

Lymphomák molekuláris patológiai diagnosztikája

A lymphomák diagnosztikája és klasszifikációja az elmúlt 10 évben jelentősen átalakult. A jelenlegi osztályozás az immunfenotípuson alapul, de a molekuláris módszerek egyre fontosabb részét képezik a diagnosztikának, mert alkalmasak az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeinek megerősítésére és további fontos új adatokkal is szolgálnak. Ma már a pontos és megbízható patológiai diagnózis elengedhetetlen, mert a lymphomás betegek szövettani típustól függő specifikus terápiában részesülnek és túlélési esélyeiket alapvetően az első, megfelelő kezelés határozza meg. Tekintettel arra, hogy a non-Hodgkin lymphomák kb. 70%-át a follikuláris (FL) és diffúz nagy B-sejtes lymphomák (DLBCL) képezik, gyakoriságuk miatt nagyjából ezek a lymphomákon végeztük vizsgálatainkat.

A follikuláris lymphomák komplex diagnosztikája

A FL-ák a non-Hodgkin lymphomák 30-35%-át teszik ki a fejlett országokban. Nálunk ez az arány alacsonyabb, intézeti adataink szerint kb. 15-20%, de az arány egyértelműen emelkedő tendenciát mutat. Célunk volt az Országos Onkológiai Intézet anyagában 1990-1995 között diagnosztizált follicularis lymphomák áttekintése és újraértékelése az újabb immunhisztokémiai és molekuláris patológiai módszerek felhasználásával. Az eseteket a korábbi lymphoma osztályozások follikuláris lymphomákra használt szinonimáit figyelembe véve választottuk ki. Vizsgáltuk a különböző módszerek (klasszikus morfológia, immunhisztokémia, molekuláris patológia) diagnosztikus értékét.

Módszerek

Véletlenszerűen, összesen 53, 1990-95 között follicularis vagy centrocytás, centroblastos lymphomaként diagnosztizált esetet vizsgáltunk. Újraértékeljük a szövettant. A súlyossági fokozat (grade) megadása az új WHO ajánlás, illetve a proliferációs aktivitás figyelembe vételével történt.

Immunhisztokémia

Minden esetben elvégeztük a CD10, CD21, CD23, CD35, bcl-2, bcl-6, Ki-67, p53, cyclin D1, CD5, CD43 immunhisztokémiai reakciókat (1. táblázat)

1. táblázat: Sejtfelszíni antigének jellemző expressziója, immunhisztokémiai reagensek adatai. (Származási hely: CD10 Novocastra, a többi antitest DAKO. Az összes ellenanyag monoklonális volt.)

Antitest típusa	Jellemző expresszió
CD10	FC sejtek, FL
Bcl-2*	FC sejtek negatívak
CD21, CD35	FDC hálózat
CD23	FDC hálózat, CLL
Bcl-6	FC sejtek, FL, DLBCL
Ki-67	Proliferációs antigén
P53	Kóros p53 fehérje
Cyclin D1	MCL
CD5	MCL, CLL
CD43	MCL, CLL, MZL

Rövidítések: FC= normál folliculus centrum; FL= follicularis lymphoma; FDC= follicularis dendriticus sejt; DLBCL= diffúz nagy B-sejtes lymphoma, CLL= krónikus lymphoid leukaemia; MCL= köpenysejtes lymphoma; MZL= marginális zóna lymphoma

* Csak a reaktív és daganatos kérdés eldöntésében segít. Az összes alacsony malignitású B-sejtes lymphomában és a DLBCL esetekben is megjelenhet.

Az összes immunhisztokémiai reakciót a minták paraffinos blokkjaiból készült metszeteken végeztük el. Az előhívás standard avidin-biotin és peroxidáz-antiperoxidáz módszerrel történt.

Génátrendeződés

A DNS izolálást minden esetben archivált paraffinos blokkokból végeztük. A bcl-2 és az immunglobulin nehézlánc (IgH) génátrendeződés vizsgálata PCR módszerrel és hagyományos gélelektroforézis vizsgálattal történt. Újabb erre a célra kapilláris gélelektroforézist használunk (lásuk még a 4. ábrát is).

Eredmények

Az 53 eset revíziója után 37 bizonyult FL-nak, 11 eset volt DLBCL, továbbá 1 köpenysejtes lymphoma, 1 marginális zóna lymphoma, 1 noduláris lymphocyt praedominanciás Hodgkin-lymphoma és 2 reaktív follicularis hyperplasia került elő. A follicularis lymphomák között 14 grade 1, 10 grade 2, 9 grade 3a és 4 grade 3b eset fordult elő.

Immunhisztokémia

A bcl-2, CD10, bcl-6 és p53 immunhisztokémiai vizsgálatok eredményét a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: Az egyes antitestek expressziója a daganatsejtekben. A számok a pozitív eseteket, illetve ezek százalékos arányát mutatják egy-egy csoporton belül.

Szöveti típus	Bcl-2	CD10	Bcl-6	P53
FL grade 1 (14)	12 (85%)	13 (93%)	10 (71%)	0 (0%)
FL grade 2 (10)	9 (90%)	10 (100%)	7 (70%)	0 (0%)
FL grade 3a (9)	8 (88%)	7 (77%)	7 (77%)	1 (11%)
FL grade 3b (4)	2 (50%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)
Összes FL (37)	31 (84%)	31 (84%)	27 (73%)	2 (5%)
DLBCL (11)	9 (81%)	2 (18%)	7 (63%)	4 (36%)
MCL (1)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
MZL (1)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
NLPHL (1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
RFH (2)	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)

