

Молекулярная и цитогенетическая диагностика лимфом

VII Всероссийская научно-практическая конференция
«Фундаментальные и прикладные исследования в гематологии»

Мисюрин А.В.

Лаборатория «ГеноТехнология»

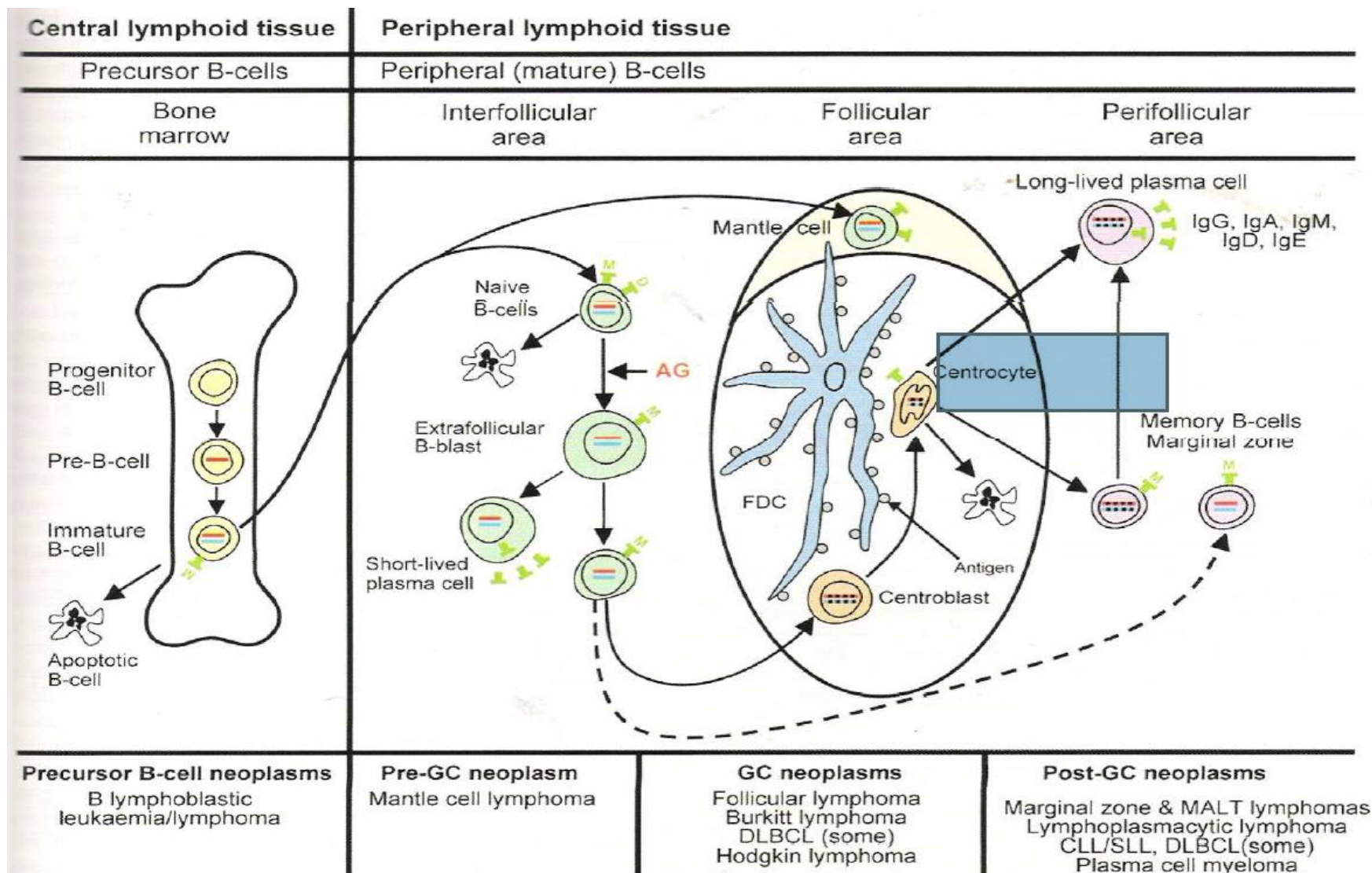
Новосибирск 26 ноября 2012

Диагностика лимфом

Для установления диагноза необходим комплексный подход:

- Анализ клинической картины
- Морфология и гистология пораженных лимфоузлов и костного мозга
- Иммунофенотипирование опухолевых клеток
- Цитогенетическая и молекулярная диагностика (диагноз, прогноз)

Этапы дифференцировки лимфоцитов – основа классификации лимфом

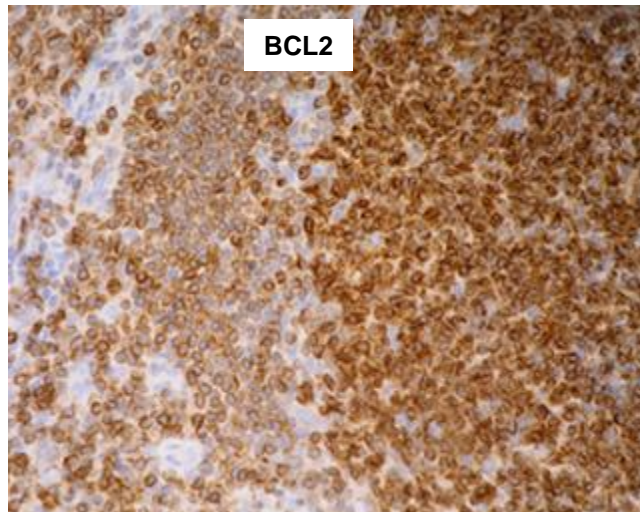
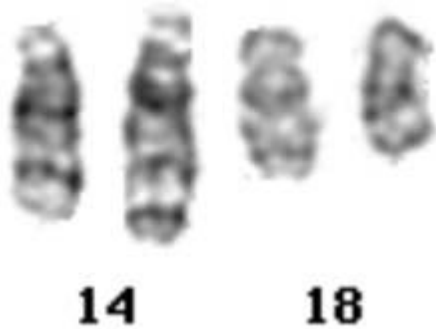


