

**AZ ANAPLÁZIÁS NAGYSEJTES LYMPHOMA MODERN SZEMLÉLETE
(MOLEKULÁRIS GENETIKÁTÓL A HEMOPOETIKUS ŐSSEJT
TRANSZPLANTÁCIÓIG)**

Ph.D. tézisek

Dr. Szomor Árpád

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

**Témavezetők: Prof. Dr. Kelényi Gábor, Prof. Dr. Pajor László
PTE ÁOK Patológiai Intézet**

Pécs, 2003

1. Bevezetés

A daganatos betegségek között a malignus lymphoma incidenciája kifejezett mértékben növekszik. Az anaplázis nagysejtes lymphoma (ALCL) egy viszonylag új - 18 éves - entitás, Ki-1, majd CD30 pozitív lymphomának nevezték el, a nagy malignitású, null- illetve T-sejtes fenotípusú lymphomák közé tartozik. Magyarországon ezidáig nem történt a betegséget érintő komolyabb kutatás. Jelen tanulmányban e kórforma lényegét adó ritka kromoszóma transzlokációk vizsgálata mellett genotípus meghatározásra is sor került, kiegészítve kiterjedt immunhisztokémiai vizsgálatokkal. Francia és angol kutatópartnerrel, valamint patológiai és laboratóriumi együttműködés keretében áramlási citometriai, citogenetikai és további molekuláris genetikai vizsgálatok történtek meg anapláziás nagy sejtes lymphomás betegek mintáin. Létrehoztunk egy országos ALCL regisztert, melyhez az elmúlt évek során nemzetközi viszonylatban is jelentős számú hazai beteg adatát gyűjtöttük össze. A legfontosabb klinikopatológiai jellegzetességek ismertetése mellett az irodalmi adatokkal is összehasonlítottuk a magyar adatokat. A modern terápiák közül az autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben történő alkalmazásáról is beszámolunk.

Mami Shiota és mtsai 1994-ben a t(2;5)(p23;q35) transzlokációval járó Ki-1 lymphomában egy 80 kD molekulatömegű hyperphosphorilált protein tirozin kinázt mutattak ki, melyet p80-nak neveztek el. E fehérje ellen nyúlban termeltettek poliklonális antitestet. RT-PCR technikával bizonyították, hogy a p80 fehérje az NPM-ALK tirozin kináz fúziós fehérjével egyezik. Ötven különböző lymphoma eset közül 3 ízben adódott pozitívnak az anti-p80 festés mind a magban, mind a citoplazmában. A festődés intenzitása nem volt egyenlő a tumorsejtekben. Ezekben az esetekben jelen volt a t(2;5) transzlokáció, ugyanakkor nem észleltek pozitívítást olyan lymphomákban, ahol a transzlokáció nem volt jelen. Pulford és mtsai 1997-ben ismertettek egy új, monoklonális antitestet alkalmazó immunokémiai módszert, melyben az ALK1 antitest felismeri mind a 80 kD-os NPM-ALK kiméra mind a 200 kD-os normális humán ALK fehérje formalin rezisztens epitopját. Ezen új immunhisztokémiai módszer alkalmazásával – az ALK pozitívítást figyelembe véve - diagnosztikus és prognosztikus alcsoportokat hoztak létre az anapláziás nagysejtes lymphomán belül. Korábban klinikai szempontból 4 csoportra osztották fel a betegséget: 1. Szisztémás forma (nodális, extranodális), 2. Primer cutan forma, 3. HIV-related, 4. Szekunder forma (lymphomatoid papulosis, mycosis fungoides, perifériás T-sejtes lymphoma (PTCL), Hodgkin lymphoma transzformációja). Újabban – az ALK festés bevezetése óta – 3 fő csoportot különböztetünk meg: 1. ALK1 pozitív szisztémás ALCL, 2. ALK1 negatív szisztémás ALCL, 3. Primer cutan ALCL (ALK1 negatív). Az ALK pozitív esetek általában

fiatalok, előrehaladott, kiterjedt betegséggel, gyakran extranodális manifesztációval jelentkezik, ugyanakkor a prognózis a legtöbb irodalmi adat szerint szignifikánsan jobb az ALK1 negatív esetekhez képest.

Nagy előrelépést jelentett a betegség patogenezisének pontos tisztázásában, amikor 1989-ben leírtak ALCL-es eseteket, melyben t(2;5)(p23;q35) transzlokáció volt megfigyelhető. Az elmúlt évek során számos molekuláris genetikai eltérést leírtak ALK pozitív ALCL-ben (1. táblázat).

Partner gén	Transzlokáció	Fúziós fehérje molekulatömeg	ALK1 Festődés	Gyakoriság	Szerző (év)
Nucleophosmin	t(2;5)(p23;q35)	80 kDa	Mag, Nucleo, Citoplazma	75 %	Morris 1994
TPM3	t(1;2)(q25;p23)	104 kDa	Citoplazma	18 %	Lamant 1999
TFG	t(2;3)(p23;q21)	85 (S) 97 (L) 113 (XL) kDa	Citoplazma	1 %	Hernandez 1999
ATIC	Inv(2)(p23;q35)	96 kDa	Citoplazma	4 %	Colleoni 2000
CLTC	t(2;17)(p23;q11ter)	248 kDa	Citoplazma (granuláris)	1 %	Touriol 2000
TPM4	t(2;19)(p23;p13.1)	~104 kDa	Citoplazma	< 1 %	Meech 2001
Moesin	t(2;X)(p23;q11-12)	125 kDa	Membrán	< 1 %	Tort 2001
ALO17	t(2;17)(p23;q25)	~192 kDa	Citoplazma	< 1 %	Cools 2002
MYH9	t(2;22)(p23;q11.2)	220 kDa	Citoplazma	< 1 %	Lamant 2003

1. táblázat ALK gén partnereinek ALK pozitív ALCL-ben.

2. Célkitűzések

1. Az anapláziás nagysejtes lymphoma differenciál diagnosztikai nehézségei miatt a pontos szövettani besorolás elősegítése immunhisztokémiai vizsgálatokkal (alap T-, B-markerek, CD30, CD15-ön kívül ALK1 - intracitoplazmatikus eloszlását figyelembe véve, TIA-1, Perforin, Granzyme-B, CD68).
2. Genotípust megállapítása polimeráz láncreakcióval (PCR) az immunglobulin nehéz lánc (IgH) és a T-sejt receptor (TCR) béta- illetve gamma génátrendeződés vizsgálattal.
3. Magyar mintákon először – a t(2;5) és t(1;2) transzlokációk DNS alapú PCR vizsgálata, valamint ezen minták reverz transzkriptáz (RT)-PCR vizsgálata az extrahált RNS-ek felhasználásával.

4. PCR metodikával 33 ALCL-es és 28 B-sejtes lymphomás beteg perifériás véréből a multidrug rezisztencia (MDR) gén mutáció (3435) gyakoriságának megállapítása, valamint 2 esetben csontvelő aspirátumból funkcionális MDR teszt végezése és ezek klinikummal való összevetése.
5. PCR-al 4, a vénás és artériás thrombembolia kialakulásában rizikó tényezőként szerepet játszó mutáció vizsgálata 43 ALCL-es és 22 B-sejtes nagy malignitású lymphomás beteg perifériás véréből (FV Leiden mutáció, Prothrombin G20210A mutáció, PLA2 allél, MTHFR C677T mutáció).
6. Citogenetikai vizsgálat elvégzése 5 ALCL-es beteg csontvelő mintájából, 4 beteg nyirokcsomójából, illetve egy ALCL-es leukémiás beteg perifériás véréből.
7. Áramlási citometriai vizsgálat elvégzése 9 ALCL-es csontvelő mintán, valamint 17 ALCL-es beteg perifériás vérén T- és B-sejt markereket alkalmazva.
8. Keringő NPM-ALK és ALK ellenes antitest kimutatása 27 ALCL-es, 8 DLCL-es és 2 Hodgkin lymphomás beteg szérumából.
9. Egy országos ALCL regiszter létrehozása, melyben a betegek legfontosabb demográfiai, klinikai, szövettani, kezelési és túlélési eredményei lesznek értékelhetők.
10. A hazai 3 felnőtt transzplantációs centrumban végzett 23 ALCL-es beteg autológ hemopoetikus őssejt transzplantációs eredményeinek vizsgálata.

3. Betegek és módszerek

Franciaországban, Toulouse Purpan Egyetem „Laboratory of Anatomic Pathology”-ban Georges Delsol professzor laboratóriumában végeztem molekuláris genetikai és immunhisztokémiai vizsgálatokat. Harminchárom, az ország 5 patológiai intézetéből származó paraffinos nyirokcsomó blokkot (Győr, Kaposvár, Miskolc, SOTE II. Patológia, Szombathely) és 16 fagyasztott nyirokcsomó biopsziás mintát (PTE ÁOK Patológiai Intézet és Szombathelyi Kórház Patológiai Osztály) volt módomban megvizsgálni.

