

Molekuláris vizsgálatok B- és T-sejtes extranodalis Non-Hodgkin

limfómákban

Dr. Gurbity Pálfi Tímea



Összefoglalás

A malignus limfómák korai felismerése, a pontos patológiai diagnózis, valamint az újabb kezelési eljárások egyre jobb terápiás eredményekhez vezetnek. Ez tükröződik a legújabb, a WHO Limfóma Klasszifikációban is, amely a különböző entitásokat a molekuláris patológiai eltéréseik alapján osztályozza. Ennek következtében a pontos diagnózis felállításához, valamint a betegek követésében a molekuláris biológiai módszerek nélkülözhetetlenné váltak. Primer extranodalis limfóma a non-Hodgkin limfómák mintegy 20-25%-ban fordul elő, leggyakrabban a gasztrointesztinális traktusban. Vizsgálatunk tárgya elsősorban primer gasztrointesztinális limfómák voltak. A gasztrointesztinális rendszert érintő limfómák diagnosztikájában, már csak a vizsgálati anyag kicsinyisége (endoszkópos biopszia) miatt különös jelentőséggel bírhatnak a molekuláris biológiai módszerek. Korábban a klonalitás detektálására világszerte a Southern-blot módszert alkalmazták, azonban a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló molekuláris vizsgálatok mindinkább átvették a Southern-blot helyét, és az első választandó módszerré váltak a klonalitás kimutatásában. A PCR technikának kifejezett előnye az előzőhöz képest az, hogy nagyobb az érzékenysége, alacsonyabbak a költségei, gyorsan és egyszerűen kivitelezhető eljárás. Nagy előnyt jelent továbbá az a tény, hogy nem igényel magas molekulásúlyú, intakt DNS-t, így eredményesen alkalmazható formalinban-fixált paraffinos mintákból izolált, degradálódott, rossz minőségű DNS amplifikálására is. Alkalmas 200 bázispárnál (bp) rövidebb DNS szakaszok detektálására, így a klonális Ig és TCR γ géntermékek azonosítására.

A primer gyomor limfóma a második leggyakoribb malignus gyomor daganat. Az esetek fele agresszív, kifejezett malignitású, mint a diffúz nagy B-sejtes limfóma, míg a másik fele indolens lefolyású daganat, mint a MALT (mucosa associated lymphoid tissue - nyálkahártyához társult nyirokszövet) kiindulású limfóma. A primer gastricus MALT limfómák 90%-ában mutatható ki *Helicobacter pylori* (Hp) fertőzés. Egyre több adat szól amellett, hogy Hp fertőzés, mint tartós antigén inger kulcsszerepet játszik ezen limfómák kialakulásában. A Hp pozitív, IE stádiumú, mérsékelt malignitású MALT limfómák mintegy 80%-ában a baktérium eradikációjával komplett hisztológiai remisszió érhető el, a kezelést

követő egy éven belül. A szövettani remisszió kialakulása mellett az esetek egy részében molekuláris remisszió is kialakulhat. A várakozási idő alatt relapszus illetve kifejezett malignitású limfómává történő transzformálódás következhet be. Vizsgálatunk célja az volt, hogy a monoklonális B-sejtek detektálására alkalmazott polimeráz láncreakción (PCR) alapuló diagnosztikus módszer érzékenységét növeljük rutin, paraffinba-ágyazott endoszkópos gyomorbiopsziás mintákon. A korábban már közölt tanulmányokban a magas arányú monoklonalitást elsősorban a friss illetve a fagyasztott metszetek feldolgozásakor detektálták. Semnested, nested PCR technika és multiplex primer párok bevezetésével próbálták növelni a módszer érzékenységét, de ezáltal a módszer bonyolultabbá vált és elveszítette előnyeit. A mindennapi gyakorlatban nem áll mindig rendelkezésre friss fagyasztott minta, vagy nincs elég humán erőforrás a beérkezett minták azonnali feldolgozására. A biopsziák paraffinba ágyazása lehetővé teszi a minták tartós raktározását, így későbbi időpontban történő feldolgozásukat, valamint retrospektív vizsgálatok elvégzésére is lehetőséget ad. Célunk eléréséhez polimeráz láncreakción (PCR) alapuló immunglobulin nehézcsoport (IgH) génátrendeződés kimutatását kombináltuk az immunglobulin kappa könnyűlánc (Ig κ) génátrendeződés kimutatásával. A PCR reakció érzékenységének növeléséhez vizsgálatainkat a hagyományos Taq polimeráz enzim (Fermentase) alkalmazása mellett egy olyan enzimmel is elvégeztük, mely mind 5'-3' DNS polimeráz és 3'-5' exonukláz aktivitással is rendelkezik (rTth polimeráz, GeneAmp XL kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Először paraffinba ágyazott 6 nodális folliculáris- (FL), 15 gyomor MALT-, és 22 gyomor diffúz nagy B-sejtes limfóma (DNBL) mintákon végeztük el a PCR alapú IgH génátrendeződés detektálását mind a hagyományos Taq, mind az új rTth enzimmekkel. Taq polimeráz alkalmazásával 53%-ban (FL: 67%, MALT limfóma: 47%, DNBL: 55%), míg az rTth enzimmel 73%-ban detektáltunk monoklonalitást (FL: 67%, MALT limfóma: 73%, DNBL: 73%). Az rTth enzim alkalmazásával a PCR reakció érzékenysége szignifikánsan nőtt, különösen gyomor MALT és DNBL esetében ahol a minta kicsinyége (endoszkópos) jelentősen befolyásolja a reakciót. Ezt követően 26 MALT limfómás beteg 42 paraffinba ágyazott gyomorbiopsziáján végeztük el a PCR alapú IgH és Ig κ génátrendeződés vizsgálatát. Mindkét esetben hagyományos Taq polimerázt alkalmaztunk. A 42 szövettani minta közül 34 mintában a daganat szövettanilag jelen volt, míg 8 esetben a különböző kezeléseket (Hp. eradikáció, kemoterápia) követően szövettanilag igazolt komplett hematológiai remissziót (KHR) detektáltunk. A szövettanilag igazolt gyomor MALT lymphomák esetében 94%-ban detektáltunk monoklonalitást. Külön-külön megvizsgálva a génátrendeződésüket azt láthattuk, hogy az IgH az esetek 61.7%-ban mutat pozitívitást; míg

