



## MIB 1 U NON-HOČKIN LIMFOMU

**Autori:** Vladan Milošević<sup>1</sup>, Jasmina Ranđelović<sup>1</sup>, Jovica Vojinović<sup>1</sup>

**Mentor:** Prof. dr Dragan Mihailović<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Nišu Medicinski fakultet,

<sup>2</sup>Institut za patologiju KC Niš

### SAŽETAK

Non-Hočkin limfomi su maligni limfocitni tumori, izuzetno heterogeni sa stanovišta histoloških podtipova. Bilo koja grupa ovih limfocitnih tumora može se ispoljiti u bilo kom životnom dobu, često se ispoljavajući uvećanim limfnim žlezdama, temperaturom i gubitkom težine. MIB 1 predstavlja monoklonsko antitelo na Ki-67 kao antigen. Odlikuje se velikim afinitetom prema Ki-67 nuklearnom antigenu i koristi se za detekciju Ki-67 antigena u ćelijama.

Cilj rada bio je određivanje procenata MIB-1 pozitivnih ćelija kod non-Hočkin limfoma po tipu DLBC i FL kod bolesnika različite starosne dobi.

U cilju istraživanja korišćena je grupa od 10 bolesnika sa dijagnozom non-Hočkin limfoma (7 muškaraca i 3 žene). Ispitivanje je sprovedeno na uzorcima prikupljenim u Centru za patologiju, Kliničkog centra u Nišu u periodu od 2006. do 2010. godine. Primarno antitelo korišćeno u radu bilo je MIB 1. Obojeni preparati analizirani su koristeći Nikon Eclipse 50 mikroskop. Određivanje broja MIB 1 pozitivnih ćelija vršeno je upotrebom kompjuterskog programa ImageJ, plugin Point Picker.

Od deset obolelih, kod njih pet je dijagnostikovano non-Hočkin limfom tipa difuznog krupnoćelijskog limfoma (DLBC), kod ostalih pet dijagnostikovano je folikularni limfom (FL). Broj MIB1 pozitivnih ćelija kod FL kretao se od 17 do 23 na sto ćelija. Kod DLBC non-Hočkin limfoma broj MIB 1 pozitivnih ćelija kretao se u opsegu od 36 do 40 na sto ćelija.

MIB 1 je koristan u određivanju malignog potencijala i proliferativnog indeksa ćelija u malignom procesu. Incidenca oboljevanja od DLBC i FL bila je različita kod različitih polova. Kod muških ispitanika primećena je povišena učestalost non-Hočkin limfoma tipa DLBC (57%), dok je kod ispitanika ženskog pola bio zastupljeniji folikularni limfom (67%).

**Ključne reči:** non-Hočkin limfom, MIB1, DLBC, FL

## UVOD

Non-Hoćkin limfomi su limfoproliferacioni maligni tumori koji potiču iz B ili T-limfocita, a retko iz NK ćelija (1, 2, 3). Oni predstavljaju izuzetno heterogenu grupu bolesti sa stanovišta histoloških podtipova, kliniće prezentacije, imunofenotipskih profila, citogenetskih i molekularnih karakteristika (2).

Bilo koja grupa ovih limfocitnih tumora može se ispoljiti u bilo kom životnom dobu, često se ispoljavajući uvećanim limfnim žlezdama, temperaturom i gubitkom težine.

Poznato je mnogo tipova non-Hoćkin limfoma. Oni se mogu klasifikovati u agresivne, brzorastuće i spororastuće tipove. Od toga koji će se tip javiti zavisi i prognoza same bolesti (8).

B-ćelijski non-Hoćkin limfomi se manifestuju kao Burkittovi limfomi, hronića limfocitna leukemija/mali limfocitni limfom (CLL/SLL), difuzni veliko-ćelijski limfom, folikularni limfom, imunoblastni velikoćelijski limfom, prekursori B-limfoblastni limfom, T-ćelijski non-Hoćkin limfomi se manifestuju kao mycosis fungoides, anaplastići velikoćelijski limfom, prekursori T-limfoblastni limfom.

Non-hoćkin limfom nastao posle transplantacije košne srži, najčešće je po tipu B-ćelijski non-Hoćkin limfom.