Цитогенетические маркеры В-клеточных лимфом

Лимфома	Хромосомная аномалия	Вовлеченные гены
Фолликулярная лимфома	t(14;18)	IgH, BCL-2
Лимфома из клеток мантийной зоны	t(11;14)	BCL1, IgH
Лимфоплазмацитарная лимфома	t(9;14)	PAX-5, IgH
Лимфома Беркита	80% t(8;14) 10% t(2;8) 10% t(8;22)	c-MYC, IgH κ-легкая цепь, c-MYC c-MYC, λ-легкая цепь
ДБККЛ	30% t(14;18) 30% t(3;14) редко t(2;17)	IgH, BCL-2 BCL-6, IgH ALK, клатрин

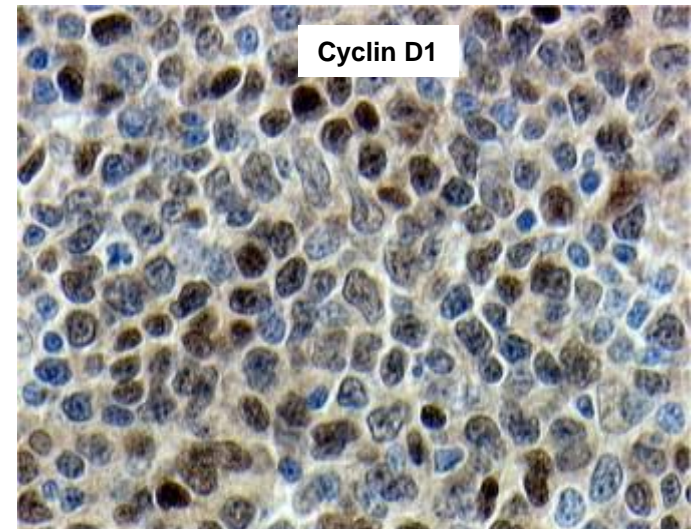
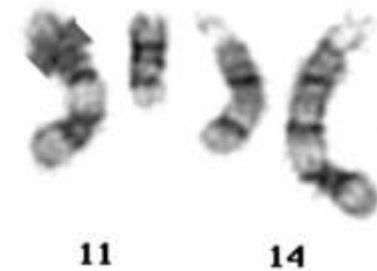
Цитогенетические маркеры В-клеточных лимфом

t(14;18)(q32;q21)



Фолликулярная лимфома

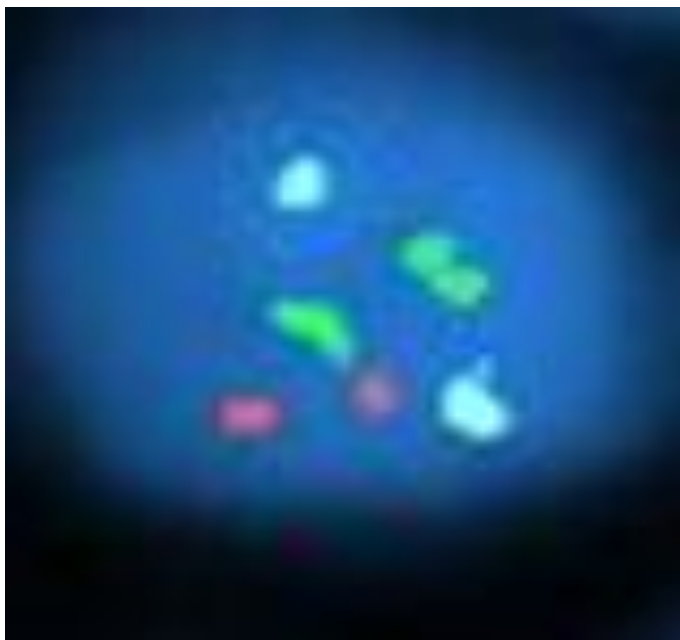
t(11;14)(q13;q32)