3.1. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz módosított Shi módszerrel végeztük a paraffinos blokkokból az antigén előhívást. Az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

1. Hematoxylin-eosin festés (HE)
2. ALK1 festés
3. Perforin festés
4. TIA-1 festés

5. Granzyme B festés
6. CD68 (Kp1) festés
7. CD30 (Ki-1) festés

3.1.1. Immunhisztokémiai eredmények

A magyar ALCL regiszterben 180 beteg adatai állnak rendelkezésre, közülük nem mindenkinél értékelhető az összes adat. Hetvenegy beteg (44 %) null sejtes, 44 (26 %) T-sejtes, 29 (17 %) B-sejtes az immunfenotípus, míg 25 esetben (15 %) nincs adat. P80, illetve későbbiekben, valamint ismételt vizsgálat során ALK1 festésre 90 esetben került sor. Ezek közül 24 volt pozitív (26,7 %). Amennyiben csak a T/null fenotípusúakat vizsgáljuk, hasonló marad az ALK pozitívak hányada (18/65, vagyis 28 %). Az irodalmi adatok ennek az aránynak a dupláját említik a T/null lymphomások között. Valószínűleg a morfológiai, illetve immunhisztokémiai vizsgálatok bővítésével (pl. BNH9, CBF 78, EMA) az ALCL-es esetek száma anyagunkban csökkenne. ALCL-nek diagnosztizált esetek egy része minden bizonnyal Hodgkin lymphoma ún. „tumorsejt gazdag” altípus, illetve perifériás T-sejtes lymphoma, mely entitásokban az ALK1 természetesen negatív.

A PTE ÁOK Patológiai Intézetben vizsgált immunhisztokémiai reakciók során ALK1 pozitív esetek közül 8-at volt módunkban ismételten megvizsgálni az intracelluláris lokalizáció szempontjából. Citoplazma, mag, magvacska pozitivitást 6 betegnél, csak citoplazma festődést 2 esetben észleltünk.

A Toulouse-ban megvizsgált 35 ALCL-es paraffinos blokkból készített metszeteken végzett ALK1 festés során pozitívnek ítélt 6 esetenél, valamint 1 t(2;5) transzlokáció pozitív fagyasztott anyagon kiegészítő immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Az egyik „paraffinos” metszet végül a megismételt ALK1 festés során negatívnak bizonyult. Az első vizsgálattal a háttér neutrofil peroxidáz reakciók adhatták az álpozitív reakciót. Egy esetben adódott a folyamat monocita marker pozitívnek (CD68), ugyanakkor morfológiailag egy másik eset is lymphohistiocytas képet mutatott. A citotoxikus markerek közül, melyek ALCL-ben történt vizsgálatairól hazai szerzők is beszámoltak a perforin és TIA-1 minden esetben, a Granzyme B 1 esetben volt pozitív. Az ALK1 pozitív esetek intracitoplazmatikus festődése során az 5 eset közül 4 mind mag, nucleolus és citoplazmatikus pozitivitást is mutatott, mely arra utalt, hogy t(2;5) transzlokációval, vagyis nucleophosmin-anapláziás lymphoma kináz gének fúziójával álltunk szemben. Egyetlen esetben észleltünk kizárólag citoplazma festődést, mely a jóval ritkább transzlokációk egyikének jelenlétét sugallta. A fagyasztott mintából nem sikerült kellően jó, finomabb értékelésre alkalmas metszetet

készíteni, mindössze az volt megállapítható, hogy ALK1 pozitív a folyamat. Sajnos a megkísérelt DNS izolálás a paraffinos blokkból nem járt sikerrel, így nem tudunk molekuláris genetikai vizsgálatokat (PCR, Southern blot) elvégezni, pedig annak a lehetősége is megvolt, hogy egy teljesen új transzlokációt fedezünk fel.

Név	CD30	CD68	Perforin	Granz. B	TIA-1	HE	ALK1
15414 TRI22A	POZ	NEG	POZ Cp, M	NEG 1-1 POZ sejt	POZ Cp (gr)	LH	POZ Cp,mag,N
15404 SZI16M	POZ	NT	POZ Cp (gr)	NEG 1-1 POZ sejt	POZ Cp(perinucl)	CT	POZ Csak Cp
15409 BAN21Z	POZ	POZ (diffúz)	POZ Cp, M	NEG Csak háttér	POZ Cp (gr)	LH	POZ Cp,mag,N
15403 KIS46Z	POZ	NT	POZ Cp, M	NEG	POZ Cp(gócos)	CT KS	POZ Cp,mag,N
15410” PÁS78S	POZ	NT	POZ Cp (gr)	Erősen POZ	POZ Cp (gr)	PT CL	NEG artefact
15396 HAV67J	POZ	NT	POZ Cp, M	POZ Cp (gr)	POZ Cp (gr)	CT	POZ Cp,mag,N
15690* GER3M	POZ	NT	POZ Cp, M	NEG Csak háttér ?	NT	CT (?)	POZ

2. táblázat. ALK1 pozitív esetek kiegészítő immunhisztokémiai vizsgálatainak eredménye.

HE: hematoxylin-eosin, POZ: pozitív, NEG: negatív, Cp: citoplazma, M: membrán, gr: granuláris, Granz B: Granzyme B, LH: lymphohistiocytas, N: nucleolus, NT: nem történt vizsgálat, CT: common type, KS: kissejtes, PTCL: perifériás T-sejtes lymphoma, *: fagyasztott minta, melyből bizonytalan az immunhisztokémiai vizsgálat, ” az ismételt ALK1 reakció negatívnak bizonyult.

Az immunfenotípus vizsgálatok során az ALK reakció mellett a folyamat pontos megítélésében segítségünkre voltak a citotoxikus markerek. A morfológiai altípus vizsgálatára a hematoxylin-eosin festés a legalkalmasabb. Legtöbbször common-type és lymphohistiocytás formával találoztunk.

3.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

DNS és RNS izolálás után végeztük el a genotípus vizsgálatokat. DNS-t fenol-kloroform módszerrel izoláltuk, míg az RNS extrakcióhoz a kereskedelemben kapható RNeasy Mini Kit

(Quiagen) technikát alkalmaztunk.

3.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatok

3.2.1.1. c-raf-1 gén

Első alkalommal azt vizsgáltuk, hogy a kinyert DNS-ünk illetve RNS-ünk jó minőségű-e, lehet-e amplifikálni a sorozatos PCR vizsgálatok alatt. Az ún. „housekeeping” génként c-Raf-1-et alkalmaztunk. Az összes fagyasztott mintából nyert DNS jól amplifikálódott. A paraffinos blokkokból extrahált DNS-ek ugyanakkor nem voltak használhatók további vizsgálatokra.

3.2.1.2. Imunglobulin nehéz lánc génátrendeződés (IgH)

A B-sejtes lymphoproliferatív betegségek klonális eredetének bizonyítására seminested PCR technikát alkalmaztunk Trainor illetve Ramasamy módszerével. E két módszer során a FRII-VH illetve a FRIII-VH specifikus band-ek nyerhetők, míg Aubin metodikáját követve a FRI régiót is amplifikáltuk.

3.2.1.3. T-sejt receptor génátrendeződés (TCR)

A T-sejt receptor-béta génátrendeződést két lépéses PCR-val végeztük McCarthy módszerével. A két diversity (D) szegmens közül a Dbéta1, a 13 J régió szegmense közül a Jbéta2 átrendeződését vizsgáltuk az első, a variábilis Vbéta és szintén a Jbéta2 átrendeződését a második lépésben.

A T-sejt receptor-gamma génátrendeződést kettős (gamma1 és gamma2), ún. multiplex PCR-rel, seminested technikával végeztük összesen 7 primer felhasználásával.

3.2.1.4. Kromoszóma transzlokációs PCR vizsgálatok

3.2.1.4.1. t(2;5) transzlokáció

Az ALK pozitív anaplázias nagysejtes lymphoma 75-80 %-ban NPM-ALK gének transzlokációja történik meg. Ezek molekuláris genetikai kimutatására részben RNS alapú PCR-t (RT-PCR-t) lehet alkalmazni, mely sokkal pontosabb eredményeket biztosít. Az át nem íródó DNS szakaszok az RT-PCR során nem zavarják a reakciót, nem keletkeznek nem specifikus amplifikátumok. A RT-PCR-hoz a kinyert mRNS-ből Access RT-PCR system (Promega) reverz transkriptáz segítségével cDNS-t készítettünk.

A t(2;5) transzlokáció során mind az RT-PCR, mind a DNS alapú PCR-nál seminested technikát alkalmaztunk, melynek során az első amplifikátum 1-2 %-a (0,5-1 µl) volt a 2. PCR templátja. Primereink: 5'NPM, ALK1 és ALK2.

3.2.1.4.2. t(1;2) transzlokáció

Az ALK pozitív ALCL 25-30 %-ban nem a NPM-ALK transzlokáció a felelős a malignus átalakulásért, hanem az ALK egyéb fúziós partnerei. Ezek közül a leggyakoribb – az ALK

pozitív esetek mintegy 18 %-ban - a TPM3 gén kerül juxta pozícióba az ALK génnel. Ezen molekuláris genetikai eltérés igazolására is PCR vizsgálatot alkalmaztunk. Az RNS extrakció után és a reverz transzkripció után a következő primerek felhasználásával végeztük a nested PCR vizsgálatot: az első PCR primerei: cTPM1, ALK1. A második PCR során az első PCR temékből 1 µl-t használtunk templátként. A primerek a következők voltak: cTPM3 és ALK2. A PCR kondíciók az előzővel megegyeztek.

