυσης του αρουραίου μετά τον

απογαλακτισμό, παρατήρησαν ότι το φαινόμενο αυτό εξελίσσεται μέσω αποπτωτικής διαδικασίας και συνοδεύεται από αύξηση των πρωτεϊνών p53 και bax και ελάττωση της πρωτεΐνης bcl-2.

Στην παρούσα μελέτη, οι πρωτεΐνες bcl-2 και bax έδειξαν παρόμοια κατανομή και ένταση ανοσοχρώσης στους μάρτυρες της μη νεοπλασματικής αδενούπόφυσης. Αντίθετα, στα αδενώματα η συχνότητα της bcl-2 ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή της bax. Το HSC της πρωτεΐνης bcl-2 στα μη λειτουργικά αδενώματα ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο από αυτό των λειτουργικών και παρουσίαζε αντίστροφη σχέση με τον ΑΔ. Με εξαίρεση τα γαλακτοτρόπα αδενώματα, παρόμοια αντίστροφη σχέση βρέθηκε σε κάθε επιμέρους τύπο αδενώματος και ιδιαίτερα στα κορτικοτρόπα, όπου οι διαφορές ήταν στατιστικώς σημαντικές. Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης bax, δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφόρων τύπων αδενωμάτων και δεν υπήρχε συσχέτιση του HSC της bax και του ΑΔ.

Συμπερασματικά, η απόπτωση είναι συχνότερη σε λειτουργικά αδενώματα. Αντίθετα, η έκφραση της bcl-2 είναι υψηλότερη σε μη λειτουργικά αδενώματα, ενώ η bax εκφράζεται με παρόμοια συχνότητα σε όλους τους τύπους των αδενωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το δίπολο των μορίων bcl-2/bax φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης στα αδενώματα της υπόφυσης του ανθρώπου. Επομένως, η μελέτη της απόπτωσης μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της βιολογίας και των ρυθμιστικών μηχανισμών που υπεισέρχονται στην εξέλιξη της νεοπλασματικής εξεργασίας και της λειτουργικότητας των υποφυσιακών αδενωμάτων.

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς εκφράζουν τις ιδιαίτερες ευχαριστίες τους στην τεχνολόγο κα Μάγδα Πατεράκη για την πολύτιμη συμβολή της στις μορφολογικές μελέτες.

#### ABSTRACT

##### **Correlation of bcl-2 and bax protein expression with apoptosis in human pituitary adenomas**

D. SAMBAZIOTIS,<sup>1</sup> G. KONTOTHEORGOS,<sup>1</sup> N. KAPRANOS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology "Georgios Gennimatas" General Hospital, <sup>2</sup>Department of Molecular Pathology, "Amalia Fleming" Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 1999, 16(6):580-589

**OBJECTIVE** The bcl-2 oncogene and the bax gene and their protein products play an important role in the regulation of apoptosis. The aim of the study was to investigate the effects of bcl-2 and bax proteins and their re-



lation with apoptosis in a series of 81 pituitary adenomas. **METHOD** The 60 functioning adenomas included 19 somatotroph, 16 lactotroph, 10 mixed somatotroph-lactotroph and 15 corticotroph adenomas. The remaining 21 cases were clinically nonfunctioning adenomas. Bcl-2 and bax proteins were studied immunohistochemically and the results were quantitated with the use of the HistoScore system (HSC), by multiplying the immunoreactivity grade (1–4) with the staining intensity grade (1–3). Apoptotic cells were detected by the *in situ* end labeling technique (ISEL) on paraffin sections and the apoptotic labeling index (ALI) was accessed. **RESULTS** Bcl-2 protein immunopositivity was found in 58% of the tumors, including 32 (53.5%) functioning and 15 (71.5%) nonfunctioning adenomas. Bax protein was found to be immunoreactive in 65 tumors (80%), including 50 (83.5%) functioning and 15 (71.5%) nonfunctioning adenomas. Bcl-2 HSC was significantly higher ( $P=0.02$ ) in nonfunctioning (4.95) than in functioning (2.76) adenomas. Regarding bax HSC, no statistically significant differences were found between functioning (5.91) and nonfunctioning (5.58) adenomas. Overall, 45 of 81 (55.5%) adenomas included positive apoptotic nuclei by the ISEL technique. Functioning adenomas showed a significantly higher ( $P=0.03$ ) ALI (5.7%) than that of nonfunctioning tumors (1.92%). The highest frequency of positive nuclei was noticed in corticotroph adenomas (6.81%), followed by lactotroph (5.57%), somatotroph (5.51%) and mixed somatotroph-lactotroph (4.59%) tumors. An inverse correlation was found between ALI and bcl-2 protein expression in almost all adenoma types. These differences were statistically significant only in corticotroph adenomas ( $P=0.02$ ). In contrast, the apoptotic rate showed no correlation with bax protein expression. **CONCLUSIONS** Apoptosis occurs mainly in functioning adenomas, with a statistically significant differences from nonfunctioning tumors. Bcl-2 protein expression is lower as compared to bax protein. In addition, it is significantly higher in nonfunctioning adenomas and shows inverse correlation with ALI. These results show that bcl-2/bax heterodimer is implicated in the regulation of the apoptotic process in human pituitary adenomas.