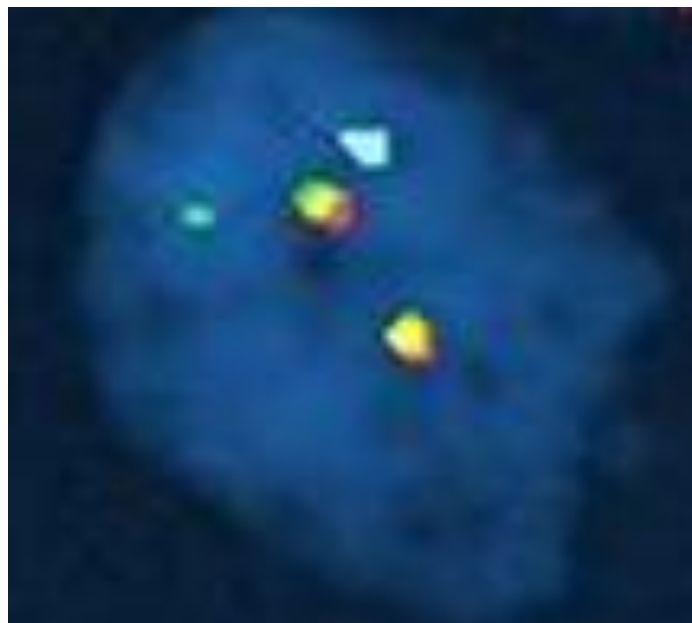
Лимфома из клеток мантийной зоны

Транслокация t(14;18): FISH-анализ слияния IgH (14q32) и c-MYC (18q21)

норма



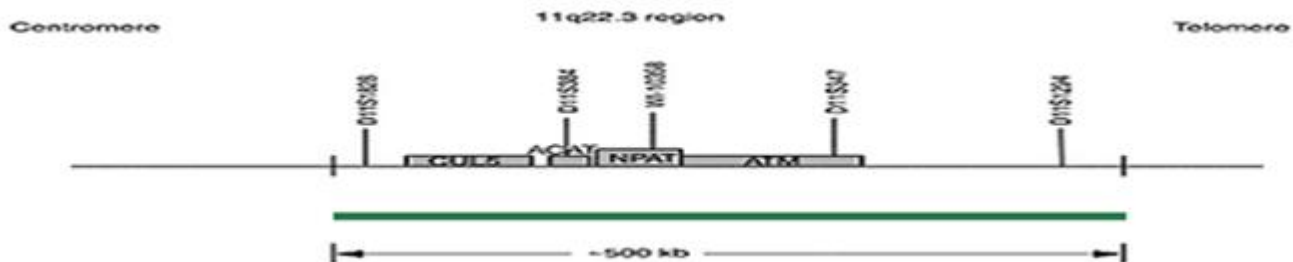
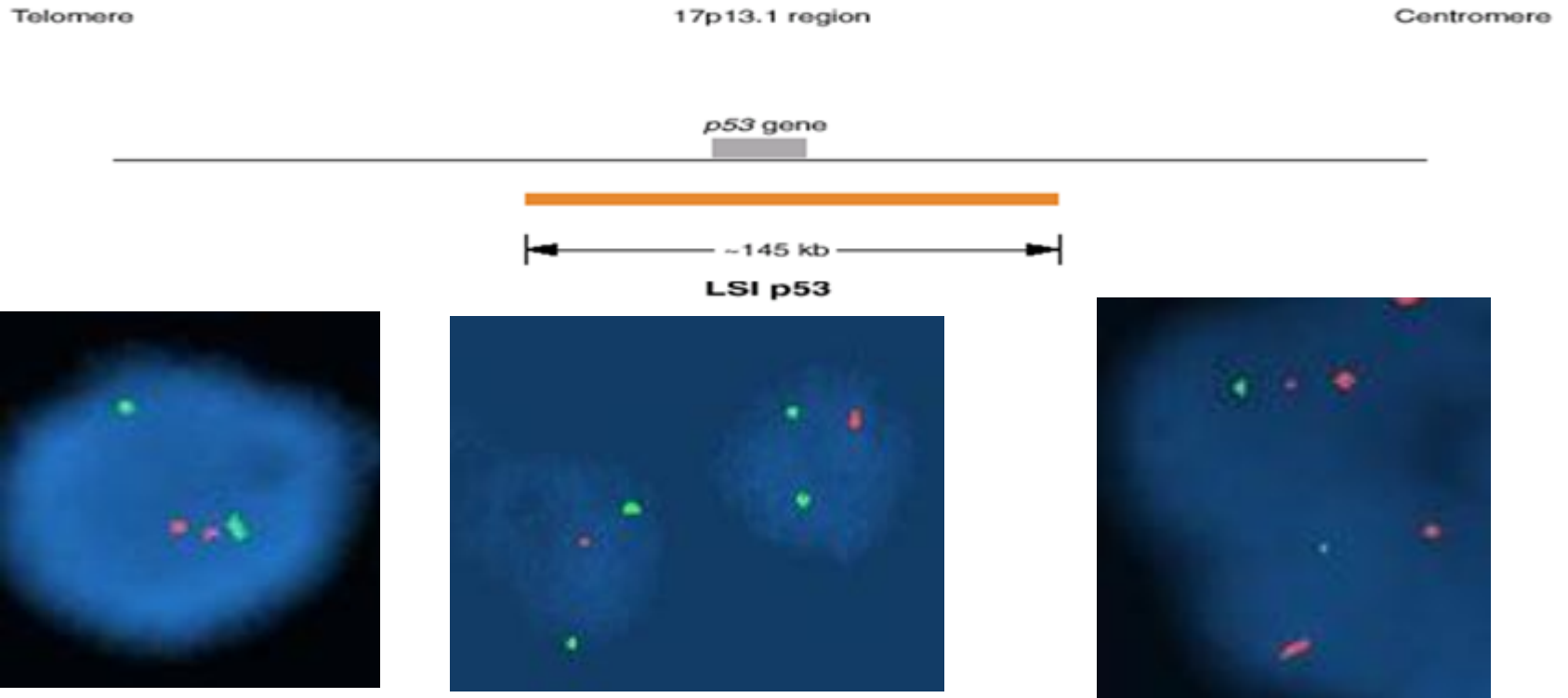
t(14;18)