3.2.2. Elektroforézis

Polyacrylamide gélt alkalmaztunk (ún. heteroduplex analízis)

1. FR2a/JH-hoz és a TCR- γ -hoz 6 %-osat (acrylamid/bis-acrylamid 29:1)
2. FR3a/JH-hoz 8 %-osat (acrylamid/bis-acrylamid 29:1)
3. FR1c/JH-hoz 5 %-osat (acrylamid/bis-acrylamid 29:1)
4. TCR- β -hoz 7 %-osat (acrylamid/bis-acrylamid 29:1)

Agaróz gélt alkalmaztunk: 1. c-raf-1-hez és t(1;2) transzlokációhoz 2 %-osat

2. t(2;5) transzlokációhoz 1 %-osat

Mindegyik gél tartalmazott 6-8 µl ethidium bromidot a vizualizáláshoz.

3.2.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei

Toulouse-ban az ALCL differenciál diagnosztikai nehézségei miatt szándékosan olyan mintákat is megvizsgáltunk molekuláris genetikai metodikákkal, melyek az ALCL teljes spektrumát, diagnosztikus átfedéseket is érintette.

Betegség	Betegszám	ALK pozitív
Szisztémás ALCL	9	2
Szekunder ALCL (Hodgkin lymphoma transzformáció)	1	0
Szekunder ALCL (Perifériás T-sejtes lymphoma transzformáció)	1	0
Primer cutan ALCL	1	0
Hodgkin lymphoma	2	0
Immunoblastoma	2	0

3. táblázat. Toulouse-ban genotípus vizsgálaton részt vett minták szövettani megoszlása

A táblázatból jól látható, hogy sem a szekunder ALCL, sem a primer cutan forma, sem a Hodgkin lymphoma, sem az immunoblastoma nem mutatott ALK1 pozitivitást. Az immunoblastoma ritka típusában a teljes hosszúságú ALK gén expresszálódik, mely

immunhisztokémiai reakcióval (ALK1 festés) kimutatható. Ezen esetek CD30 negatívak. Az általunk vizsgált 2 eset nem ebbe a ritka csoportba tartozott.

3.2.3.1. Génátrendeződési vizsgálatok eredményei

A 16 fagyasztott minta mindegyikén elvégeztük mindhárom immunglobulin nehéz lánc (IgH) génátrendeződési (FR1c/JH, FR2a/JH, FR3a/JH) és mindkét T-sejt receptor (TCR-béta, TCR-béta) génátrendeződési PCR vizsgálatot. Amennyiben a 3 IgH génátrendeződés közül legalább egynél pozitivitást észleltünk, akkor a folyamatot bizonyítottan B-sejtesnek tartottuk. Hasonlóan, a TCR vizsgálatok közül akár a TCR-béta, akár a TCR-gamma PCR pozitívnak adódott, az eset T-sejtes genotípusú.

Vizsgálat	FR1c/JH	FR2a/JH	FR3a/JH	TCR-γ (γI vagy γII)	TCR-β (Vβ/Jβ vagy Dβ/Jβ)
+/összes	5/16	5/16	2/16	5*/16	3/16 (csak D β /J β +))

4. táblázat. Génátrendeződési eredmények. * egy esetben ugyan klonális volt a folyamat, de a band intenzitása összehasonlítva ugyanennek a betegnek az IgH génátrendeződési band-jével azt sugallja, hogy egy reaktív, kisebb T-sejtes klónból származott az amplifikátum. A TCR-béta génátrendeződés PCR-ok közül csak a Dbéta/Jbéta módszerrel észleltünk pozitivitást, a Vbéta/Jbéta-val nem. Az IgH génátrendeződés vizsgálat közül 2-2 betegnél észleltünk csak az egyik PCR-ral pozitivitást (egyikben az FR1c/JH, a másik FR2a/JH), kettő PCR-ral (mindkét esetben az FR1c/JH és FR2a/JH) és mindhárom PCR-ral pozitivitást. A TCR génátrendeződés közül az említett reaktív T-sejt klónon kívül (melyet TCR-gamma II-vel mutattunk ki) 2 beteg mintája volt pozitív mind a TCR-béta, mind TCR-gamma vizsgálatokkal (egyiknél csak a TCR- γ I volt pozitív a TCR-béta mellett, míg a másikon mindkét TCR-gamma pozitív volt). Öt esetben a pozitív TCR génátrendeződést háromszor megismételtük, mellyel konfirmáltuk az eredményeket.

Genotípus	Null-sejtes	T-sejtes	B-sejtes	Hibrid (T és B)
esetszám	7	3	4	2
Pozítív PCR vizsgálat	Nincs génátrendeződés pozitivitás (mindkét t(2;5) transzlokáció pozítív eset null- sejtes genotípusú)	2 x TCR- γ I	1 x FR1c/JH és FR2a/JH és FR3a/JH	1 x FR1c/JH és FR2a/JH és FR3a/JH és TCR- γ I és TCR- β (D β /J β)
		1 x TCR- β (D β /J β) és TCR- γ I és II	1 x FR1c/JH és FR2a/JH	1 x FR1c/JH és FR2a/JH és TCR- β (D β /J β)
			1 x FR1c/JH	
			1 x FR2a/JH	

5. táblázat. Genotípus eredmények.

Legtöbb esetben a genotípus vizsgálatok nem változtatták meg a diagnózist. A 8 null-sejtes ALCL-es beteg közül hatnál null-, 1-1 esetben B-, illetve T-genotípus igazolódott. A T-sejtes fenotípusú ALCL-es esetek közül a primer cutan forma és egy szekunder T-ALCL-es minta T-genotípusúnak, egy T-fenotípusú hibrid B/T genotípusúnak bizonyult. A három Hodgkin lymphomás eset közül kettő B-, egy pedig null-genotípusú, a két immunoblastomás eset közül egy B-, egy pedig hibrid B/T-genotípusú volt.

3.2.4. Multidrug rezisztencia gén vizsgálata

A PTE ÁOK Klinikai Kémiai Intézetben végeztük a molekuláris genetikai vizsgálatokat. Az MDR-1 gén 26. exonjában, a 3435-ös pozícióban bekövetkező pontmutáció kimutatására LC-RPCR-t (light cyler real time polimeráz láncreakció) alkalmaztunk. Ez egy egylépéses genotipizálás, ahol a PCR-t kombináljuk egy fluoreszcens próbával, mely a DNS olvadáspontját (melting point) analizálja. A betegekben kialakult „single nucleotid polymorphismust” (SNP) detektáltuk. 33 ALCL-es és 28 B-sejtes lymphomás (15 DLCL, 3 MCL, 3 B-ALL, 3 B-CLL, 2 myeloma multiplex, 2 Hodgkin lymphoma) betegnél megvizsgáltuk az MDR gént a perifériás vérből extrahált DNS-eken.

Módszer: A betegek alvadásgátolt perifériás véréből Maniatis módszer szerint nyertünk DNS-t. A DNS-ekből LightCycler MDR-1 mutáció detektáló teszttel (Hoffman La Roche) végeztük el a vizsgálatot gyakorlatilag majdnem teljesen automatizált metodikával egy kit segítségével.

3.2.4.1. Multidrug rezisztencia vizsgálatok eredményei

Betegség	MDR gén			
	HO C nagy rizikó	HZ	HO T kis rizikó	Összesen
ALCL	8	18	7	33 eset
	24	55	21	100%
B-sejtes lymphoma	8	13	7	28 eset
	29	46	25	100%
Európai populáció	17-28	48-54	20-23	% (600 egészséges)

6. táblázat MDR gén PCR eredmények

Mind az ALCL-es, mind a B-sejtes lymphomás betegeknél természetesen a homozygota C illetve homozygota T, valamint a heterozygota T,C-s esetek aránya az egészséges európai populációéhoz hasonló. Ennél sokkal fontosabb, hogy a genetikai predispozíció megjelenik-e a betegség lefolyásában. Vajon a multidrug rezisztencia szempontjából nagy rizikót jelentő homozygota C állapot tükröződik-e a klinikai állapotban. A nagyon kis esetszám miatt messzemenő következtetések nem vonhatóak le. A kemoterápiában nem részesülő primer bőr ALCL-es eseteket leszámítva és a B-sejtes lymphomások eredményeit is vizsgálva az alábbi megfigyeléseket tartjuk megemlítenedőnek:

1. Feltűnő, hogy míg a nagy rizikóval járó homozygota C esetekben az elsőként választott kezelés során nem sikerült komplett remissziót elérni, addig a heterozygota T,C illetve homozygota T esetben igen.
2. Primer progressziót is gyakrabban észleltünk a nagy rizikójú csoportban.
3. A reszpondereknél fellépő relapszus megítélése nehéz, mivel főként a homozygota C-s betegeknél a MDR már kezdetben kialakulhat primer progressziót előidézve. Ezekben az esetekben már nem beszélhetünk relapszusról, így ilyenkor hamisan kevés a relapszus ráta.
4. A nagy rizikójúak közül halt meg alapbetegség progresszióban a legtöbb beteg a vizsgált periódusban.