Ki-67 predstavlja nuklearni antigen ćelija koji je prisutan samo u određenim fazama ćelijskog ciklusa. Usko je povezan sa ćelijskom deobom, pa je i marker ćelijske deobe (4).

Antigena frakcija Ki-67 proteina može se detektovati samo u G1, S, G2 fazi ćelijskog ciklusa kao i za vreme mitoze (5).

Kao takav, veoma je pogodan za identifikaciju ćelija koje su mitotski aktivne. Ki 67 identifikuje ćelije u G1, S, G2 i M faza ćelijskog ciklusa, koriste se za identifikaciju proliferativnog indeksa u velikom dijapazonu limfoma kao i ostalih tumorskih ćelija.

Frakcija Ki-67 pozitivnih malignih ćelija, često je povezana sa kliniċkim tokom i prognozom malignog oboljenja (6, 7). Ki-67 se ne detektuje kod ćelija koje se nalaze u G0 periodu (5, 9).

MIB1 predstavlja monoklonsko antitelo na Ki-67 kao antigen. Koristi se za detekciju Ki-67 antigena u ćelijama. Njegova preimućnost u odnosu na Ki-67 antitela je što MIB1 poseduje veći afinitet za Ki-67 antigen i može da istisne Ki-67 antitelo vezano in vivo za antigen, pa je kao takav veoma pogodan u histopatologiji (10).

## CILJ RADA

Cilj rada bio je određivanje procenata MIB-1 pozitivnih ćelija kod non-Hoćkin limfoma po tipu DLBC i FL kod bolesnika različite starosne dobi.

## MATERIJAL I METODE

U Centru za patologiju i patološku anatomiju Kliniċkog centra u Nišu u periodu od 2006. do 2010. godine dijagnostikovano je 10 bolesnika sa non-Hoćkin limfomom (7 muškaraca i 3 žene), starosti od 7 do 52 (prosećno 32.1), od kojih su 5 bili po tipu folikularni, a ostalih 5 po tipu DLBC.

Klasifikacija i dijagnoza malignih limfoma zasnovana je na novoj klasifikaciji limfoma Svetske zdravstvene organizacije (11). Biopsijom uzet materijal obrađivan je rutinskim histološkim tehnikama do dobijanja parafinskih kalupa na Institutu za patologiju Kliniċkog centra u Nišu. Uzorci tkiva su fiksirani u trajanju od 48 h u 4% neutralnom puferisanom fosfatnom formaldehidu i potom uklapani u parafin.

Parafinski kalupi su dalje sećeni na rućnom mikrotomu, na kome su dobijeni preseći tkiva prosećne debljine od 4  $\mu$ m. Imunohistohemijsko bojenje je izvedeno prema sledećoj proceduri: demaskiranje antigena iz deparafiniranih i rehidriranih tkivnih preseka izvedeno je upotrebom Target Retrieval Solution (pH6), code S1699, Dako Denmark u odnosu 1:10 sa destilovanom vodom i kuvano u mikrotalasnoj na 800W, 20 min.

Aktivnost endogene peroksidaze je blokirana sa 3% vodenim rastvorom vodonik peroksida, na sobnoj temperaturi za 10 min. Za ispiranje je korišćen pufer 0.02 M fosfatni pufer (pH 7.0; code S3024, Denmark) sa tri ispiranja u razmaku od 2 min. Primarno antitelo korišćeno u radu bilo je anti-Ki-67 (mišja monoklonska antihumana antitela za Ki-67, klon MIB1; code N1633, Dako, USA). Inkubacija sa primarnim antitelima vršena je u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi 30 min.

Vizualizacija je vršena sa Dako LSAB2 system-HRP (code K0673, Dako, USA) koji sadrži DAB. Iseći su isprani destilovanom vodom i bojeni Mejerovim hematoksilinom (12).