В-ХЛЛ:

(-)p53 (красный) – прогрессия, резистентность к Флударабину

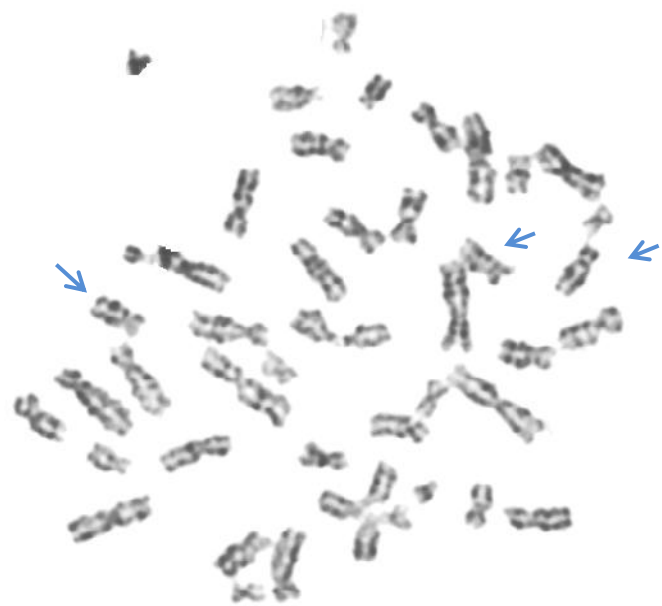
(-) ATM (зеленый)- прогрессия



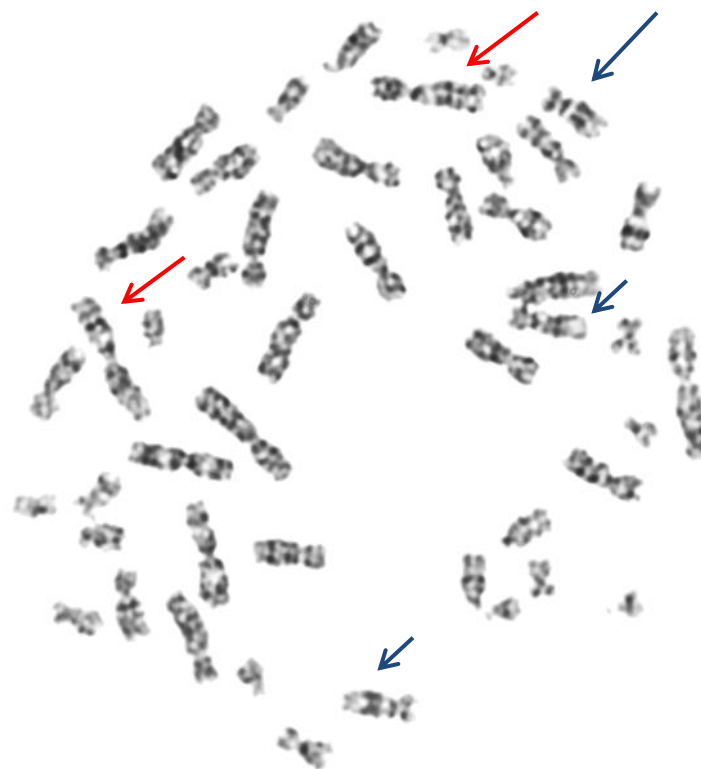
ДБККЛ рецидив

---- 1,der(1)

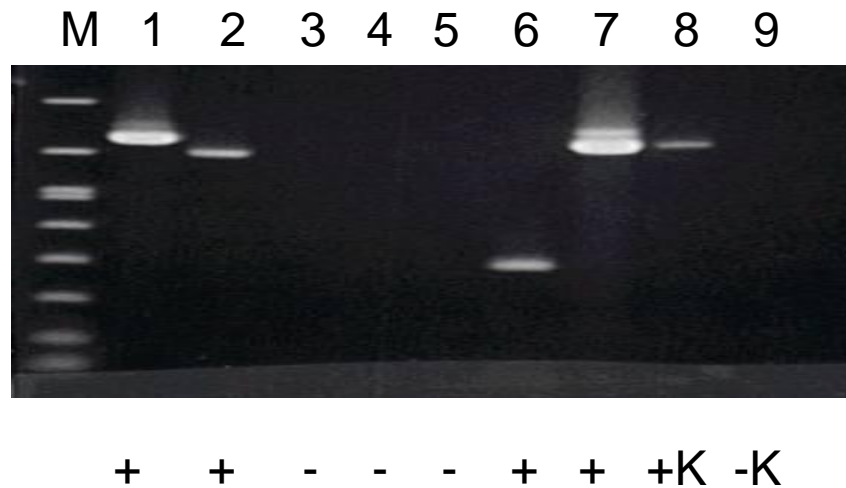
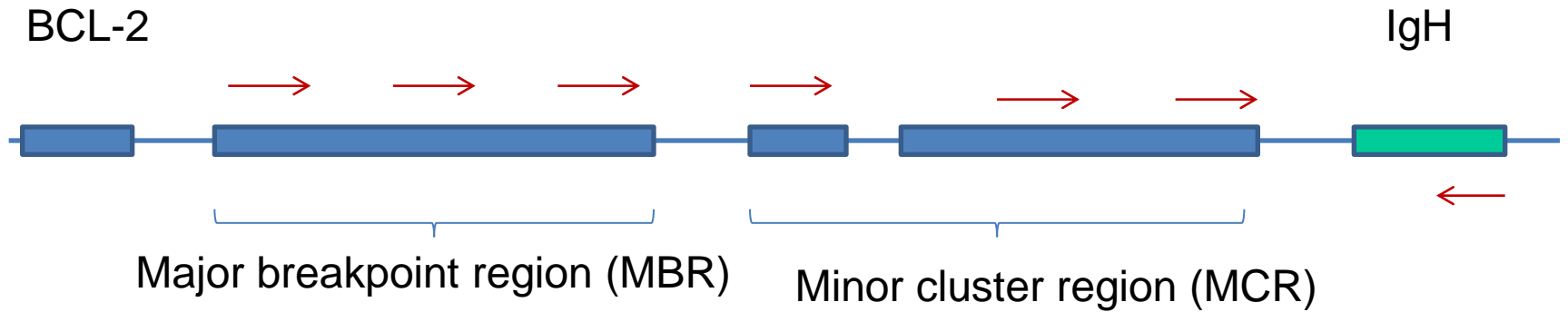
--- 12