	1.th-ra CR	Primer Progresszió	Relapszus	Halál alapbetegségben
Homozygota C Nagy kockázat	0/14	6/14	2/6	5/14
Homozygota T Kis kockázat	15/31	5/31	6/17	5/31
Heterozygota Közepes kockázat	7/14	1/14	2/7	3/14

7. táblázat. MDR gén status és klinikai lefolyás összefüggése.

Két esetben módunk nyílt a genetikai vizsgálat mellett T-sejtes ALCL-es csontvelőből P-glycoprotein (P-gp) expressziót, valamint Calcein-MDR tesztet végezni flow citometriás módszerrel. A CD7 pozitív T-sejteken igen alacsony (6-13 %-os) P-gp expresszió volt detektálható, szemben a myeloid sejtek 69-73 %-os intenzitásával. A Calcein-teszt során intenzív (92-98 %-os) festődés volt észlelhető, mely gyenge funkcionális MDR tulajdonságot jelzett. Verapamil kezelésre a pozitív sejtek aránya csak 1-2 %-al emelkedett és a fluoreszcens intenzitás átlaga sem változott.

3.2.5. Thrombophilia genetikai vizsgálatok

A daganatos betegségek citosztatikus kezelése során megnő a thrombemboliás események gyakorisága a tumorból kiszabaduló prokoaguláns anyagok hatására. Megvizsgáltuk, hogy az ALCL-es beteganyagban a thrombophilia genetikai eredmények összefüggésben vannak-e a thrombemboliás események kialakulásával. Értékeljük a betegség során fellépő thrombemboliás eseményeket, azok súlyosságát. Összehasonlítottuk az ALCL-es betegek thrombophilia gén eredményeit egyéb lymphomás betegek eredményeivel.

Klinikánk molekuláris genetikai laboratóriumában évek óta működő thrombophilia genetikai vizsgálatok során 43 ALCL-es és 22 B-sejtes lymphomás betegnél (16 DLCL, 2 MCL, 2 Hodgkin lymphoma, 1-1 B-ALL, myeloma multiplex) megvizsgáltunk 4, a thrombophiliában szerepet játszó gént a perifériás vérből extrahált DNS-eken.

Míg az első két gén heterozygota illetve különösen homozygota mutációja során a vénás thrombemboliás betegségek kialakulásának kockázata növekedik, addig a PLA2, MHTFR gének mutációja az artériás thrombemboliás epizódok rizikóját fokozza. Az utóbbi csak emelkedett szérum homocystein szint esetén igaz.

3.2.5.1. Thrombophiliás vizsgálatok eredményei

Betegség	Factor V Leiden				Prothrombin G20210A			
	HO	HZ	NO	Össz	HO	HZ	NO	Össz
ALCL	0	5	38	43	0	1	39	40
	0	12	88	100%	0	2	98	100%
B-sejtes NHL	0	1	21	22	0	0	22	22
	0	5	95	100%	0	0	100	100%
NHL összes	Allélfrekvencia: 4,6% (n: 65)				Allélfrekvencia: 0,8 % (n: 62)			
Hazai populáció	Allélfrekvencia: 3,68 %				Allélfrekvencia: 1,21 %			
Betegség	MTHFR gén*				PLA2 gén			
	HO	HZ	NO	Össz	HO	HZ	NO	Össz
ALCL	6	19	17	42	2	15	24	41
	14	45	41	100%	5	37	58	100%
B-sejtes NHL	0	11	11	22	0	8	14	22
	0	50	50	100%	0	36	64	100%
NHL összes	Allélfrekvencia: 32,8 % (n: 64)				Allélfrekvencia: 21,4 % (n: 63)			
Hazai populáció	Allélfrekvencia: 33,7 %				Allélfrekvencia: 16,2 %			

8. táblázat Thrombophilia genetikai eredmények ALCL-ben és B-sejtes lymphómákban.

HO: homozygota, HZ: heterozygota, NO: nincs mutáció

A thrombophilia genetikai eredmények közül a Leiden mutáció az ALCL-es betegek közül 5, B-sejtes lymphómások közül 1 esetben mutatott heterozygota állapotot, homozygota status nem volt. A Prothrombin G20210A gén egyetlen esetben mutatott heterozygota mutációt. *Az MTHFR gén mutáció jelentősége mára már elveszítette jelentőségét, tekintve, hogy a homocystein lebontásának csak egyik útjában van szerepe, és a thrombembóliában valódi rizikó a plazma homocystein magas szintje nem pedig az MTHFR gén mutációja. A rendelkezésre álló adatokat azonban feldolgoztuk: homozygota státusz viszonylag gyakran (14 %) volt észlelhető az ALCL-ben további 45 % heterozygota volt, B-sejtes lymphómásoknál homozygota mutáció nem volt, viszont az esetek felében heterozygota állapotot regisztráltunk. A plazma homocystein szintről nincs adatunk. A PLA2 mutáció hasonló gyakorisággal fordult elő a két betegcsoportban (homozygota csak az ALCL-esek között volt). Thrombembóliás esemény öt alkalommal fordult elő: 2 artériás embolizáció (1-1 alsó végtagi illetve a. cerebri media területi), mélyvénás thrombosis 3 esetben észleltünk (2

alsó végtagi, 1 subclavia), mindhárom esetben a bulky betegség ér kompressziójával összefüggésben alakult ki a thrombosis.

3.2.6. Citogenetikai vizsgálatok

A vizsgálatokat a PTE ÁOK Pathológiai Intézetében végeztük. Metafázisos kromoszóma preparátumot készítettünk úgynevezett direkt módszerrel – legtöbb esetben – csontvelőből.

3.2.6.1. Citogenetikai eredmények

Összesen 10 esetben történt citogenetikai vizsgálat ALCL-es mintán. Négy betegnél nyirokcsomó biopsziából, 5 ízben csontvelő aspirátumból egy betegnél az ALCL-leukémiás vérből végeztük el a kromoszóma vizsgálatot. A vizsgálat 9 esetben sikerült, mely közül 5 betegnél normális XY karyotypust, 1 betegnél normális XX karyotypust találtunk, egy esetben nem volt értékelhető metafázis. Négy esetben korábban ALK negatívnak diagnosztizált betegségben végeztük a vizsgálatot, melyek közül 3-nál a vizsgált csontvelő immunhisztokémiai vizsgálatok alapján nem érintette a csontvelőt. Egy betegnél bár a csontvelő priméren érintett volt, kromoszóma eltérés nem igazolódott. Egy betegnél ALK pozitív ALCL miatt fél évvel az autológ perifériás vérőssejt transzplantációt követően a perifériás vér TCR-gamma génátrendeződés pozitívnak adódott, emiatt került sor csontvelő biopsziára, melynek során az aspirátumból történt citogenetikai vizsgálat nem mutatott abnormalitást. Négy betegnél nyirokcsomó mintából történt citogenetikai vizsgálat. Egy ízben normál karyotypus igazolódott, egy betegnél nem volt értékelhető a vizsgálat, két betegnél komplex karyotypus eltérést mutattunk ki. Az első betegnél időközben ALCL leukémia alakult ki, a perifériás vérből a nyirokcsomóéval megegyező volt a citogenetikai eltérés. Bár a 2. kromoszómát érintette a komplex citogenetikai eltérés, mégsem lehetett t(2;5) transzlokációt kimutatni (FISH vizsgálattal sem). A másik betegnél szintén komplex karyotypus eltérést észleltünk, ugyanakkor egyértelműen megállapítható volt a t(2;5) transzlokáció is, melyet FISH vizsgálattal és ALK1 festéssel is megerősítettünk.

A Fluorescein in situ hybridisatio segítségével lehetővé válik a konkrét kromoszóma transzlokáció igazolása. A 2-es kromoszóma rövid karján az ALK gént tartalmazó nagyobb génszakaszt zöld fluoreszcein próbával jelölték meg. Az 5-ös kromoszóma hosszú karján helyet foglaló – és a nucleophosmin gént is involváló – génszakaszt piros színű fluoreszcein próbával jelölték meg. Amennyiben a t(2;5)(p23;q35) transzlokáció létrejön, akkor egymásra vetül a két szín.

3.2.7. Áramlási citometriai vizsgálatok

A PTE ÁOK Klinikai Kémiai Intézetben, illetve a PTE ÁOK Pathológiai Intézetben végeztük a vizsgálatokat. 17 beteg perifériás vér és 9 csontvelő aspirátumból lymphocytá Ficoll szeparálással nyert szuszpenzióján immunfenotipizálást végeztünk FCM segítségével. Sejt-felszíni és intracelluláris antigének kimutatását fluoreszcens immunológiai jelöléssel végeztük. A legfontosabb felhasznált sejt-felszíni antigének: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD45, CD56.