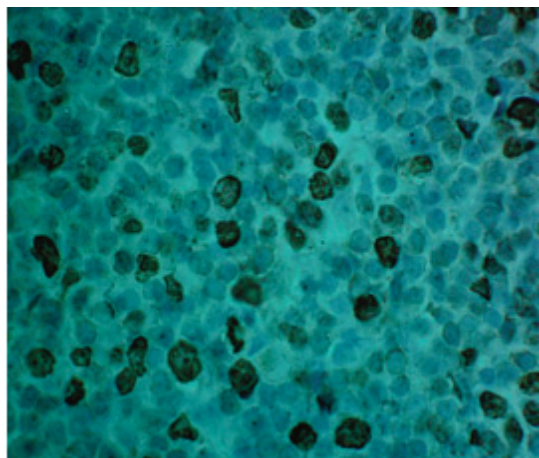
Obojeni preparati analizirani su koristeći Nikon Eclipse 50 mikroskop. Preparati su slikani koristeći Nikon DS5M digitalnu kameru u rezoluciji od 1260x980. Za kvantifikaciju broja Ki67 pozitivnih ćelija korišćen je program ImageJ, plugin Point Picker.

Statistiċki podaci su analizirani statistiċkim programom SPSS 10.1 za Windows SPSS Inc, USA (13, 14). Razlike u ekspresiji Ki-67 antigena analizirane su korišćenjem Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testa.

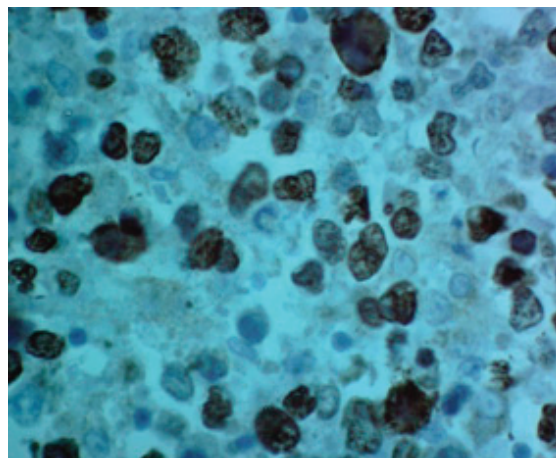
## REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Kliniċki podaci bolesnika obolelih od non-Hoćkin limfoma predstavljeni su na tabeli 1. Od deset obolelih, njih sedam su bile muške osobe, ostale tri bile su ženske osobe. Opseg starosti kretao se od 7 do 52 godine. Prosećna starost iznosila je 32.1 $\pm$ 15.44 godinu.

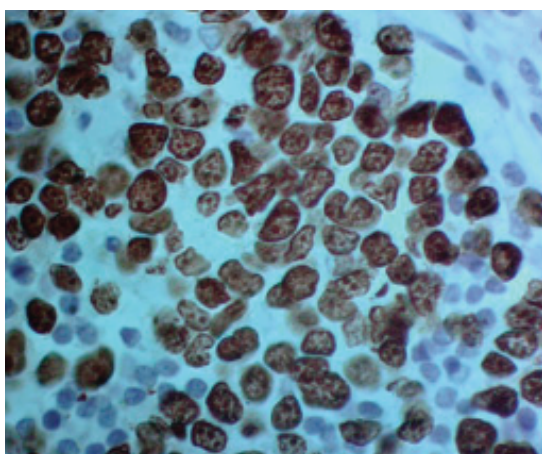
Odnos broja obolelih od non-Hoćkin limfoma po tipu difuznog krupnoćelijskog B limfocitnog limfoma (DLBC) i folikularnog limfoma (FL) bio je 50:50.



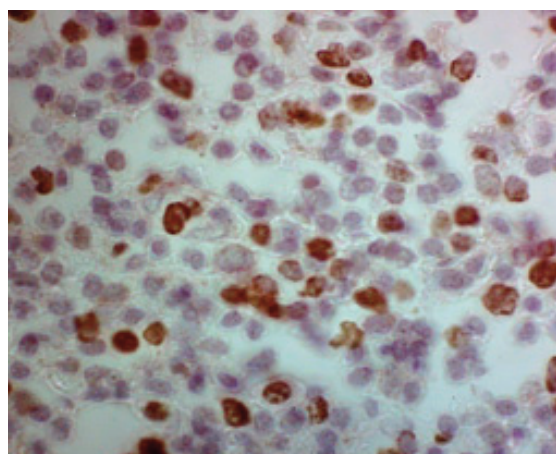
Slika 1. FL 22% (X 200)