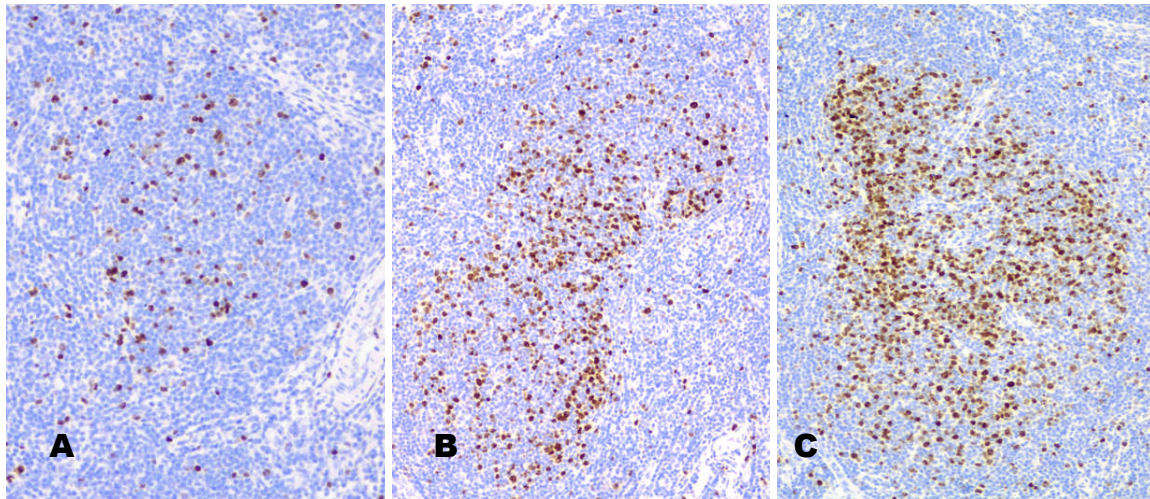
Rövidítések: FL= follicularis lymphoma; DLBCL= diffúz nagy B-sejtes lymphoma, MCL= köpenysejtes lymphoma; MZL= marginális zóna lymphoma; NLPHL= noduláris lymphocyt praedominanciás Hodgkin-lymphoma; RFH= reaktív folliculáris hyperplasia.

A bcl-2 fehérje expresszióját a FL-ák 80-90%-ában megfigyeltük, ami a grade3b daganatokban csökkent leginkább. A CD10 expresszió a grade 1-2 esetekben általában kimutatható volt, de a grade 3 FL-ekben csökkent, illetve a DLBCL-ek egy részében szintén megjelent. A bcl-6 antigén az összes follicularis lymphoma típusban 60-70%-ban, illetve a

DLBCL-ek több mint felében volt kimutatható. A kóros p53 fehérje csak a grade 3 FL-ekben és néhány diffúz nagy B-sejtes lymphomában jelent meg.

Minden esetben vizsgáltuk a folliculáris dendriticus sejtes hálózat jellegét CD21 vagy CD35 antitesttel. Míg a grade 1-es esetekben a reakció jól körülírt volt, a grade 2-3 FL-ekben feltöredezetté vált, a diffúz területekben pedig sokszor csak kisebb gócbokban volt folliculáris dendriticus sejthálózat kimutatható (3. táblázat). Egyéb elváltozásokban jellegzetes dendriticus sejt- elrendeződés volt megfigyelhető.

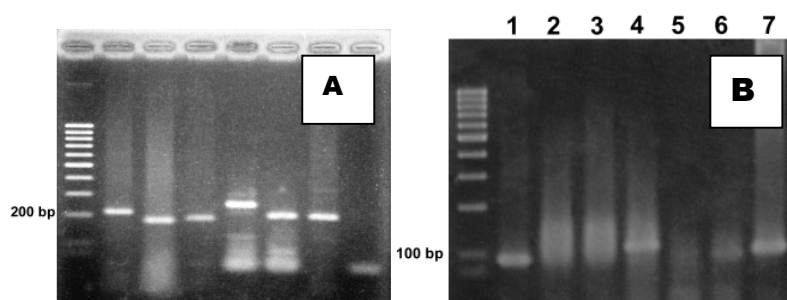
Ki-67 markerrel a sejtproliferációs aktivitás a grade 1-es esetekben mindig 10% alatt, a grade 2-es FL-ekben 20-30% közötti volt, a grade 3-as esetekben pedig meghaladta a 30%-ot (1. ábra).



1. ábra: A grade 1,2, 3 FL-ekben jellemző proliferációs aktivitás Ki-67-tel. A. Grade 1 FL 10% alatti proliferációs aktivitás (in situ indirekt immunhisztokémiai reakció, H. magfestés, x200). B. Grade 2 FL 10-20% közötti proliferációs aktivitás (in situ indirekt immunhisztokémiai reakció, H. magfestés, x100). C. Grade 3 FL 30-40% közötti proliferációs aktivitás (in situ indirekt immunhisztokémiai reakció, H. magfestés, x100).

Génátrendeződés vizsgálata

A DNS izolálás során 7 esetben nem tudtunk megfelelő minőségű DNS-t nyerni a paraffinba ágyazott blokkokból (5FL, 1 DLBCL és 1 reaktív nyirokcsomó). Az FL-ek 55%-ában volt bcl-2 génátrendeződés kimutatható. Ezen belül a grade 1-2 esetek 70, a grade 3 esetek 30%-ában. Az összes grade 3 bcl-2 génátrendeződést mutató FL grade 3a típusú volt. Az immunglobulin nehézlánc átrendeződés vizsgálata során háromféle mintázat volt megfigyelhető: poliklonális, poliklonális háttérben monoklonális csík és monoklonális (2. ábra). Az FL-ek 48%-a monoklonális jellegű IgH génátrendeződést mutatott. A grade 3 és grade 1-2 FL-ek körülbelül egyenlő arányban (44-53%) mutattak monoklonális jellegű átrendeződést.