3.2.7.1.. Áramlási citometriai eredmények

Az áramlási citometriai módszerrel megvizsgált 9 ALCL-es beteg csontvelő aspirátumánál minden esetben T-, illetve B-sejtes markereket alkalmaztunk. Három esetben sikerült egyértelmű T-sejtes lymphomás infiltrációt igazolni, mely összhangban állt a hisztológiai lelettel is. Tizenhét ALCL-es betegnél végeztük el a perifériás vér Ficoll-szeparálását. A későbbiekben ezen mintákon az angol kutató partnerünknel sejt mediálta immunválasz vizsgálatokra kerül majd sor. A mintákon a PTE ÁOK Klinikai Kémiai Intézetében ugyanakkor részletes immunfenotípus vizsgálatra került sor, melynek során egyetlen esetben észleltünk leukémiás érintettséget

3.2.8. Keringő NPM-ALK- és ALK ellenes antitest kimutatása

Huszonhét ALCL-es, 8 DLCL-es és 2 Hodgkin lymphomás beteg szérumát fagyasztottuk le kezelésük különböző fázisában. A minták zömét (22-t) a kezelés befejezése után nyertük. Nyolc esetben a kezelés közben, 7 betegnél a kezelés megkezdése előtt történt a minták lefagyasztása. A mintákat szárazjégen Oxfordba szállítottuk, a John Radcliffe Hospital Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences-ben Karen Pulforddal kollaborációban történtek meg az immunprecipitációs vizsgálatok. Diethylaminoethyl-Dextran módszerrel 3 különböző plazmiddal történt a COS 1 majom epithel sejtvonal transzfektálása. Ezek a plazmidok az alábbiak voltak: pcDNA3-ALK, mely a teljes hosszúságú ALK-t kódolja, pcDNA3-NPM ALK, mely az NPM-ALK fehérjét kódolja és a pcDNA3 expressziós vektor önállóan. Hetvenkét órás kultúra után citocentrifuga preparátumok készültek, melyek a betegek szérumával inkubálódtak 30 percig. Foszfát pufferben történő mosás után torma peroxidázhoz konjugált nyúl antihuman immunglobulinnal (DAKO) inkubálódtak a minták. Pozitív kontrollként a „transfectantok” monoklonális anti-ALK-al történő festését alkalmaztuk, melyet torma peroxidázhoz konjugált kecske anti-nyúl immunglobulin reakció követett.

3.2.8.1. NPM-ALK és ALK ellenes antitest immunprecipitációs eredményei

Az immunprecipitációs módszerrel a 27 ALCL-es, 8 DLCL-es és 2 Hodgkin lymphomás betegnél elvégzett vizsgálat közül NPM-ALK ellenes keringő antitestet 1, míg ALK ellenes keringő antitestet 3 esetben igazoltunk.

A 27 ALCL-es eset közül 26-nál megtörtént korábban a tumoros nyirokcsomó blokkon az anti-p80, vagy ALK1 immunhisztokémiai vizsgálat. Tíz esetben találtunk pozitívítást (9 betegnél ALK1, 1 ízben p80 volt pozitív). Ezen esetek közül egynél volt pozitív mind az NPM-ALK, mind az ALK immunprecipitációs vizsgálat, 3 esetben csak az ALK immunprecipitáció adódott pozitívnak. Hét betegnél az ALK1 illetve p80 pozitív tumor ellenére a keringő anti NPM-ALK vagy anti ALK antitestet nem sikerült kimutatni. Mind a 7 betegnél a szérum mintavételre évekkal a kemoterápiát követően került sor, az egyik páciens M. Crohn kísérőbetegsége miatt hosszasan steroid kezelésben részesült, mely része lehet a keringő antitest eliminálódásának.

4. Magyar anapláziás nagysejtes lymphoma regiszter

A magyar anapláziás nagysejtes lymphoma regisztert 1998-ban kezdtük megszervezni. Egy ilyen országos adatgyűjtés ötletéhez több dolog is hozzájárult: 1. Halmozottan fordultak elő ALCL-es betegek osztályunkon 1996-ban, 1997-ben. Az első ALCL-es betegcsoport ismertetése során 12 páciens adatait foglaltuk össze 1998. áprilisban a székesfehérvári Malignus Lymphoma Konferencián. Az irodalomban közölt tanulmányok is viszonylag kis (30-50) fős betegcsoportok adatait mutatták be. 2. Az ALCL viszonylag új, önálló entitás, rendkívül sok új felfedezés történt az akkori időkben (1994: NPM-ALK gén klónozása, szintén ebben az évben anti-p80 poliklonális antitest megalkotása, 1997: monoklonális antitest kifejlesztés, valamint a két új lymphoma klasszifikáció is ezekre az évekre esik). 3. A többi lymphomás beteg kórtörténetétől eltérő eseteket észleltünk (fiatalok, gyakori extranodális manifesztációk) 4. Kezdeményezés indult más lymphoproliferatív betegségek országos listájának összeállítására (krónikus lymphoid leukémia, hajjas sejtes leukémia, angioimmunoblastos lymphadenopathia). Egy követési lapot szerkesztettünk, mely számos demográfiai, klinikai és patológiai adat kitöltését igényelte. Az ország hematológiai centrumaiba kiküldtük ezen kérdőíveket. Az első évben 4-5, majd az ismételt, módosított követési lapok szétküldése után évről évre egyre több centrum válaszolt. Jelenleg 19 centrumból 180 beteg adataival rendelkezünk.

Centrum	Betegszám
Markusovszky Kórház Hematológiai Osztály Szombathely	23 + 1*
Debreceni Egyetem OEC III. Belklinika	22
Semmelweis Kórház Hematológiai Osztály Miskolc	18
Debreceni Egyetem OEC II. Belklinika	11
Petz Aladár Kórház Hematológiai Osztály Győr	11
Országos Gyógyintézeti Központ Csontvelőtranszplantációs Osztály Budapest	10
Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Belklinika	8
Pécsi Tudományegyetem ÁOK Gyermekklinika	8
Szegedi Tudományegyetem ÁOK II. Belklinika	8
Szent László Kórház Csontvelőtranszplantációs Osztály Budapest	7
Kaposi Mór Kórház Hematológiai Osztály Kaposvár	6
Zala Megyei Kórház Hematológiai Osztály Zalaegerszeg	4
Pécsi Tudományegyetem ÁOK II. Belklinika	4
Szent Borbála Kórház Hematológiai Osztály Tatabánya	2
Jósa András Kórház Hematológiai Osztály Nyíregyháza	2
Semmelweis Orvostudományi Egyetem III. Belklinika	2
Pándy Kálmán Kórház Hematológiai Osztály Gyula	1
Veszprém Megyei Kórház Hematológiai Osztály Veszprém	1
Pécsi Tudományegyetem ÁOK I. Belklinika	31

9. táblázat. A Magyar anapláziás nagysejtes lymphoma regiszterbe adatokat szolgáltató centrumok. * A szombathelyi kórház gyermekosztályáról 1 beteg adataival rendelkezünk.

Immunfenotípus	Szám	%	Immunfenotípus	szám	%
Null-sejtes	74/176	42,0	Null-sejtes	74/120	61,7
T-sejtes	46/176	26,1			
B-sejtes	30/176	17,0	T-sejtes	46/120	38,3
Nem osztályozott	26/176	14,8			

10. táblázat. Immunfenotípus adatok. A jobb oldali eredmények a REAL és WHO klasszifikáció szerinti besorolás alapján számított eredmények. Eszerint ugyanis az anapláziás nagysejtes lymphoma csak null-, vagy T-fenotípusú lehet.

	Betegszám	%, illetve intervallum
Összes betegszám	180	
Nő	83	46,1
Férfi	97	53,9
Életkor (év)	41,5	3-88
Klinikai stádium I	24/166	14,4
II	49/166	29,5
III	37/166	22,3
IV	56/166	33,7
B-tünet	107/168	63,7
Extranodális	80/166	48,2
Nemzetközi prognosztikai index (IPI)	0 23/139	16,5
	1 45/139	32,4
	2 28/139	20,1
	3 22/139	15,8
	4 20/139	14,4
	5 1/139	0,7
Nyacs méret (cm)		4,6 (1-15)

11. táblázat. Magyar ALCL regiszter legfontosabb demográfiai és klinikai adatai.

Döntő többségben a toulouse-i ösztöndíj alatt, illetve a Magyarországon főként Pécsen végzett ALK1 festési eredmények alapján a megvizsgált 90 eset közül 24 volt pozitív (26,7 %), 66 negatív (73,3 %).

Az anapláziás nagysejtes lymphoma klinikai megjelenésében feltűnő a gyakori extranodális manifesztáció. A hazai beteganyagban az irodalmi adatokkal egyezően leggyakrabban érintett szervek a bőr, csontvelő, csont és a tüdő voltak.

A magyar ALCL regiszter adatai szerint a betegek döntő többsége (94 %) kombinált kemoterápiában részesült. Az esetek több, mint felében a „gold standardként” CHOP-alapú

kezelést alkalmaztak. Az ALCL differenciál diagnosztikus nehézségeire utal, hogy a primer diagnózis Hodgkin lymphoma volt 10 betegnél, ennek megfelelő kezelést is adtak a betegeknek.

Kezelés	eset	%	CR %	PR %	CR+PR %	Progr + NR %
CHOP alapú	81	51,9	61,7	16,0	77,7	23,6
ProMACE-CytaBOM	46	29,5	58,7	23,9	82,6	17,4
Hodgkin protokoll	10	6,4				
Anthracyclin mentes	7	4,5				
Gyermekkori protokoll	4	2,6				
Egyéb	8	5,1				
Összesen	156	100	57,7	19,6	77,3	22,7

12. táblázat. Hazai ALCL-es betegek kezelésének típusai, terápiás válaszok.