Slika 2. DLBC 37% (X 200)



Slika 3. GC reactiva 90% (X 200)



Slika 4. PK 20% (X 200)

Tabela 1. Klinički podaci bolesnika sa non-Hočin limfomom (pol i starosna distribucija)

Pol	muški	7	70%	Godine starosti
	ženski	3	30%	Jul-52
$\Sigma$	10		100%	32.1±15.44

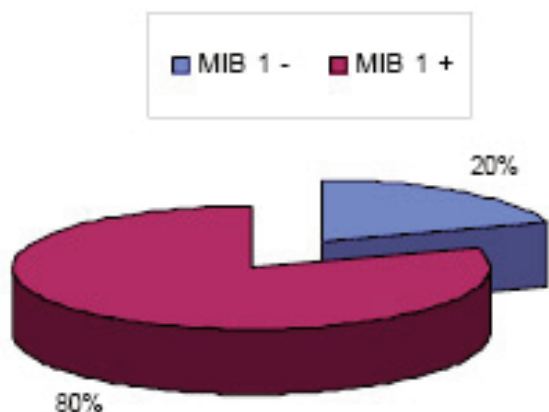
Tabela 2. Distribucija MIB 1 pozitivnih ćelija kod ispitanika

Ispitanici	Tip non-Hočin limfoma	
	DLBC	FL
1	0.36	0.2
2	0.3	0.21
3	0.32	0.23
4	0.37	0.19
5	0.4	0.17
$\Sigma$	X	0.2
	SD	0,022361

Grafikon 1. Odnos DLBC i FL



Grafikon 2. Odnos distribucije MIB 1 antitela u folikularnom limfomu



Grafikon 3. Odnos distribucije MIB 1 antitela u DLBC limfomu

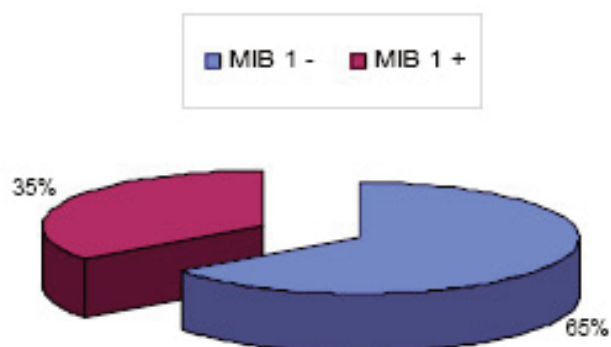


Tabela 3. Procentualni odnos MIB 1 pozitivnih ćelija DLBC i FL non-Hoćkin limfoma

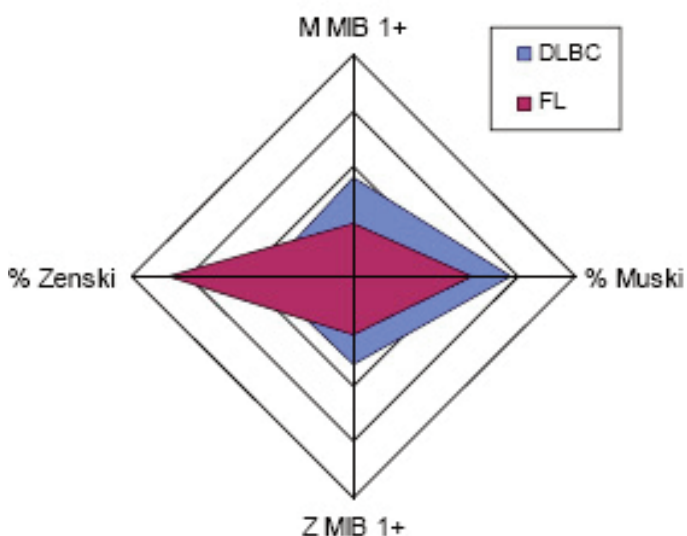
Tip	FL	DLBC
MIB 1	0.2±0.022	0.35±0.04
Pozitivne	X±SD	
	%	%
	20% ± 2.2%	35% ± 4%