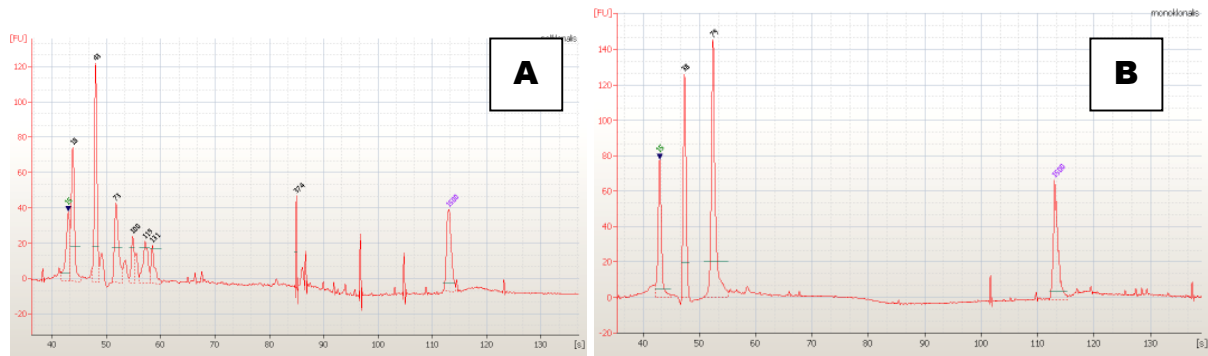


2. ábra Bcl-2 (A) és IgH (B) génátrendeződés jellemző mintázata follicularis lymphomákban.

A. A bcl-2 génátrendeződés során 180-200bp magasságában látjuk az átrendeződésre jellemző csíkot. Ritkán más típusú, eltérő hosszúságú terméket adó átrendeződés is megfigyelhető.

B. Az IgH átrendeződése során háromféle jellegzetes mintázat látható. Monoklonális (1,7 eset), poliklonális (2,3 eset), illetve poliklonális háttérben monoklonális csík (4 eset).

Legújabbban a génátrendeződés vizsgálatára néhány esetben már a nanotechnológiának számítógépes Agilent 2100 bioanalyzer típusú kapilláris elektroforézis módszerét használtuk (3. A és B ábra), amely sokkal jobb felbontást és pontosabb analízist tett lehetővé.

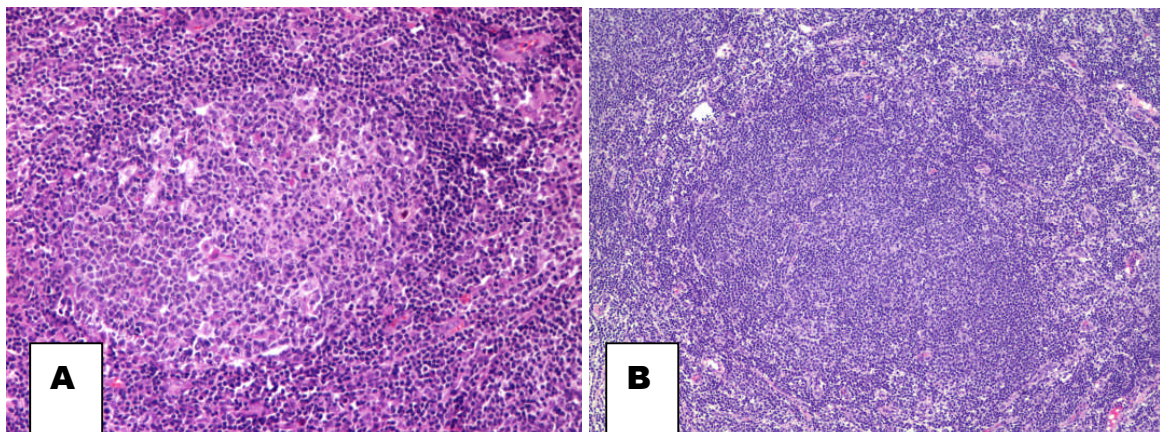


3. ábra: Az immunoglobulin génátrendeződés mintázata az elektroferogramon. A: poliklonális, B: monoklonális

Megbeszélés

Az 53 korábban FL-nek tartott eset szövettani revíziója során változatos szövettani szerkezet jelent meg és ezért az újabb diagnosztikai módszerekre is szükség volt. Ez nem meglepő, hiszen a follicularis mintázat és a centrocitás, centroblasztos morfológia nem kizárólag az FL-ek sajátja. Az FL-eket a reaktív follicularis hyperplasiától, a follicularis kolonizációt mutató alacsony malignitású B-sejtes lymphomáktól (CLL, köpenysejtes, marginális zóna lymphoma), a noduláris lymphocita predominanciás Hodgkin-lymphomától és bizonyos esetekben a diffúz nagy B-sejtes lymphomáktól kell elkülöníteni.

A HE festett metszetek vizsgálata, a morfológia alapvető fontosságú, de biztonságos differenciál diagnosztika csak az immunhisztokémiai illetve részben a molekuláris patológiai módszerek segítségével lehetséges. A fő diagnosztikus kritériumok: **1.** A klasszikus morfológiai jelek közül a legfontosabb a folliculus centrumok struktúrájának felborulása. A centrumokban a polarizáltság eltűnik, nincs világos és sötét zóna, a „tingible body” macrophagok hiányoznak. Nincs meg a jellegzetes aszimmetrikus köpeny zóna (4.ábra).



4. ábra: A: Reaktív folliculáris hyperplasia (HE, x200). B:) és neoplasticus folliculus szövettani képe (HE, x100). A reaktív folliculus centrumok strukturáltak, jól elkülönülő világos és sötét zóna figyelhető meg, míg a neoplasticus folliculusokban a struktúra eltűnik, monoton sejtproliferáció látható.

2. Bcl-2 fehérje expressziója a folliculusokban. 3. Csökkent proliferációs aktivitás. 4. CD10 pozitív centrociták intra- és interfolliculárisan. 5. A bcl-2 génátrendeződés kimutathatósága alátámasztja a diagnózist, de önmagában, egyéb morfológiai jelek nélkül nem diagnosztikus értékű, hiszen ritkán reaktív nyirokcsomókban, egészséges egyéneknél is kimutatható.