A betegek 17,6 %-nál észleltünk relapszust. Második vonalban a relapszusba jutott betegeknél, illetve az elsődleges kezelés hatástalansága után 82 betegnél alkalmaztunk kombinált kemoterápiát, vagy radioterápiát. Leggyakrabban platina tartalmú protokollokat, DHAP vagy ESHAP un. „salvage” kezelést választottunk (39 %), mely esetleges őssejt transzplantáció előtt a leghatásosabbnak tartott terápia. A második választott kezelés hatására a betegek 38,4 %-a került komplett remisszióba, 27,4 %-a parciális remisszióba, 32,3 %-nál progresszió volt megfigyelhető.

5. Autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben hazánkban

Hazánkban 5 hemopoetikus őssejt transzplantáló centrum van. Klinikánkon az első átültetést 1999. decemberben végeztük. Az első évben 14, a másodikban 18, majd 24 transzplantációt, 2003-ban 31 transzplantációt végezhattünk. Magyarországon 30 anapláziás nagysejtes lymphomás beteg részesült hemopoetikus őssejt transzplantációban. Egyetlen betegnél az OHII-ben alkalmaztak testvér donoros allogén transzplantációt. A 29 autológ transzplantált beteg átültetésének helyszíne az alábbiak szerint oszlott meg: László Kórházban: 14, OHII-ban: 7, klinikánkon: 8 beteg. A László Kórházban töltött transzplantációs kiképzésem során 2 beteg átültetésében vettem részt, 1 pécsi beteg a pécsi transzplantációs centrum megnyitása előtt a László Kórházban részesült átültetésben. A rendelkezésre álló adatok alapján 23 transzplantált beteg legfőbb klinikai adatait mutatja a 13. táblázat.

	kor dg (év)	kor tx (év)	Stádium III-IV/ összes	B-tünet /összes	IPI ≥3/ össz	Extra- nodális/ összes	Nycs (cm)	T,0 fenot/ összes	Férfi/ Nő
Átlag	27,9	29,5	15/22	17/21	5/17	12/21	5,9	21/23	13/10
% (-)	14-53	20-57	68 %	81 %	29%	57 %	2-12	91 %	57 %

13. táblázat. Autológ hemopoetikus őssejtátültetési eredmények hazai ALCL-es betegeknél. IPI: nemzetközi prognosztikai index, nycs: legnagyobb nyirokcsomó mérete, T,0 fenot: T vagy null fenotípusú.

	1. Th Pro-Cyt CHOP	2. Th DHAP	1. Th-s válasz CR,PR	2.Th-s válasz CR,PR	Kondic BEAM BUCY	Őssejt- forrás Perif	Perif. CD34 x 10⁶/kg
Szám	9	16	10	13	15	17	5,12
	10		12	8	4	(*2)	
%	39 %	70 %	43 %	57 %	79 %	85 %	1,01-
(-)	43 %		52 %	35 %	21 %		13,8

14. táblázat. Autológ hemopoetikus őssejtátültetési eredmények hazai ALCL-es betegeknél. 1.Th: első választott kezelés, Pro-Cyt: ProMACE-CytaBOM, CHOP: Cyclophosphamid, Hydroxyepirubicin, Vincristin, Methylprednisolon, DHAP: Dexamethason, High dose Cytosin arabinosid, Cisplatin, CR: komplett remisszió, PR:parciális remisszió, BEAM: BCNU, Etoposid, Cytosin arabinosid, Melphalan, BUCY: Busulphan, Cyclophosphamid, *: 2 betegnél perifériás őssejt illetve csontvelő egyaránt átültetésre került.

A transzplantációval összefüggő halálozást (TRM), mint a transzplantáció egyik fontos fokmérőjét szintén vizsgáltuk. A halálokok a következők voltak: 1 betegnél a 8. napon Candida tropicalis infekció, diffúz alveoláris vérzés, 1 esetben a 7. napon sepsis, 1 betegnél máj eredetű veno occlusive betegség (VOD). További 2 betegnél CR-ban gastrointestinalis vérzés és pancreatitis, illetve aspergillosis és kardiális okok vezettek a halálhoz, 1 ízben fatális progresszió következett be.

6. Összefoglalás-következtetések

Az anapláziás nagysejtes lymphoma egy relatíve rövid múltra visszatekintő ritka lymphoma entitás, melyben az elmúlt 10 évben a lymphomák közül talán a legtöbb molekuláris genetikai, immunhisztokémiai, immunológiai vizsgálat történt. Magyarországon a betegséggel korábban sem klinikopatológiai, sem molekuláris genetikai szinten nem történtek

komolyabb vizsgálatok. Jelen dolgozatban megkíséreltünk a betegség számos részletével mélyrehatóan foglalkozni. Kiterjedt immunhisztokémiai, génátrendeződési, kromoszóma transzlokációs, citogenetikai, áramlási citometriai és immunprecipitációs vizsgálatokat végeztünk. A betegség lényegét ugyan nem érintő mégis érdekes információkat nyújtó molekuláris vizsgálatokat végeztünk a multidrug rezisztencia, illetve thrombophilia irányában. A malignus hematológiai betegségek közül az elsők között hoztunk létre egy magyar ALCL regisztert, melyhez az ország 19 hematológiai centrumának együttműködését nyertük meg. Nemzetközi szinten is tetemes beteganyag (180 fő) klinikai adataival rendelkezünk. A modern terápiás lehetőségek közül az autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben történő alkalmazásáról szereztünk komoly tapasztalatokat.

Az anapláziás nagysejtes lymphoma vizsgálata során az elmúlt 5 évben kísérletes és klinikai tapasztalatokat szereztünk, és az alábbi megállapításokra jutottunk:

1. A WHO ajánlásokat figyelembe véve standard **morfológiai és immunhisztokémiai** vizsgálatokra törekedtünk. (**T-sejt markerek, EMA, p80, majd ALK1 reakciók**).
2. Az ALK festődés intracitoplazmatikus lokalizáció jelentőségét hangsúlyozva megfigyeltünk **csak citoplazmatikus** illetve **diffúz mag, magvacska és citoplazmatikus ALK pozitív** lymphomás sejteket, melyek a patogenezisre nézve is irányadók.
3. **T-sejt receptor béta és gamma, illetve immunglobulin nehéz lánc génátrendeződési vizsgálatot** végeztünk el (Toulouse-ban 16, Pécsen 15 esetben) abból a célból, hogy a differenciál diagnosztikai szempontból rendkívül problematikus Hodgkin lymphomás eseteket és a diffúz nagy B-sejtes lymphomák variánsának tartott B-ALCL-t pontosan elkülönítsük.
4. **Magyar mintákon** (15 nyirokcsomó és 1 csontvelő) **először végeztünk molekuláris genetikai vizsgálatot t(2;5)(p23;q35) és t(1;2)(q25;p23) transzlokáció** irányában **DNS alapú és reverz transzkriptáz PCR** módszerekkel. Két esetben észleltünk transzlokációt az első eltérést illetően, míg a második vizsgálattal nem találtunk pozitív esetet.
5. **Multidrug rezisztencia génpolimorfizmus** vizsgálatot végeztünk 33 ALCL-es és 28 egyéb lymphomás beteg perifériás véréből. Az adott betegszám mellett olyan irányú tendenciát figyeltünk meg, hogy az MDR kialakulására nagy kockázatú betegeknél (C/C) az első kezeléssel nem sikerült komplett remissziót elérni. Szintén a nagy rizikójú betegeknél figyeltünk meg nagyobb számban a betegség progressziójával kapcsolatos halálozást.
6. **Thrombophilia genetikai** vizsgálatokat alkalmaztunk 42 ALCL-es és 21 egyéb lymphomás betegnél. A hazai populációéval közel megegyező allélfrekvenciát észleltünk mind a **Factor V Leiden, a PTR gén, MTHFR gén és a PLA2 gén mutációját** illetően. A

betegség lefolyása során észlelt thrombemboliás események nem voltak kapcsolatban a mutációkkal.

7. Tíz ALCL-es mintán végeztünk el **citogenetikai vizsgálatot**. Két beteg 3 mintáján (egy beteg nyirokcsomó és perifériás vérből is) komplex citogenetikai eltérést észleltünk, egy betegnél FISH vizsgálattal igazoltuk a t(2;5) transzlokációt. A komplex citogenetikai eltérés rossz prognózist jelent.

8. Huszonhat ALCL-es betegnél (9 csontvelő és 17 perifériás vér mintán) részletes **T- és B-lymphocita sejtfelszíni markert vizsgáltunk meg áramlási citometriával**. Az ALCL leukémiás betegnél, illetve 3 csontvelőt érintő folyamatnál sikerült egyértelmű pozitivitást kimutatni.

9. Az oxfordi kutatópartnerünk segítségével 27 ALCL-es és 10 B-NHL-s betegnél végeztünk el **keringő anti-ALK és anti-NPM-ALK antitest kimutatására immunprecipitációs vizsgálatot**. ALK festés a 26 megvizsgált beteg közül 9-nél volt pozitív. Ezek közül mindössze 3 rendelkezett keringő anti-NPM-ALK vagy anti-ALK antitesttel, igaz minden esetben évekkel az agresszív kemoterápia vagy a hemopoetikus őssejt transzplantációt követően végeztük el a vizsgálatot.