**Key words:** Apoptosis, bcl-2, bax, Pituitary adenoma

## Βιβλιογραφία

- KERR JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971, 105:13–20
- KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239–257
- ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990, 136:593–608
- BRUSCH W, KLEIN L, TENNISWOOD M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990, 88:1071–1074
- KERR JFR, HARMON BV. Definition and incidence of apoptosis: A historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO (eds) *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991:5–29
- TSUJIMOTO Y, GORHAM J, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. The t(14;18) chromosome translocation involved in B cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985, 229:1390–1393
- HOCKENBERRY D, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature (London)* 1990, 348:334–336
- KORSMEYER SJ. Bcl-2: An antidote of programmed cell death. *Cancer Surv* 1992, 15:105–118
- YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J ET AL. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997, 275:1129–1132
- KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997, 275:1132–1136
- LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996, 86:147–157
- REED JC, ZHA H, AIME-SEMPE C, TAKAYAMA S, WANG HG. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 1996, 406:99–112
- FARROW SN, BROWN R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 1996, 6:45–49
- OLTVAI ZN, MILLMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993, 74:609–619
- KORSMEYER SJ, SHUTTER JR, VEIS DJ, MERRY DE, OLTVAI DE. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993, 4:327–332
- KORSMEYER SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995, 11:101–105
- BARGOU RC, DANIEL PT, MAPARA MY, BOMMERT K, WAGENER C, KALLINICH B ET AL. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: Low bax- $\alpha$  expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer* 1995, 60:854–859
- KNUDSON CM, TUNG K, BROWN G, KORSMEYER SJ. Bax deficient mice demonstrate lymphoid hyperplasia but male germ cell death. *Science* 1995, 270:96–99
- YIN C, KNUDSON CM, KORSMEYER SJ, VAN DYKE T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis. *Nature* 1997, 385:637–640
- RAMBINO N, YAMAMOTO H, IONOV Y, LI Y, SAWAI H, REED JC ET AL. Somatic frameshift mutations in the bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997, 275:967–969