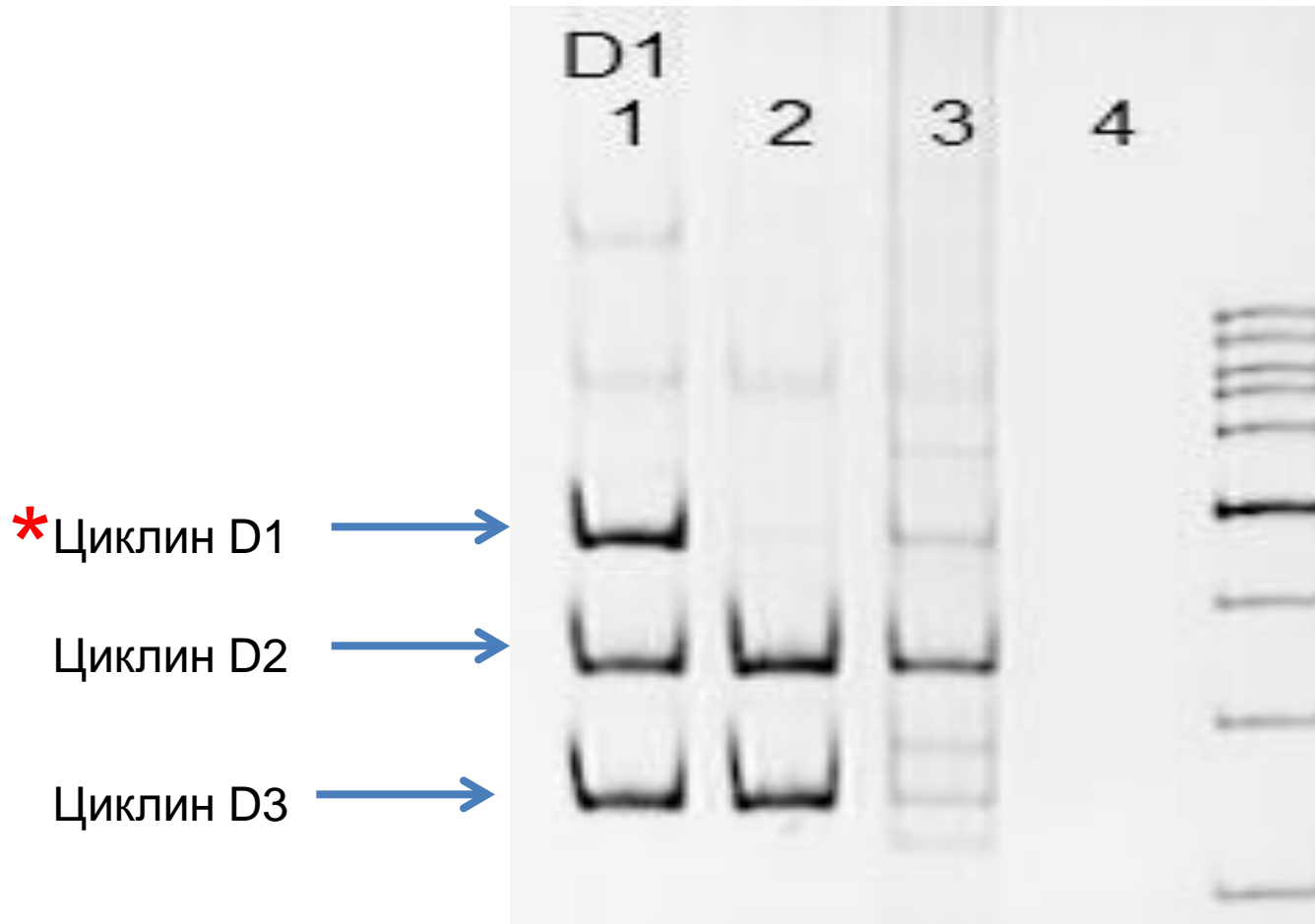
47,XX,+12



ДНК-диагностика t(14;18)