10. **Létrehoztunk egy „Magyar Anapláziás Nagysejtes Lymphoma Regiszter”-t** melyben 180 ALCL-es beteg adatai találhatóak meg. Az elmúlt évek során többször változtatott és kiküldött követési lap visszajuttatásával részletes demográfiai (kor, nem, földrajzi eloszlás), klinikai (Ann Arbori stádium, nemzetközi prognosztikai index, B-tünet és egyéb kísérő tünetek, nodális és extranodális lokalizáció, nyirokcsomó méret), patológiai (immunfenotípus, ALK pozitivitás, közel egyharmaduknál részletes morfológiai) és terápiás (első és másodikként választott kezelések, ezekre adott terápiás válaszok, túlélési mutatók) eredmények birtokába jutottunk.

11. A terápiás válasz és túlélés lehető legoptimálisabb feltételeinek előteremtése volt a célunk. A nemzetközi prognosztikai index figyelembe vételével az utóbbi években a rizikó adaptált kezelés hazánkban is kezd elterjedni. Ennek egyik jele az ALCL-es betegek közül kiválasztani azokat, akiknek a legnagyobb hasznukra válik az **autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció**. Bár klinikánkon mindössze 4 éve folyik őssejt átültetés, mégis a transzplantáló centrumok közül klinikánkon az ALCL-es transzplantációk közel 30 %-ra került sor. A részletesen feldolgozott 23 magyar ALCL-es átültetés eredményeiből és az irodalmi adatokból is kitűnik az, hogy az ALK negatív esetekben nem tud átütő sikert hozni a hemopoetikus őssejtátültetés, ha konvencionális CHOP kezeléssel kezdjük a terápiát. Sokkal hatásosabb az azonnali agresszív kemoterápia. Ugyanezt a tényt erősíti meg az a 4 szomorú

eset, amikor a cryopreservált perifériás vérőssejtek visszaadására nem tudott sor kerülni az ALK negatív ALCL-es betegeknél az időközben fellépő fatális progresszió miatt.

12. Az ALCL kiterjedt immunhisztokémiai, molekuláris genetikai, citogenetikai és klinikai vizsgálata során **több extrém ritka megjelenést észleltünk:**

- a. Tripla M grádienssel járó primer csontvelői T/B hybrid-sejtes ALCL
- b. Komplet remisszióban észlelt meningeális ALK pozitív ALCL manifesztáció
- c. Komplex citogenetikai eltéréssel járó ALK negatív ALCL leukémia
- d. Extrém eosinophiliával járó ALK negatív ALCL
- e. Szekunder ALCL autológ csontvelő transzplantációját követő perifériás T-sejtes lymphoma relapszus
- f. Extrém nagy kiterjedésű primer bőr ALCL

A jövőben a magyar hematológiai, patológiai és csontvelő transzplantáló centrumokkal változatlanul szoros, jó együttműködést kívánunk folytatni. Bőrgyógyászokkal és gyermekgyógyászokkal is felvettük a kapcsolatot a primer bőr ALCL és a gyermekkori eseteknek a Regiszterbe történő bevonása érdekében. A toulouse-i munkacsoporttal további molekuláris genetikai kooprodukcióra törekszünk (PCR, RT-PCR, Southern blot, DNS microarray módszerek, esetleg DNS szekvenálás). Az oxfordi kutató csapattal az immunprecipitációs vizsgálatok mellett a citotoxikus T-sejt választ tervezzük analizálni ELISPOT illetve tetramer módszerekkel az ALCL-es betegeken a kezelés különböző időpontjaiban. Ehhez a betegek első csoportjától a megfelelő mintákat már kijuttattuk Angliába.

Publikációk jegyzéke:

Könyvfejezet:

Szomor Á, Matolcsy A. Anapláziás nagysejtes lymphoma A csontvelő és a vér betegségeinek atlasza. Medicina 2004. Szerkesztés alatt.

Lektorált folyóiratok:

1. Csanaky Gy, Vass JA, Milosevity J, Ocsovszki I, **Szomor A**, Schmelcz M. Expression and function of L-selectin molecules (LECAM-1) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1994; 79: 132-136. IF:0,194
2. Csanaky Gy, Vass JA, Ocsovszki I, Milosevity J, **Szomor A**, Schmelcz M.: Changes in adhesion molecule expression and function in B-cell chronic lymphocytic leukemia after in vitro interferon stimulation. *Eur J Haematol* 1996; 54: 27-33. IF:1,852
3. **Szomor Á**, Passweg JR, Tichelli A, Speck B, Gratwohl A. Myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome relapsing as granulocytic sarcoma /chloroma/ after allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 1997; 75: 239-241. IF:1,475
4. Nagy M, Fehér K, László T, **Szomor Á**, Losonczy H, Kelényi G, Matolcsy A. A T-sejt receptor gamma-génátrendeződés vizsgálata lymphoproliferatív kórképekben polimeráz láncreakció segítségével. *Orv Hetil* 1999;140:2441-2444.
5. Molnár L, Jáksó P, Hussain, A, **Szomor Á**, Nagy Á, Losonczy H, Pajor L: Flow citometriás immunfenotípus-vizsgálatok myelodysplasiás szindrómában. *Magyar Belorvosi Archívum* 1999; 52: 61-66.
6. Losonczy H, Alizadeh H, Molnár L, Nagy Á, Dávid M, **Szomor Á**, Kecskés M, Vidra T, Jeges S: Kezelési eredmények akut myeloid leukaemiában. *Magyar Belorvosi Archívum* 1999; 52: 53-60.
7. Nagy Á, Melegh B, Dávid M, Alizadeh H, Kecskés M, Vidra T, Molnár L, **Szomor Á**, Losonczy H: Genetikai vizsgálatok szerepe véralvadási betegségek diagnosztikájában. *Magyar Belorvosi Archívum* 1999; 52: 67-72.
8. Gasztonyi B., Pár A., **Szomor Á.**, Battyány I., Nagy Á., Kereskai L., Losonczy H., Mózsik Gy.: Hepatitis C virus (HCV) infection associated with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in Hungarian patients. *Brit. J. Haematol.* 2000; 110: 497-498. IF: 3,068
9. Pajor L, Vass JA, Kereskai L, Kajtár P, **Szomor Á**, Egyed M, Iványi J, Jáksó P. The existence of lymphoid lineage restricted Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with heterogeneous bcr-abl rearrangement. *Leukemia*, 2000; 14: 1122-1126. IF:3,736

10. Gasztonyi B, Pár A, **Szomor Á**, Nagy Á, Kereskai L, Losonczy H, Pajor L, Horányi M, Mózsik Gy: A hepatitis C vírus (HCV) infectio és B-sejtes non-Hodgkin lymphoma. Orv. Hetil. 2000; 141: 2649-2651.
11. **Szomor Á**, Molnár L, Nagy Á, Dávid M, Alizadeh H, Kecskés M, Vidra T, Kereskai L, Pajor L, Losonczy H: Chronicus myeloid leukemia kezelése alfa-interferonnal. Orv Hetil 2000; 141: 2601-2604.
12. Gasztonyi B, Pár A, **Szomor Á**, Battyány I, Nagy Á, Kereskai L, Losonczy H, Schaff Zs, Boriszlova P, Pakodi F, Pajor L, Mózsik Gy: B-sejtes non-Hodgkin lymphoma és hepatocellularis carcinoma együttes előfordulása. Esetismertetés. Magyar Belorvosi Archivum 2000; 53: 343-346.
13. Kecskés M, Nagy Á, Vidra T, Kispál Gy, Bedekovics T, Dávid M, **Szomor Á**, Molnár L, Radványi G, Vezendi K, Kerner G, Losonczy H. Konduktorszűrés indirekt géndiagnosztika alkalmazása B haemophiliában. Orv. Hetil. 2001; 147: 341-344.
14. **Szomor Á**, Baranyai F, Tornóczky T, Losonczy H: Penile chloroma in a patient with secondary acute myeloid leukemia Eur J Haematol. 2002; 68: 322. IF:1,807
15. Kovács A, **Szomor Á**, Ábrahám I, Nagy F, Losonczy H. Az interferon-alfa-terápia pszichiátriai következményei. Orv. Hetil. 2002; 143: 2183-2187.
16. **Szomor Á**, Zenou P, Roda D, Al Saati T, Csanaky G, Pajor L, Kelényi G, Delsol G, Losonczy H. Genotypic analysis in primary systemic anaplastic large cell lymphoma. Pathol Oncol Res 2003; 9: 104-106.
17. Gasztonyi B, Pár A, Kiss K, Kereskai L, **Szomor Á**, Szeberényi J, Pajor L, Mózsik Gy. Nukleáris faktor kappa B aktiváció - kulcsszerep az onkogenezisben? Krónikus hepatitis C vírus infekció és lymphomagenesis. Orv. Hetil 2003; 144: 863-868.
18. **Szomor Á**, Roda D, Zenou P, Al-Saati T, Csanaky Gy, Pajor L, Kelényi G, Losonczy H. Molekuláris genetikai vizsgálatok anapláziás nagysejtes lymphomában. Orv. Hetil. 2003; 144: 1815-1817.
19. Vidra T, **Szomor Á**, Battyány I, Mühl D, Losonczy H. Congenitális vena cava inferior malformatio és thrombosisra hajlamosító genetikai tényezők kombinált megjelenése fiatal férfi mélyvénás thrombosisában. Orv. Hetil. 2003; 144: 33-36.