21. REED JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994, 124:1–6
22. YIN XM, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature* 1994, 369:321–323
23. WHITE E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996, 10:1–15
24. SCHMITZ GG, WALTER T, SEIBL R, KESSLER C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 1991, 192:222–231
25. WIJSMAN JH, JONKER RR, KEIZER R, VAN DE VELDE CJH, CORNELISSE CJ, VAN DIERENDONCK JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993, 41:7–12
26. KONTOGEORGOS G, KOVACS K, SCHEITHAUER WB, ROLOGIS D, ORPHANIDIS G.  $\alpha$ -subunit immunoreactivity in plurihormonal adenomas of patients with acromegaly. *Mod Pathol* 1991, 4:191–195
27. SINICROPE FA, RUAN SB, CLEARY KR, STEPHENS LC, LEE JJ, LEVIN B. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995, 55:237–241
28. WHEATON S, NETSER J, GUINEE D, RAHN M, PERKINS S. Bcl-2 and Bax protein expression in indolent versus aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Hum Pathol* 1998, 29:820–825
29. NEMOTO R, UCHIDA K, HATTORI K, SHIMAZUI T, NISHIJIMA Y, SAITO S ET AL. S-phase fraction of human tumor measured *in situ* with bromodeoxyuridine labeling. *J Urol* 1988, 139:286–289
30. YIN D, KONDO S, TAKEUCHI J, MORIMUTA T. Induction of apoptosis in rat somatotropin-secreting adenoma cells by bromocriptine. *Oncol Res* 1993, 5:383–387
31. YIN D, KONDO S, TAKEUCHI J, MORIMUTA T. Induction of apoptosis in rat ACTH-secreting adenoma cells by bromocriptine. *FEBS Lett* 1993, 339:73–75
32. SRIKANT K. Cell cycle-dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201–995 in AtT-20 mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 209:400–406
33. SHARMA K, SRIKANT CB. Somatostatin analogs induce *c-myc* gene expression in AtT-20 mouse pituitary tumor cells. 77th Annual Meeting of Endocrine Society, Washington DC, 1995:276 (Book of Abstracts)
34. HAMILTON HB, HINTON DR, LAW RE, GOPALAKRISHNA R, SU YZ, CHEN ZH ET AL. Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis in pituitary adenoma cell lines by the protein kinase C inhibitor hypericin: potential therapeutic application. *J Neurosurg* 1996, 85:329–334
35. WOLOSCHAK M, YU A, XIAO J. Molecular and cellular responses to DNA damage in a murine pituitary adenoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 1996, 119:61–68
36. RITZ V, MARWITZ J, RICHTER E, ZIEMANN C, QUENTIN I, STEINFELDER HJ. Characterization of two pituitary GH3 cell sublines partially resistant to apoptosis induction by okadaic acid. *Biochem Pharmacol* 1997, 54:967–971
37. TERGAU F, WEICHERT J, QUENTIN I, OPITZ R, VON ZEESCHWITZ C, MARWITZ J ET AL. Inhibitors of ser/thr phosphatases 1 and 2A induce apoptosis in pituitary GH3 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997, 356:8–16
38. DREWETT N, JACOBI JM, WILLGOSS DA, LLOYD HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993, 57:89–95
39. GUO YP, HENDRY JH, MORRIS ID, DAVIS JR, BEARDWELL CG. Cell proliferation and death in the irradiated pituitary gland and its modification by growth stimulants. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997, 38:175–181
40. YONEZAWA K, TAMAKI N, KOKUNAI T. Effects of bromocriptine and terguride on cell proliferation and apoptosis in the estrogen-stimulated anterior pituitary gland of the rat. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1997, 37:901–906
41. AHLBORN E, GRANDISON L, ZHIVOTOVSKY B, CECCATELLI S. Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the Bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 1998, 139:2465–2471
42. GREEN VL, WHITE MC, HIPKIN IJ, JEFFREYS RV, FOY PM, ATKIN SL. Apoptosis and p53 suppressor gene protein expression in human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 1997, 136:382–387
43. KONTOGEORGOS G, SAMBAZIOTIS D, PIADITIS G, KARAMERIS A. Apoptosis in human pituitary adenomas: A morphologic and *in situ* end-labeling study. *Mod Pathol* 1997, 10:921–926
44. IKEDA H, YOSHIMOTO T. The relation between *c-myc* protein expression, the bromodeoxyuridine labeling and the biological behavior of pituitary adenomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992, 83:361–364
45. KOVACS K, HORVATH E. Tumors of the pituitary. In: *Atlas of Tumor Pathology*. Fascicle 21, 2nd series. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1986
46. KONTOGEORGOS G. Pituitary tumours. In: Polak JM (ed) *Diagnostic Histopathology of Endocrine Tumours*. Churchill Livingstone, London, 1993:227–269
47. SAEGER W. Morphology of ACTH-producing pituitary adenomas. In: Fahlbusch R, von Wender K (eds) *Treatment of Pituitary Adenomas*. Thieme, Stuttgart, 1978:122–130
48. WANG DG, JOHNSTON CF, ATKINSON AB, HEANEY AP, MIRAKHUR M, BUCHANAN KD. Expression of bcl-2 oncoprotein in pituitary tumours: comparison with *c-myc*. *J Clin Pathol* 1996, 49:795–797

*Corresponding author:*

D. Sambaziotis, Department of Pathology “G. Gennimatas” Athens General Hospital, 154 Messogion Ave., GR-115 27 Athens, Greece