A „legfontosabb” antitestek: a bcl-2, CD10, bcl-6, CD21, CD35, és a Ki-67. A bcl-2 expresszió csak a „reaktív vagy daganatos” kérdés megválaszolásában segíthet, hiszen a legtöbb alacsony malignitású non-Hodgkin lymphomában kimutatható. Ugyanakkor a reakció értékelésénél több dolgot is figyelembe kell venni. A folliculus centrumban található reaktív T-sejtek bcl-2 pozitívak, így nagy számuk esetén tévesen pozitívnak nézhetjük a reaktív folliculus centrumokat is. Ugyanakkor a FL-ek egy része eleve bcl-2 negatív. A folliculus centrum eredetét jelző CD10 és bcl-6 antitestek a legspecifikusabbak, de ezek expressziója is változó. A CD10 gyakran eltűnik a grade 3 FL-ekben. Az immunfenotípus változását valószínűleg a transzformálódó folliculáris lymphomákra jellemző fokozott kromoszómális instabilitás következtében kialakuló genetikai eltérések okozzák. A csíracentrum eredetű sejtekből kiinduló DLBCL-ek szintén CD10 pozitívak, illetve a bcl-6 fehérje expresszió is gyakori. A diagnosztikát nagyban segíti a follicularis dendriticus reticulum sejtes (FDC) hálózat kimutatása, illetve ennek jellege utal a differenciáltságra is. A grade 2-3 FL-ekben feltöredezik, transzformáció során gyakran el is tűnik az FDC hálózat. A differenciál diagnosztikában is egyik legfontosabb segítségünk az FDC hálózat jellege (3. táblázat).

3.táblázat: Az FDC hálózat jellege a különböző B-sejtes lymphomákban.

Elváltozás típusa	FDC hálózat jellege
Reaktív FC	Jól körülírt, kifejezett
FL, NLPHL	Expandált, laza, noduláris jellegű
Follicularis kolonizációt mutató egyéb low grade B-sejtes lymphomák (CLL, MCL, MZL),	Lehet a FL-hoz hasonlóan expandált, vagy az eredeti tüszők helyén maradvány
Diffúz növekedést mutató CLL/SLL, MZL, DLBCL	Nincs, esetleg maradvány FC területén
MCL	Diffúz, reticularis

Rövidítések: FDC= follicularis dendriticus sejt; FC= folliculus centrum; FL = follicularis lymphoma; NLPHL = noduláris lymphocita predomanciás Hodgkin-lymphoma; CLL = krónikus lymphoid leukaemia; MCL = köpenysejtes lymphoma; MZL = marginális zóna lymphoma; DLBCL = diffúz nagy B-sejtes lymphoma.

Az FL-ekben, a ritka, teljesen diffúz eseteket kivéve, mindig kimutatható a noduláris jellegű expandált FDC hálózat. Ugyanez jellemző a NLPHL-re és a folliculáris kolonizációt mutató többi alacsony malignitású B-sejtes lymphomára is. Ezekben az esetekben elsősorban a citomorfológia és a CD10 pozitivitás hiánya, illetve az 1. táblázatban részletezett jellemző pozitív reakciók segítenek a diagnosztikában. A diffúz növekedést mutató CLL-ben, MZL-ben, DLBCL-ben inkább csak egy-egy maradvány tüszőnek megfelelő góc látható, vagy egyáltalán nem mutatható ki FDC hálózat. Jellegzetes az MCL-ben gyakran megfigyelhető diffúz, reticularis jellegű hálózat, amit a háttérben jelenlévő elszórt follicularis dendriticus

sejtek képeznek. A p53 fehérje kóros expresszióját csak a grade 3 FL-ekben és DLBCL-ekben figyeltük meg. Ez nem meglepő, hiszen nagyobb esetszámot feldolgozó tanulmányokban is azt találták, hogy részben a grade 3 illetve a transzformálódó FL-ekre jellemző a p53 gén mutációja. A legújabb irodalmi adatok szerint sem a p53 gén mutációja, sem a kóros fehérje expressziója nem jelent egyértelműen agresszívebb kórlefolyást, vagy gyakoribb relapsust.

A FL-ek súlyossági fokozatának megadása nagy körültekintést igénylő feladat. A centroblastok pontos leszámolása nehézkes. Ugyanakkor a proliferációs aktivitás vizsgálata, például a Ki-67 pozitív sejtek aránya jól korrelál a sejtosztódással és a centroblastok számával. 10-20% közötti aktivitás jellemző a grade 1, 20-30% közötti a grade 2 és 30% fölötti a grade 3 elváltozásokra. A HE festett metszetekben számolt (becsült) centroblast szám és a proliferációs aktivitás együttes értékelése segíthet a pontos besorolásban.

Az irodalmi adatok szerint a FL-ek 90%-ában lehet bcl-2 génátrendeződést kimutatni. Ebből az esetek 80%-ában az általunk is vizsgált „major breakpoint regio”-ra (MBR) esik az átrendeződés. A mi eredményeink ettől jelentősen elmaradnak, hiszen csak az esetek 55%-ában tudtunk génátrendeződést kimutatni. Véleményünk szerint ennek oka a fixálási eljárás során degradálódó DNS volt, de az újonnan bevezetett kapilláris gélelektroforézis módszer szintén javíthatja a kimutatás érzékenységét. Az immunglobulin nehézlánc génátrendeződés során tapasztalt gyakori poliklonalitás a follicularis lymphomákra jellemző folyamatos típusú szomatikus hipermutációval is magyarázható. Az ép folliculus centrum sejtjeihez hasonlóan a tumorsejtek is reagálhatnak az újabb antigénekre, és a fiziológiásan megfigyelhető folyamatos jellegű szomatikus mutációt mutatják. Ez a jelenség intraklonális heterogenitást okoz, ami poliklonális IgH mintázatot ad a teljes tumorszövet vizsgálata során. A fentiek miatt nagyon fontosnak tartjuk, hogy haematologiai betegség gyanúja, de optimális esetben minden nyirokcsomó elváltozás esetén friss anyag kerüljön -70°C -on mélyfagyasztásra és hosszú idejű tárolásra szövetbankban. A molekuláris patológiai vizsgálatok eredménye ugyanis sokkal megbízhatóbb lesz, ha az fixálatlan mintából történik.