Összesített impakt faktor: **12,132**

Idézhető absztraktok:

1. Nagy Á, **Szomor Á**, Losonzy H. Experiences regarding the treatment of T-cell lymphomas Ann Hematol 1992; 65: Suppl. A22.

2. Losonczy H, **Szomor Á**, Nagy Á, Dávid M, Kónya T. Different effects of GM-CSF in NHL patients with and without bone marrow manifestation. *Magy Belorv Arch.* 1994; Suppl.2. 46:103
3. **Szomor Á**, Molnár L, Kelényi G, Alizadeh H, Losonczy H: Anaplasias nagysejtes lymphoma (ALCL) kezelésével szerzett tapasztalataink *Magy. Belorv. Arch* 1998. 3. Suppl. 312.
4. **Szomor Á**, Radványi G, Nagy Zs, Molnár L, Kelényi G, Nagy M, Demeter J, Losonczy H. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL): clinical presentation and outcome of 40 patients. *Ann Oncol* 1999;10:106.
5. Gasztonyi B, Pár A, **Szomor Á**, Nagy Á, Kereskai L, Horányi M, Pakodi F, Losonczy H, Pajor L., Mózsik Gy.: Hepatitis C virus (HCV) infection associated with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Z. Gastroenterol.* 2000; 38: 405.
6. **Szomor Á**, Molnár L, Iványi J, Radványi G, Nagy Zs, Karádi Á, Gergely L, Bányai A, Demeter J, Aryan H, Gasztonyi Z, Kiss A, Kollár B, Egyed M, Losonczy H, Kelényi G, Kereskai L, Pajor L. Extranodalis érintettséggel járó és nodalis anaplasias nagysejtes lymphoma (ALCL) klinikopathológiai összehasonlítása. *Magy. Belorv. Arch.* 2000, 3. Suppl. Vol 53:149.
7. Gasztonyi B., Kiss K., Kereskai L., Pár A., **Szomor Á**, Szeberényi J., Pajor L., Losonczy H., Mózsik Gy.: NFkB a suggested key cellular factor between the hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Z. Gastroenterol.* 2001; 39: 390.
8. **Szomor Á**, Molnár L, Iványi J, Radványi G, Nagy Zs, Karádi Á, Gergely L, Bányai A, Demeter J, Aryan H, Gasztonyi Z, Kiss A, Kollár B, Egyed M, Losonczy H, Kelényi G, Pajor L. Extranodal involvement in primary systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in adults. *Ann Hematol* 2001;80:B144-145.
9. **Szomor Á**, Dávid M, Pajor L, Kereskai L, Losonczy H. Relapse as peripheral T-cell lymphoma after autologous hemopoetic stem cell transplantation of secondary anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2001;98:372b.
10. Dávid M, **Szomor Á**, Alizadeh H, Egyed M, Varga Gy, Szalontay Cs, Jáksó P, Losonczy H. Autológ őssejt-transzplantációa Pécsi Tudományegyetem I. Belgyógyászati Klinikáján. *Magyar Belorv. Arch.*2001; 54 Suppl.2.:63.
11. Gasztonyi B, Pár A, Kiss K, Kereskai L, **Szomor Á**, Szeberényi J, Pajor L, Schaff Zs, Losonczy H, Mózsik Gy. Hepatitis C vírus és lymphomagenesis. *Magyar Belorv. Arch.* 2001; Supl.2. 54: 82.

12. **Szomor Á.** Anapláziás nagysejtes lymphoma (molekuláris genetika, immunhisztokémia, klinikum). Magyar Onkológia 2002, Vol 46:103.
13. Dávid M, **Szomor Á,** Vidra T, Szalontay Cs, Jáksó P, Losonczy H. Két év autológ őssejttranszplantációs tapasztalatai a PTE ÁOK I. sz. Belklinikáján. Magyar Onkológia 2002, Vol 46:90.
14. **Szomor Á,** Tamás K, Iványi J, Hamed A, Kollár B, Tiboly M, Tóth P, Schmelcz M, Altay E, Dombi P, Molnár L, Losonczy H. A dunántúli anapláziás nagysejtes lymphomás (ALCL) betegek klinikai jellegzetességei. Magyar Belorv. Arch.2002; Supl.1. 55:32.
15. **Szomor Á,** Al Saati T, Delsol G, Csanaky Gy, Pajor L, Losonczy H. Molekuláris genetikai vizsgálatok CD30-pozitív lymphomában. Magyar Belorv. Arch. 2002; Supl. 3. 55: 127.
16. **Szomor Á,** Magyarlaci T, Losonczy H. Multidrug rezisztencia (MDR) gén polimorfizmus vizsgálata anapláziás nagysejtes lymphomában. Magyar Belorv. Arch. 2003; Suppl.1. 56; 37
17. **Szomor Á,** Dávid M, Vidra T, Tábori J, Szalontay Cs, Krucsó H, Losonczy H. Autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció nagy malignitású lymphomában (3 év eredményei) Magyar Belorv. Arch. 2003; Suppl.2. 56; 108.

A témával kapcsolatos további fontosabb előadások, poszterek:

1. **Szomor Á,** Losonczy H, Matolcsy A. Haemopoetikus növekedési faktorok alkalmazása neutropeniás betegekenél. Magyar Hematológiai és Vértranszfúziós Társaság XIV. Hematológiai Napok 1992, Debrecen.
2. Losonczy H, **Szomor Á,** Nagy Á, Dávid M, Czopf L. Correlation between the efficacy of CSFs (GM-CSF, G-CSF) and the bone marrow infiltration in Non Hodgkin Lymphomas. XII. Meeting of International Society of Haematology (European and African Division) 1993, Bécs, Ausztria.
3. **Szomor Á.** GM-CSF kezeléssel szerzett tapasztalataink. Onkohematológiai betegek szupportív kezelése. 1994. Pécs.
4. **Szomor Á,** Losonczy H, Hussain A. Haemopoetikus növekedési faktorok alkalmazása NHL-ban. Fiatal Onkológusok Fóruma 1994. Szeged.
5. Nagy Á, Kecskés M, **Szomor Á,** Dávid M, Matolcsy A, Losonczy H. CHOP-vel szerzett tapasztalataink nagy malignitású lymphomában. Malignus Lymphoma Konferencia. 1996. Pécs.
6. Losonczy H, Nagy Á, Dávid M, Hussain A, Molnár L, **Szomor Á.** Therapeutic problems of patients with high grade non-Hodgkin lymphoma. Trilateral Haematological Symposium /Pécs-Tübingen-Nürnberg/ 1997. Pécs.

7. **Szomor Á**, Molnár L, Kelényi G, Losonczy H. Null-sejtes fenotípusú anapláziás nagysejtes lymphomás betegek. Gyulai Hematológiai Napok. 1998. Gyula
8. **Szomor Á**, Kelényi G, Molnár L, Losonczy H. CD30 (Ki-1) positive ALCL: Clinicopathological Feature of 12 Cases from a single center. Annual Scientific Meeting of the Haematology Society of Australia and the Australian Society of Blood Transfusion. 1998. Sydney, Ausztrália.
9. **Szomor Á**, Iványi J, Radványi G, Gergely L, Karádi Á, Gasztonyi Z, Kiss A, Kollár B, demeter J, Jakó J, Farkas P, Schmelczér M, Olasz M, Losonczy H. Anaplasiás nagysejtes lymphoma (ALCL): Magyar Regiszter Magyar Lymphoma Konferencia 2000. Lillafüred
10. **Szomor Á** and 13 Hungarian centers: Anaplastic large cell lymphoma in Hungary. Internationale Gesellschaft für Chemo- und Immunotherapie Meeting 2000, Linz, Austria
11. **Szomor Á**, Molnár L, Iványi J, Radványi G, Nagy Zs, Karádi Á, Gergely L, Bányai A, Demeter J, Aryan H, Gasztonyi Z, Kiss A, Kollár B, Egyed M, Losonczy H, Kelényi G, Pajor L. Extranodal involvement in primary systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in adults. Lymphoma 2000 – First International Symposium on the Biology and Treatment of Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. 2000. Saarbrücken. Germany.
12. **Szomor Á**. Magyar anapláziás nagysejtes lymphoma regiszter (diagnosztika, kezelés). Tihanyi Hematológiai Napok 2002. Tihany.
13. **Szomor Á**. NPM/ALK fusios protein expressio szerepe az anaplasias nagysejtes lymphoma pathogenesisében és prognosisában. Fiatal Onkológusok Fóruma 2001. Pécs
15. Pár A, Szereday L, Gasztonyi B, Kiss K, Kereskai L, **Szomor Á**, Pár G, Szeberényi J, Pajor L, Szekeres-Bartho J, Hegedüs G, Mózsik Gy: Decreased peripheral blood CD 19+ B-cell apoptosis, activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and immunoglobulin heavy chain (IgH) rearrangement in hepatitis C virus (HCV) infection: mechanisms for lymphomagenesis ? 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2002. Madrid.
16. **Szomor Á**, Dávid M. Autológ őssejt átültetés – A PTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika eredményei. A transzfúziós medicina aktuális kérdései - Őssejt funkció, plazticitás és átültetés. 2002. Pécs