ezzel szemben az Igk 82%-ban pozitív, bizonyítva azt, hogy az Igk génátrendeződés PCR alapú kimutatása érzékenyebb eljárás, mint az IgH kimutatása. A kezeléseket követően vizsgált 8 biopsziás mintából, melyek szövettani remissziót mutattak, 4/8 esetben a monoklonális B-sejtek további jelenlétét igazolta az Igk PCR vizsgálat. IgH génátrendeződés vizsgálatával nem detektáltunk monoklonalitást. Négy esetben a klinikai és szövettani remisszió mellett molekuláris remisszió is kialakult. Összehasonlítva a két vizsgálat eredményét azt gondoljuk, hogy gyomor MALT limfómák PCR alapú IgH és Igk génátrendeződés vizsgálata érzékenyebb módszer a B sejtes monoklonalitás detektálásában mint az rTth enzimmal végzett IgH PCR vizsgálat (94% versus 73%). Lehetőségünk volt egy mérsékelt malignitású, I. stádiumú gyomor MALT limfómában szenvedő, Hp. pozitív beteg molekuláris genetikai követésére, aki csak Hp. eradikációs kezelésben részesül. A betegség szövettani diagnosztizálásakor mind az IgH és az Igk génátrendeződés vizsgálatának eredménye pozitív volt. A beteg eradikációs terápiában részesült, majd ismételt biopszia történt, amelyben továbbra is jelen voltak a monoklonalitást bizonyító szövettani és molekuláris eltérések. A négy hónap múlva készült kontroll biopszia már szövettanilag daganatmentesnek bizonyult, és az IgH PCR eredménye is átalakult a monoklonalitást bizonyító domináns csíkból poliklonalításra utaló elmosódott kenetté. Az Igk génátrendeződés azonban továbbra is detektálható volt. Ezen jelenség pontos klinikai jelentősége ma még nem ismert, a betegek hosszabb követése szükséges.

A primer intestinalis T-sejtes lymphomák leggyakoribb formája az ún. enteropátia típusú T-sejtes limfóma (ETL), mely a cöliakia (glutén-szenzitív enteropátia) késői szövődményei közé tartozik. Refrakter spruról (RS) akkor beszélünk, amikor a szigorúan betartott gluténmentes diéta ellenére sem következik be kellő javulás. Ez, az egyébként ritka állapot kialakulhat egy korábban diétára jól reagáló betegben (szekunder RS), de előfordulhat, hogy a betegség kezdettől fogva refrakter (primer RS). A limfóma kialakulása többlépcsős folyamat, immunfenotípus és molekuláris genetikai bizonyítékokkal is arra nézve, hogy RS-ban az intraepiteliális limfocitákban (IEL) jön létre klonális szelekció monoklonális neoplasztikus T-sejt populációt létrehozva, melynek klonális expanziójával alakul ki az ETL. A limfómagenezisben a gluténra adott tökéletlen immunválasz és a genetikai eltérések halmozódása egyaránt szerepet játszik, az interleukin 15-nek is szerepet tulajdonítanak. A refrakter esetekben az IEL-k monoklonálisak és abnormális (cCD3⁺CD4⁻CD8⁻) immunfenotípust (IF) mutatnak. Az ETL, mely a természetes immunitásban szerepet játszó intesztinális IEL-k daganatának tartható, szoros patogenetikai kapcsolatot mutat a cöliákiával. A morfológiailag változatos megjelenésű ETL klinikailag agresszív, igen rossz prognózisú