Az 53 beteg szövettani mintáinak revíziója után azt mondhatjuk, hogy az esetek 90%-ában a morfológia és az immunfenotípus vizsgálata elegendő volt a pontos diagnózishoz. A tévedéshez legtöbbször egyes immunhisztokémiai reakciók hiánya, illetve az elvégzett immunhisztokémiai reakciók technikai vagy értékelésbeli hibája vezetett. A biztonságos diagnosztika elengedhetetlen feltétele volt a megfelelő kontrollok (laboratóriumunkban ép tonsilla) segítségével optimalizált immunhisztokémia. Az esetek 10%-ában ugyanakkor döntő jelentőségű volt a bcl-2 vagy az immunglobulin nehézlánc génátrendeződés vizsgálata. Hangsúlyozni szeretnénk, hogy ugyan a diagnosztikában csak 10%-ban volt szükség a génátrendeződés vizsgálatára, ennek viszont döntő jelentősége van a betegek követésében, a minimális reziduális betegség, illetve a korai relapszusok kimutatásában.

Végül ismételtén a pontos szövettani diagnózis fontosságára szeretnénk felhívni a figyelmet, mivel a relatíve hosszú kórlefolyás miatt a diagnosztikus tévedések későn, illetve néha nem is derülnek ki. A jelenlegi terápiás következményeket figyelembe véve fontos a follicularis lymphomának az egyéb alacsony malignitású lymphomáktól való elkülönítése, a pontos grade megadása, hiszen a grade 1-2 és grade 3 follicularis lymphomák eltérő kezelésben részesülnek. Éppen ezért nagyon lényeges a magas malignitású lymphomáktól való elkülönítés is, mert a de novo diffúz nagy B-sejtes lymphomák kezelésre adott válasza és ebből következően prognózisa kedvezőbb, mint a grade 3, illetve transzformálódó follicularis lymphomáké.

Diffúz nagy B-sejtes lymphomák aberrans somaticus hypermutációja

A diffúz nagy B-sejtes lymphomák morfológiailag és klinikailag jól elkülönülő csoportját a primer mediastinális nagy B-sejtes lymphomák képezik. Ezen daganatok sejtes

eredete vita tárgyát képezi az irodalomban. Az eddig végzett vizsgálatok egy része a daganatsejtek germinális centrum eredetét támasztotta alá. Az újabb génexpressziós vizsgálatok részben a Hodgkin lymphomákhoz hasonló expressziós profilt mutatnak. A diffúz nagy B-sejtes lymphomákban mostanában leírt, genetikai instabilitást okozó elváltozás az aberráns somaticus hypermutáció (ASHM). Az ASHM a fiziológiás szomatikus hypermutáció hibás működése során alakul ki és az agresszív B-sejtes lymphomák mintegy 50%-ában megfigyelhető. A SOTE I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetével kooperációban mediastinális lymphomákban vizsgáltuk az ASHM jelentőségét. A vizsgálatok a c-myc, PAX-5, RhoH proto-onkogénekben az ASHM gyakori jelenlétét mutatták, ami az ASHM jelentőségét jelzi ezen lymphomák kialakulásában. Ez alapján a mediastinális nagy B-sejtes lymphoma inkább az agresszív B-sejtes lymphomákhoz közel állónak tartható.

Gyomor MALT lymphomák: FISH módszer alapú diagnosztikus algoritmus

A gyomor MALT lymphomája egy baktérium, a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fertőzés hatására kialakuló indolens lymphoma. Erre számos bizonyíték van: (1) *H. pylori* kimutatható a legtöbb MALT lymphomában. (2) Epidemiológiai vizsgálatok szerint ott magasabb a MALT lymphoma aránya, ahol a *H. pylori* fertőzés gyakoribb. (3) Esettanulmányokban bizonyították az előzetes fertőzésnek a lymphoma kialakulásával való összefüggését. (4) MALT lymphoma B-sejt klónok kimutathatók a megelőző chronicus gastritisben. (5) In vitro kísérletekben MALT lymphoma sejteinek növekedése kiváltható hőkezelt baktériumokkal. (6) *H. pylori* eradíció az esetek 50%-ában a lymphoma regressziójához vezet.

A MALT lymphoma kialakulásának genetikájáról számos ismerettel rendelkezünk. A krónikus *H. pylori* fertőzés hatására kialakuló immunválasz során poliklonális jellegű B-sejt proliferáció indul el. A gyomorban a bél Peyer plaque-jaival analóg szerzett mucosa asszociált lymphoid szövet (MALT) alakul ki. A perzisztáló lymphoid proliferáció során fokozott genetikai instabilitás következtében kialakuló kromoszóma-triszómiák (3, 12, 18) és transzlokációk következtében először korai, *H. pylori* dependens, majd *H. pylori* independens MALT lymphoma alakul ki. A dependens formák antibiotikus kezeléssel, a baktérium kipurításával visszafejleszthetők, míg az independensek esetében ez a kezelési mód hatástalan. További genetikai károsodások az indolens lymphoma transzformációjához vezetnek. Ezen genetikai károsodások közül több, a MALT lymphomák biológiai viselkedését meghatározó transzlokáció ismert. A t(11;18)(q21;q21)/API2-MALT1 transzlokáció az esetek mintegy 20-25%-ában mutatható ki. E transzlokációt hordozó lymphomák *H. pylori* independensek, gyakorlatilag soha nem transzformálódnak high grade lymphomákká, ugyanakkor a mucosalis disszemináció gyakori. A szintén *H. pylori* independens lymphomákra jellemző t(1;14)(q22;q32)/IgH-bcl-10, a t(14;18)(q32;q21)/IgH-MALT1 és a t(3;14)(p14.1;q32)/IgH-Bcl-6 transzlokációk esetében gyakori a high grade transzformáció. Ilyen esetekben az 1. kromoszómán lévő Bcl10 génfehérje termékének kóros expressioja utalhat a transzlokáció jelenlétére. Ugyanakkor a jelenleg rendelkezésre álló antitestek nem elég megbízhatóak. Éppen ezért kezdtük vizsgálni egyes transzlokációk jelenlétét szövettani diagnosztikára beküldött MALT lymphomákban. FISH módszerrel alapuló diagnosztikus algoritmust dolgoztunk ki, amelynek segítségével információt nyerhetünk a gyomor MALT lymphomák esetében a várható terápiás hatásról, illetve a várható biológiai viselkedésről.