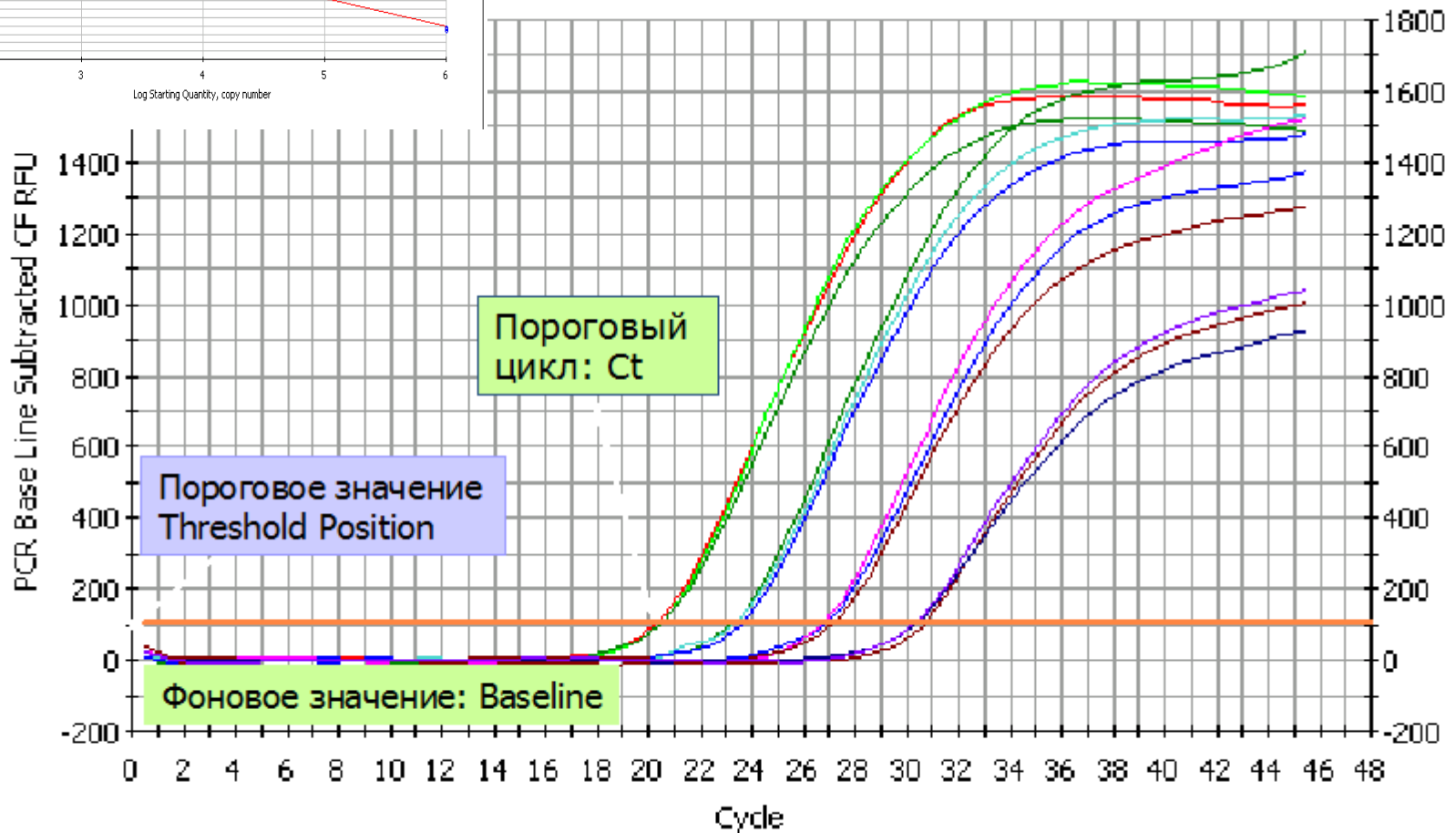
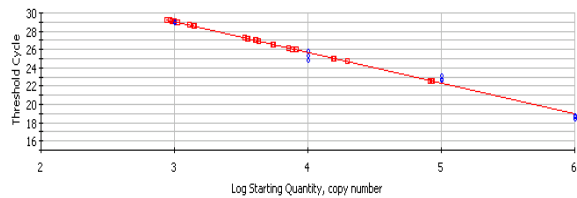


Гиперэкспрессия гена BCL-1 (циклин D1) в результате t(11;14) при лимфоме из клеток мантийной зоны



Количественный анализ: ПЦР в реальном времени

Correlation Coefficient: 0.994 Slope: -3.360 Intercept: 39.132 $Y = -3.360 X + 39.132$
PCR Efficiency: 90.4 %



Клональность при лимфомах

Клональность – эффективный молекулярный маркер лимфом

В основе применения следующие факты:

- Опухолевые лимфоциты клональны
- Популяции реактивных нормальных лимфоцитов поликлональны

ПЦР – основной метод молекулярной диагностики клональности:

Определяют перестройку антигенов В- и Т-лимфоцитов

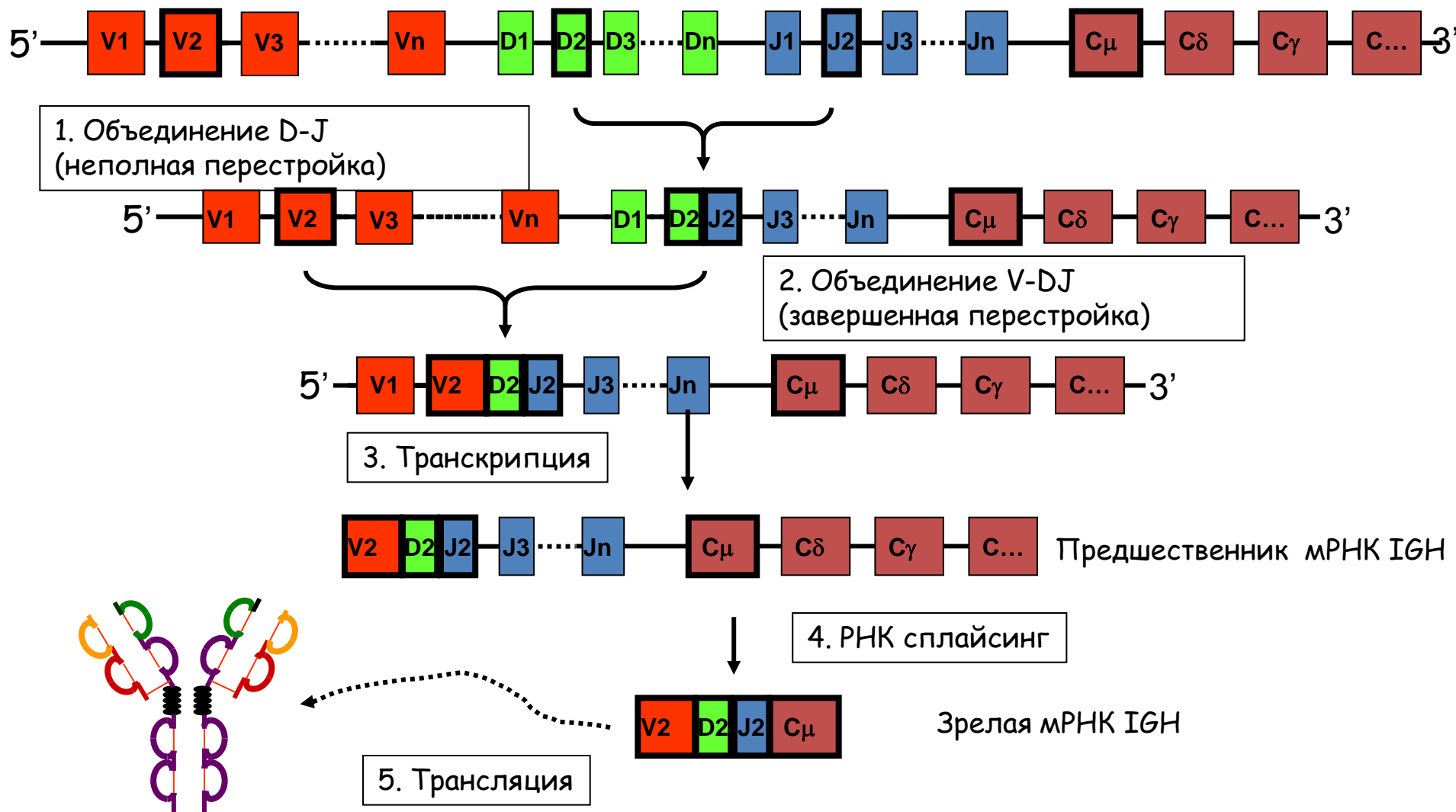
- IG гены
- TCR гены

Метод имеет ограничения и «подводных камни»

Ограничения и «подводные камни» определения клональности

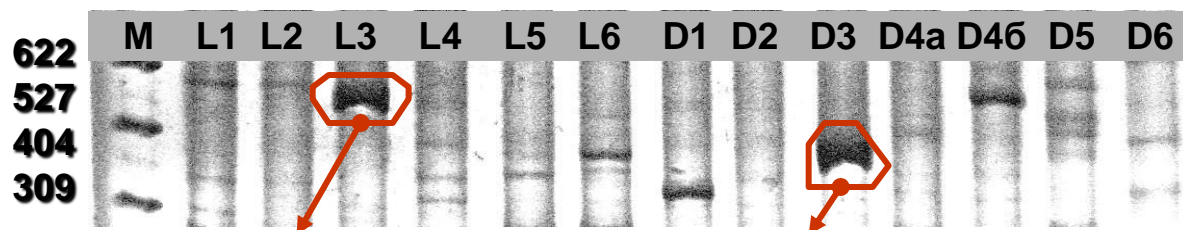
- Ограниченная чувствительность
- Понятие клональности и злокачественности не эквивалентны
- Ig и TCR перестройки не ограничены линиями лимфоцитов
- Псевдоклональность
- Олигоклональность
- Ложноположительные сигналы
- Ложноотрицательные сигналы