daganat. A rossz prognózis okai között a multiplicitást, valamint az első észleléskor (gyakran akut hasi katasztrófa képében) detektált előrehaladott stádiumot kell kiemelni. Az esetek jelentős részében tapasztalható, hogy az ilyen intesztinális T-sejtes limfóma az egész bélrendszerre kiterjed. Tekintettel a betegség agresszív lefolyására és késői detektálására célunk az volt, hogy a kórkép különböző stádiumaiban nyert szövettani minták polimeráz-lánreakción (PCR) alapuló TCR gamma génátrendeződés vizsgálatával lehetővé tegyük a minél korábbi diagnózis felállítását és ezáltal a specifikus kezelés korai megkezdését, javítva a betegek túlélését, valamint hogy bizonyítsuk a refrakter cöliákiában immunhisztokémiai módszerekkel detektálható abnormalis IF-ú IEL-ek már a daganatos sejtpopuláció részét képezik. Célunk eléréséhez retrospektív vizsgálatunkban 6 beteg (a kórkép különböző stádiumaiban és a gasztrointesztinális traktus különböző szakaszaiból nyert) 40 (15 ETL, 4 RS és 21 morfológiailag limfóma mentes-IEL) paraffinba-ágyazott szövettani mintáit, a kórszövettani feldolgozás mellett, immunmorfológiai vizsgálatnak, és a T-sejtes klonalitás kimutatása érdekében, polimeráz-lánreakción (PCR) alapuló TCR gamma génátrendeződés vizsgálatának vetettük alá. Ugyanis a monoklonalitás az esetek jelentős részében már fennáll a morfológiailag még ETL-nek nem megfelelő esetekben is. Mind a 15 ETL- és 4 RS mintában monoklonalitást, a 21 limfóma mentes mintából 13-ban monoklonalitást, 6-ban poli-, oligoklonalitást detektáltunk, és 2 esetben sikertelen volt a PCR vizsgálat. Eredményeink alátámasztják a PCR alapú TCR gamma génátrendeződés vizsgálatának fontosságát a betegség korai szakaszában (hiszen 21 minta a morfológiailag még RS-nek megfelelő stádiumú) lehetővé téve a minél korábbi diagnózis felállítását és ezáltal a specifikus kezelés korai megkezdését, javítva ezáltal a betegek túlélését. Továbbá ugyanazon beteg ETL-es mintájában és a gasztrointesztinális traktus különböző szakaszaiból nyert morfológiailag limfóma mentes mintákban detektált azonos nagyságú monoklonális csík bizonyítja, hogy az ETL az egész béltraktusra kiterjedő betegség és a túlélés javítása érdekében szisztémás kezelés alkalmazása nélkülözhetetlen.

Cután T-sejtes limfómákat (CTL) a non-Hodgkin limfómák közé soroljuk. CTL heterogén betegség csoportot képeznek, melyek a bőrben manifesztálódnak és malignus T limfociták alkotják. A CTL korai diagnózisát nehezíti a betegség sokféle klinikai és szövettani megjelenési formái, továbbá az egységes diagnózis és kezelés hiánya. Mycosis fungoides (MF) a leggyakoribb típusa a primer CTL-nek, közel 50%-át képezi. PCR alapú TCR gamma génátrendeződés érzékenységét vizsgáltuk szövettanilag igazolt CTL-ben, megkönnyítve a bőrt érintő malignus és benignus limfoproliferatív kórképek elkülönítését és a rosszindulatú daganat indolens és agresszív formáinak megkülönböztetését. Tizenkettő CTL-es beteg 13

(8/13 MF, 2/13 limfomatoid papulosis-LP, 3/13 subcután panniculitisszerű T-sejtes limfóma-SPTL) paraffinba ágyazott szövettani mintáján végeztük el a TCR γ génátrendeződés PCR vizsgálatát. Egy SPTL-es beteget részletesen ismertettünk. Monoklonalitást a CTL-es esetek 85%-ban detektáltunk. Azt gondoljuk, hogy a PCR alapú TCR gamma génátrendeződés elég érzékeny módszer a T-sejtes monoklonalitás detektálására CTL-ben, segítve a korai diagnózis felállítását. A disszertációban részletesen ismertetett SPTL-ben bebizonyosodott, hogy az irodalmi adatokkal egyezően a TCR gamma génátrendeződés elősegíti e betegségcsoportban az indolens és agresszív forma megkülönböztetését, ezáltal elősegítve a megfelelő terápiás eljárás kiválasztását.