Módszer

A FISH vizsgálatokhoz IgH és MALT1 split próbákat (DAKO) használtuk. A próbákat először paraffinos rutin szövettani metszetből izolált sejtmagokon teszteltük. (A sejtmagizolálást megfelelő emésztési idő, hőmérséklet, emésztő enzim típusának kiválasztása és Millipore 50µ pórusméretű szűrő beállításával valósítottuk meg). Ezt követően a módszert

lenyomati keneteken is beállítottuk. A reakciót a DAKO Histology FISH accessory kit (K5599) eljárási utasítása alapján végeztük. (Az eljárást részletesen nem ismertetjük, mindössze néhány praktikus megfigyelésünket említjük meg. A mintákat kit-beli Pre-treatment oldattal 98-99°-on 10 percig érdemes elő-denaturálni. A pepszin emésztésnél fontos a megfelelő hőmérséklet (37 °C) és a nedves környezet biztosítása, továbbá a szövetmintától függő egyedi emésztési idő beállítása. A próba és a minta együttes denaturációja „hot plate”-en 85 °C-on 5 percig nedves kamrában történik. A hybridizációs reakció éjszakán át 45 °C-on sötétben történik. A DAPI magfestéshez antifade-del kellőképpen hígított megfelelő koncentrációjú oldat szükséges.) Az eredményét FITC és Texas Red szűrővel Nikon Eclipse E 80 fluorescens mikroszkópon detektáltuk. Az ún. split próbák esetén ha nincs transzlokáció, a két jelölt (piros és zöld színű fluorescens festék) egymás közelében lévő szakasz sárga színű jelet eredményez, transzlokációnál ezek a szakaszok távol kerülnek egymástól, így sárga szignál helyett 1 vagy 2 piros ill. zöld szignált láttunk.

Eredmények

Harminc gyomor MALT lymphomát vizsgálva 4 esetben a Bcl10 fehérje fokozott expressióját mutattuk ki. Az IgH split próbával 6 esetben tudunk transzlokációt detektálni, amiből 2 eset mutatta az API2-MALT1 transzlokációt.

Az IgH „split”, azaz hasadó próba segítségével az antibiotikus kezelésre nagy valószínűséggel nem reagáló esetek kiszűrhetők, mivel a 14-es kromoszómán elhelyezkedő immunglobulin nehézlánc gén a *H. pylori* independens MALT lymphomákban szinte az összes eddig megismert transzlokáció egyik partner génje. Az API2-MALT1 transzlokáció kimutatásával pedig a magas malignitású transzformációra való hajlamot szűrhetjük ki. Így a terápiás döntés meghozatalához fontos további információval járul hozzá a vizsgálat.

Korai esetekben, IE1 stadiumban, ha IgH és API2-MALT1 transzlokáció nem mutatható ki, a *H. pylori* eradication általában hatásos. Antibiotikus kezelés hatástalansága, IgH illetve API2-MALT1 transzlokáció jelenléte, illetve IIE2-IV stádium esetében kemoterápia illetve kemoterápia és sugárkezelés a választandó terápia.

Follicularis lymphoma csontvelői infiltrátumában klonális szelekció vizsgálata

A SOTE Isz Pathológiai Intézetében Dr Matolcsy András munkacsoportjával kooperációban végzett munka. Összehasonlítottuk 21 beteg primer nyirokcsomó elváltozását és csontvelői infiltrátumát morfológiai és immunhisztokémiai jellemzőik alapján. Három esetben az immunglobulin nehézlánc variábilis régiójának szekvencia analízise segítségével elkészítettük a nyirokcsomói illetve a csontvelői tumor klónok családfáját. Ezen vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy különböző sejtklónok népesítik be a nyirokcsomót és csontvelőt. A csontvelői infiltráció a klonális evolúció eltérő pontján jelenik meg. A korai tumoros klónok leszármazottjai mutathatók ki a csontvelőben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a follicularis lymphomák csontvelői infiltrációja során a tumorsejtek intenzív klonális szelekción mennek át. A csontvelőben a nyirokcsomó germinális centrumjaihoz hasonló mikroenvironment alakul ki és a tumorsejtek megőrzik a folyamatos típusú somaticus hypermutáció képességét.

Minimális reziduális betegség kimutatása folliculáris lymphomás betegekben

Az alacsony malignitású FL-akat klinikailag hosszú kórlefolyás jellemzi többszöri kiújulással. Általában hagyományos kezelési módokkal komplett klinikai remisszió ritkán érhető el, inkább sokszor stationer állapotban van a betegség. Ha mégis sikerül komplett klinikai választ elérni az a beteg számára jobb prognózist jelent. A betegség során relapsus a maradvány keringő tumorsejtekből alakul ki. Irodalmi adatok szerint, amikor nem tudunk molekuláris módszerekkel daganatsejteket kimutatni, tehát ún. molekuláris remisszióban van

a betegség, az hosszabb relapsus mentes túlélést jelent, illetve, ha mégis kiújul a betegség az már molekuláris szinten a klinikai tünetek megjelenése előtt kimutatható.