Tabela 4. Procenat MIB 1 pozitivnih ćelija po tipu limfoma i njihova distribucija u odnosu na pol

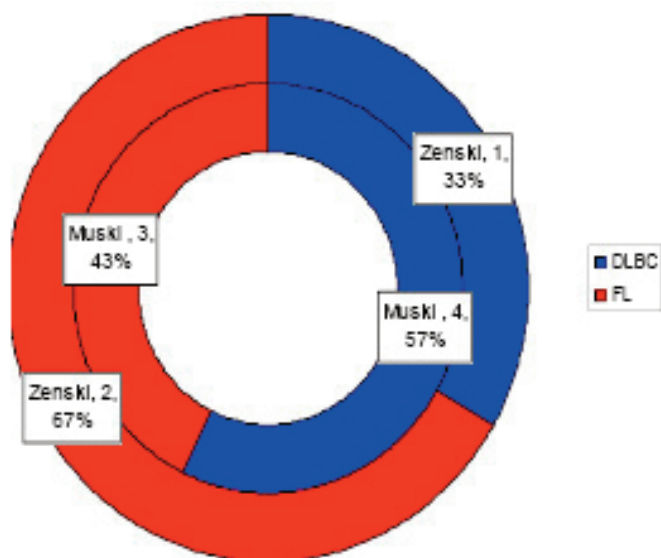
Pol	Tip limfoma					
	DLBC			FL		
	%	N0	% MIB 1+	%	N0	% MIB 1+
Muški	57%	4	36%±3.6%	43%	3	19%±1.6%
Ženski	33%	1	32%±0%	67%	2	21%±1.5%

Postoji statistički značajna razlika u distribuciji MIB 1 pozitivnih ćelija između FL i DLBC limfoma za  $p < 0.001$

Grafikon 4. Grafički prikaz distribucije MIB 1 pozitivnih ćelija određenog tipa limfoma u odnosu



Grafikon 5. Odnos tipa non-Hoćkin limfoma i pola na pol



## DISKUSIJA

Non-Hoćkin limfomi su neoplastične transformacije ćelija limfnog tkiva (15). U SAD, non-Hoćkin limfomi su na šestom mestu kao urok smrti povezan sa nekim malignim procesom (16). Manje od 35% svih dijagnostikovanih slučajeva se izleći, pa je lećenje ove bolesti veliki klinički problem (17).

Klasifikaciju non-Hoćkin limfoma komplikuje velika heterogenost i u okviru priznatih histoloških podtipova. Bolesnici sa navodno istom dijagnozom mogu imati veoma raznovrsne kliničke prezentacije, molekularne profile i kliničke ishode. Pouzdani prognostički markeri bi trebalo da omoguće determinaciju podtipa i što preciznije određivanje prognoze bolesti (18).

Napredak u istraživanju ćelijskog ciklusa doveo je do identifikacije proteinskih markera odgovornih za regulaciju ćelijske proliferacije. Monoklono antitelo Ki-67 pronađeno je 1983. godine, kada su ćelije mišjeg mijeloma spojene sa ćelijama slezine miša imunizovanog jedrima ćelija L 428 ćelijskih linija (19). Ki-67 monoklono antitelo razvijeno je i korišćeno u svrhu evaluacije stepena ćelijske proliferacije malignih tumora (20-24). U skorije vreme, monoklono antitelo MIB 1 razvijeno je korišćenjem rekombinantnih delova Ki-67 nuklearnog antigena kao imunogena. MIB 1 prepoznaje Ki-67 nuklearni antigen, koji je povezan sa ćelijskom proliferacijom i eksprimira se za vreme G1, S, G2 i M faze ćelijskog ciklusa, ali se ne eksprimira u Go fazi ćelijskog ciklusa (5, 9, 25). Klinički značaj proliferacionih markera kao prognostičkih parametara još uvek je predmet rasprava (26-28). Tema nekih radova bilo je i upoređivanje nekih proliferacionih markera, kao u slučaju W Paulus, J Meixensberger et al. Oni su, između ostalog, upoređivali MIB 1 i Ki 67 an-

titela na parafinskim i kriopreparatima i utvrdili sličan proliferacioni indeks i kod zamrznutih i kod parafinskih preparata kao i da su preparati bojeni MIB 1 pokazivali veći proliferacioni indeks (29).