A minimális reziduális betegség (MRB) általános fogalma alatt a klinikailag komplett remisszióban meglévő kisszámú tumorsejtek jelenlétét értjük a csontvelőben, vérben vagy nyirokcsomóban. A MRB vizsgálatában klinikai problémát jelent, hogy túlélésre vonatkozó hatása kevésbé ismert, relatíve kevés a nagyobb klinikai tanulmány és az MRB kimutatására alkalmazott technikák sokfélesége miatt nehéz az egyes tanulmányok összehasonlítása. Az eddigi adatok főleg a MRB prognosztikai jelentőségére utaltak. Az MRB kimutatásához a tumorsejtek alacsony száma miatt érzékeny módszerre van szükség. FL-ák esetén leginkább specifikus a BCL-2 transzlokáció kimutatása, amely az esetek 75-80%-ban jelen van. A technikai nehézséget végső soron az okozza, hogy a csontvelő biopszia megterhelő a beteg számára, a perifériás vérben pedig nagyon kevés a keringő tumorsejt, vagyis a folyamatos monitorozáshoz nincs ideális minta. A legtöbb eddigi tanulmány főleg a csontvelő vizsgálatán alapult, kevés a perifériás vérből végzett vizsgálat. A fent említett nehézségek miatt az alábbi célt tűztük ki: saját érzékeny, specifikus és jól reprodukálható módszert dolgozunk ki, ami bcl-2 transzlokáció kimutatásán alapul és ennek segítségével keressük folliculáris lymphomás betegek perifériás vérében keringő daganatsejteket az MRB meglétének igazolására.

Betegek és Módszerek

A módszertani cikkünkben (Csernák et. al, Haematologica, 91:858-859, 2006) 29 beteg 107 perifériás vérmintáját, 6 csontvelő és 29 nyirokcsomó mintáját dolgoztuk fel. A lymphocytákat Biocoll oldattal szeparáltuk, majd ebből DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS minőségét B-globin reakcióval ellenőriztük, majd elvégeztük a BCL-2 transzlokáció vizsgálatát a major breakpoint (mbr) és minor cluster (mcr) régiókban. Ezeken a helyeken törik el ugyanis leggyakrabban a BCL-2 gén és transzlokálódik a 14-es kromoszómán lévő immunoglobulin nehézlánc régiójához (t(14;18)), és az itt lévő promóter szekvenciák a Bcl-2 fehérje folyamatos expresszióját okozzák. Ezekre a töréspontokra, és az Ig nehéz lánc gén J régiójának konszenzus szekvenciájára terveztünk primereket és próbákat (4. táblázat).

Bcl-2 MBR	mbrp	5'-TgT gTT gAA ACA ggC CAC gTA A-3' LC705
	mbr2IF	5'-TTT gAC CTT TAg AgA gT- FL -TgC-3'
	IgJH2	5'-ACC TgA ggA gAC ggT gAC-3'
Bcl-2 MCR	mcrR	5'-ACC TgA ggA gAC ggT gAC C-3'
	mcriF	5'-TAT CCA gAg CAg CAg ACC- FL -TTg-3'
	mcrP	5'-AAg gAA gCC Agg gAA ACA TTA A-3' LC670

4. táblázat: A Bcl2 transzlokációt kimutató PCR primerek és próbák szekvenciái.

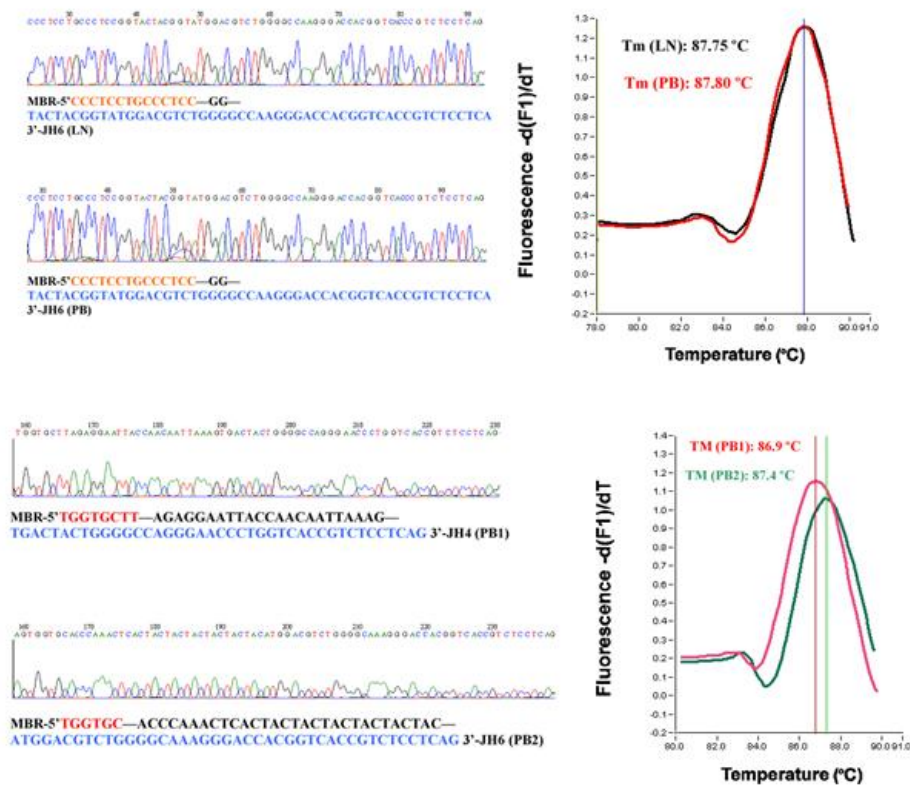
Valószerű kvantitatív PCR eljárás során a belső jelölésű primer fluorescens festéke az első amplifikációs ciklus után beépül az új szádba, amelyhez a következő ciklusban hozzákapcsolódik az ugyancsak fluorescens festékkel jelölt próba. A két festék között gerjesztő fény hatására energia transzfer alakul ki, amelynek a fényemisszióját detektáljuk. A szekvencia specifikus próba előnye, hogy a reakció során csak a specifikus termékeket tudjuk kimutatni.

A vérben keringő tumorsejtek mennyiségi meghatározására egy Bcl2 transzlokációt tartalmazó ismert tumorsejtvonalból származó DNS mintából hígítási sort készítettünk és ennek segítségével meghatároztuk az általunk preparált ismeretlen Bcl2 pozitív minta DNS koncentrációját, ahol egy sejt megfelel 7.2 pg DNS-nek. Eljárásunkkal már a mintában lévő 1-2 tumorsejtet is ki tudtunk mutatni.

Eredmények

Eredményeink szerint az összes minta 16%-ában volt t(14;18) pozitív sejt. Azt találtuk, hogy a csontvelő pozitivitás mindig perifériás vér pozitivitással járt együtt. Összesen 11 esetben tudtunk kimutatni Bcl-2 transzlokációt hordozó sejteket a perifériás vérben ill. a csontvelőben. Ezekben a mintákban olvadáspont analízis segítségével megvizsgáltuk, hogy a periférián keringő Bcl-2 transzlokációt hordozó sejtek azonosak-e az eredeti nyirokcsomóban lévő daganatsejtekkel. Mivel a DNS fragmentumok olvadáspontja függ a GC tartalom %-os arányától és a bázishossztól, a különböző kis variációt mutató (egyedi) transzlokációk elkülöníthetők egymástól. Eredményeinket szekvencia analízissel is igazoltuk.

Nyolc betegnél a csontvelőben és vérben keringő daganatsejtek minden tekintetben azonosak voltak, 3 esetben a vérben keringő lymphoid sejtek Bcl2 transzlokációja a nyirokcsomóban lévő primer daganat sejtjeitől eltért (5. ábra) .



5. ábra: Két eset olvadáspont és szekvencia analízise. A nyirokcsomóból és perifériás vérből származó minták PCR termékeinek olvadáspontjai a felső képen megegyeznek, amelyek azonos tumorsejt klonra utalnak, az alsó ábrán az eltérő olvadáspontok pedig a nyirokcsomóban lévő tumorsejt klontól eltérő Bcl-2 transzlokáció jelenlétét mutatja a perifériás vérben.

Azokban az esetekben, ahol a nyirokcsomóban és vérben meglévő t(14;18) pozitív klónok eltérőek voltak, vagyis nem volt MRB kimutatható, a beteg remisszióban vagy stationer állapotban volt és progresszió nem volt megfigyelhető.

Az általunk kidolgozott valós idejű PCR standardizálható, minőségi és mennyiségi meghatározásra alkalmas módszer. Már 1-2 keringő tumorsejt kimutatható, segítségével a terápiás válasz jól nyomon követhető. A folliculáris lymphomás betegek perifériás vérében az eredeti klontól eltérő Bcl-2 transzlokációk is kimutathatók, aminek következtében kiegészítő módszerekre van szükség, hogy a betegséggel össze nem függő transzlokációkat kizárhassuk

és ne tegyük ki a betegeket felesleges kezelésnek. Ennek kimutatását olvadáspont analízissel végeztük el, ami lényegesen egyszerűbb a szekvencia analízisnél.

A fent bemutatott vizsgálatokat az elmúlt évben további nagyszámú adattal egészítettük ki, amelyeket BMDP Vers. PC90 statisztikai software-vel analizáltunk. Összesen 298 perifériás vérmintáját, 68 nyirokcsomó és 23 csontvelő mintáját dolgoztuk fel. Azt találtuk, hogy **vérben keringő daganatsejtek** megjelenése nem függ a klinikai stádiumtól ($P = 0.6393$), a szövettani diagnózissal és gradinggel sem volt szignifikáns összefüggés ($P = 0.1382$), de a Bcl2 transzlokációt mutató vérben keringő daganatsejtek legtöbbször a grade 1-2 FL-k mellett voltak kimutathatók. Szignifikáns összefüggést találtunk 298 beteg aktuális klinikai státusa és a vérben keringő daganatsejtek megjelenése között (5. táblázat). Az összes vizsgált beteg vérmintájának 5 %-ában találtunk vérben keringő daganatsejteket. Ezekben a Bcl2 transzlokáció típusa megegyezett a primer tumoréval.

Daganatsejtek a vérben	Stacioner állapot %	Komplett remissio %	Részleges remissio %	Relapsus kezelés után %	Progressio kezelés nélkül %	Összesen %
Vannak	2.0	0	0.9	1.3	0.8	5.0
Nincsenek	11.4	59.1	10.4	9.1	5.0	95.0
Összesen %	13.4	59.1	11.3	10.3	5.8	100.0

5. táblázat: *Összefüggés a vérben keringő daganatsejtek jelenléte vagy hiánya és a FL-ás betegek aktuális klinikai állapota között. $P = 0.0016$*

Az irodalomban ismert – és mi is megfigyeltük – a primer lymphomával nem azonos transzlokációt mutató lymphoid sejtek jelenlétét a vérben, amelyek különböző okokból, esetleg előzetes kemoterápia hatására alakulnak ki és nem tekinthetők daganatsejteknek. Felismerésük azért fontos, mert jelenlétük független a daganatos folyamattól és nem szabad a molekuláris stádium-meghatározásnál figyelmebe venni őket.

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a MRB vizsgálatának indikációi lehetnek a terápiás érzékenység mérése, új terápiás eljárások esetén tumor ellenes aktivitás meghatározása valamint a relapsus veszély korai kiszűrése. Az általunk kifejlesztett technikákkal a minimális reziduális betegség kimutatása a staging és a betegkövetés rutin részévé válhat. A jelenleg érvényes protokollok szerint FL-ban kimutatott MRB nem rutinszerű eljárás, ezért terápiás következménye sincs. További klinikai vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy az MRB kimutatásának valódi klinikai jelentőségét meghatározzuk.