Za razliku od našeg rada, gde smo koristili parafinske preparate debljine 4  $\mu\text{m}$  i imunohistohemijsko bojenje monoklono antitelom MIB 1 (mišja monoklono antihumano antitelo za ki 67, klon MIB1;code N1633, Dako, USA), u radu W Paulus, J Meixensberger et al, korišćeni su parafinski i kriopreparati debljine 5  $\mu\text{m}$  i imunohistohemijsko bojenje Ki-67 i MIB 1 antitelom (Dianova, Hamburg, Germany) (29). U radu je takođe korišćeno mikrotalasno zraćenje radi demaskiranja Ki-67 nuklearnog antigena iz prethodno pripremljenih tkivnih preseka (30) upotrebom Target Retrieval Solution (pH6), code S1699, Dako Denmark u odnosu 1:10 sa destilovanom vodom na 800W u trajanju od 20 min (12). Za razliku od rada Mazen A. Ghanem et al, koji su koristili 0.1 M citratni pufer (pH 6.0) u mikrotalasnoj 15 min na 700 W i zečja antitela (31).

## ZAKLJUČAK

MIB 1 je koristan u određivanju malignog potencijala i proliferativnog indeksa ćelija u malignom procesu. Postoji statistička značajnost u MIB 1 proliferativnom indeksu DLBC i FL u korist DLBC za  $p < 0.001$ . Postoji slaba statistička razlika u distribuciji tipa limfoma u odnosu na pol. Kod muških ispitanika primećena je povišena učestalost non-Hoćkin limfoma tipa DLBC (57%), dok je kod ispitanika ženskog pola bio zastupljeniji folikularni limfom (67%).

## LITERATURA

1. Jalan Y L, Bandar T R. Fundamentals of the Management of Non-Hodgkin Lymphoma. Med J Malaysia, 2009 Vol 64
2. Hadzi-Pecova L, Petrussevska G, Stojanovic A. NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS: IMMUNOLOGIC PROGNOSTIC STUDIES. Contributions, Sec. Biol. Med. Sci., MASA, XXVIII, 1, p. 39-55 (2007)
3. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer Statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58: 71-96.
4. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182(3):311-322.
5. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983;31:13-20.
6. Hall PA, Richards MA, Grehory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. J Pathol 1988;154:223-35.
7. Schrape S, Jones DB, Wright DH. A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphoma. Br J Cancer 1987;55:283-6.
8. Rosenberg SA, et al. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. Cancer 1982;49:2112-35.
9. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 1984;133:1710-15.
10. Marinus A. Noordzij M.D., Theodorus H. van Der Kwast et al. Determination of Ki-67 defined growth fraction by monoclonal antibody MIB-1 in formalin-fixed, paraffin-embedded prostatic cancer tissues. The Prostate 1995; Vol.27, Issue 3,

11. Chan C. The New World Health Organization classification of lymphomas: The past, the present and the future. *Hematol Oncol* 2001; 19: 129–50.
12. Petrovic A, Abramovic M, Mihailovic D, Gligorijevic J, Zivkovic V, Mojsilovic M, Ilic I. Multicolor counterstaining for immunohistochemistry - a modified Movat's pentachrome. *Biotech Histochem*. 2010,Nov 22
13. Stanišić V. Osnovne statističke metode za medicinare, PP "Spektar", Niš, 2001.
14. SPSS: Data Analysis with Comprehensive Statistics Software "computer program". Version 13.0: SPSS Inc; 2004.
15. Bast, R.C., Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Holland, J.F., 2000. *Cancer Medicine*. BC Decker Inc, Canada.
16. Boring, C.C., Squires, T.S., Tong, T., Montgomery, S., 1994. Cancer statistics, 1994. *C.A. Cancer J. Clin.* 44, 7–26.
17. B. Ribba, K.Marron, Z. Agur, T. Alarcón, P.K. Maini, 2005. *Bulletin of Mathematical Biology* 67 (2005) 79–99
18. Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Haematol Oncol* 1984;2:365-71.
19. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
20. Barbareschi M, Girlando S, Mauri F M, Forti S, Eccher C, Mauri F A, Togni R, Dalla Palma P and Doglioni C. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki67 antibodies in breast carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*, 102: 171–175, 1994.
21. De Riese W T, Crabtree W, Allhoff E, Werner M, Liedke S, Lenis G, Atzpodien J, and Kirchner, H. Prognostic significance of Ki-67 immunostaining in nonmetastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 11: 1804–1808, 1993.
22. Gerdes, J, Schwab U, Lemke H and Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, 31: 13–20, 1983.
23. Youssef E M, Matsuda T, Takada N, Osugi H, Higashino M, Kinoshita H, Watanabe T, Katsura, Y, Wanibuchi H and Fukushima, S. Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Cancer (Phila.)*, 76: 358–366, 1995.
24. Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987;152:287-95.
25. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow, M, Schluter, C, Galle J and Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.*, 168:357–363, 1992.
26. Benjamin, D. R. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and paediatric tumours: assessment of proliferative activity. *Pediatr. Pathol.*, 11: 507–519, 1991.
27. Khine M M, Aung W, Sibbons P D, Howard C V, Clapham E, McGill F and Van Veilzen D. Analysis of relative proliferation rates of Wilms' tumor components using proliferating cell nuclear antigen and MIB1-1 (Ki-67 equivalent antigen) immunostaining and assessment of mitotic index. *Lab. Investig.*, 70: 125–129, 1994.
28. Delahunt, B., Farrant, G. J., Bethwaite, P. B., Nacey, J. N., and Lewis, M. E. Assessment of proliferative activity in Wilms' tumor. *Anal. Cell. Pathol.*, 7: 127–138, 1994.
29. W Paulus, J Meixensberger, E Hofmann, W Roggendorf. Effect of embolisation of meningioma on Ki-67 proliferation index. *Clin Pathol*; 46:876-877, 1993.
30. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1991; 39(6):741-748.(Biology)
31. Mazen A, Ghanem, Theo H, Van der Kwast, Mondastri K, Sudaryo, Rejiv B, Mathoera, et al. MIB-1 (KI-67) Proliferation Index and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 Protein Expression in Nephroblastoma. *Clinical Cancer Research*; Vol. 10, 591–597, January 15, 2004.

## MIB 1 IN NON-HODKIN LYMPHOMA

Vladan Milošević, Randelović Jasmina, Vojinović Jovica

Non-Hodgkin lymphomas are malignant lymphocyte tumors, extremely heterogeneous from the standpoint of histological subtypes. Any group, of this lymphoid tumors, can manifest at any age, often manifesting with enlarged lymph nodes, fever and weight loss. MIB 1 is a monoclonal antibody for Ki-67 as antigen. It has great affinity for Ki-67 nuclear antigen and it is used to detect Ki-67 antigen in cells.

The aim of this study was to evaluate the percent of MIB-1 positive cells in non-Hodgkin's lymphoma by type of DLBC and FL in patients of different age.

In the aim of this study was used a group of 10 patients with diagnose of non-Hodgkin's lymphoma (7 men and 3 women). The study was conducted on samples collected at the Center for Pathology, Clinical Center in Nis, in a period from 2006. to 2010. year. Primary antibody used in this paper was MIB 1. Stained preparations were analyzed using a Nikon Eclipse 50 microscope. Determination of MIB 1 positive cells number was performed using a computer program ImageJ, plugin Point Picker.

Of the ten patients, five of them were diagnosed as diffuse large B cell type of non-Hodgkin lymphoma (DLBC); the other five was diagnosed as follicular lymphoma (FL). The number of MIB 1 positive cells in FL varied from 17 to 23 per hundred cells. In non-Hodgkin DLBC lymphoma, number of MIB 1 positive cells varied in the range of 36 to 40 per hundred cells.

MIB 1 is useful in determining the malignant potential and proliferation index of the cells in malignant process. The incidence of diseases such as DLBC and FL was different at different sexes. Among male respondents were noted increased frequency of non-Hodgkin lymphoma type DLBC (57%), while for female gender were more frequent follicular lymphoma (67%).

**Key words:** Non-Hodgkin's lymphoma, MIB1, DLBC, FL.