V(D)J рекомбинация генов тяжелых цепей иммуноглобулинов



Клональная перестройка IgH при ММ, В-клеточных лимфомах, В-ХЛЛ, В-ОЛЛ

1. ОТ-ПЦР с семейств-специфичными праймерами



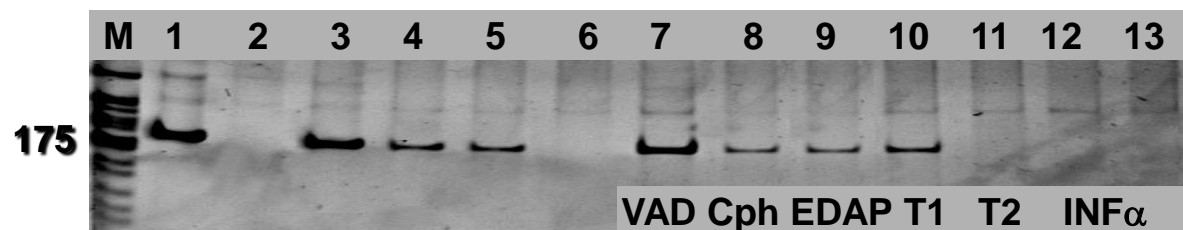
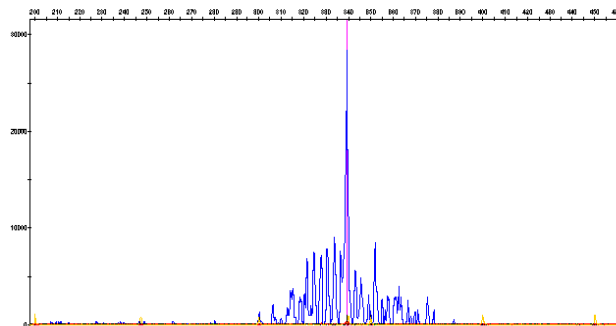
2. Секвенирование ПЦР-фрагментов

3. Синтез пациент-специфичных праймеров/

4. Двухраундовая ПЦР:

1) с семейств-специфичными праймерами

2) с пациент-специфичными праймерами



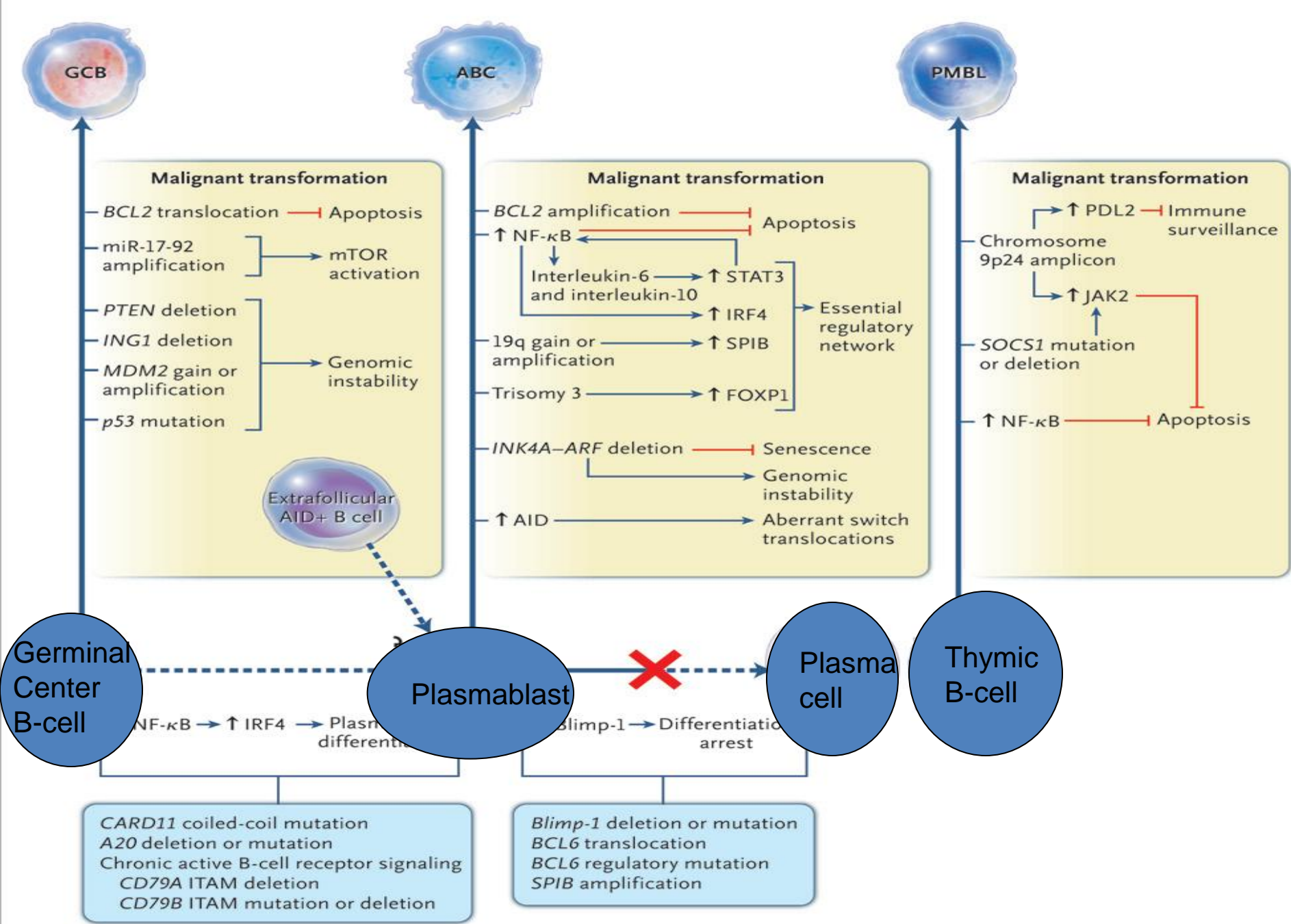
Отсутствие клональности – важный диагностический признак

Ряд лимфатических злокачественных опухолей не имеют перерестроек IG или TCR genes:

- НК лимфомы
- Миелосаркома
- Неоплазии из дендритных клеток

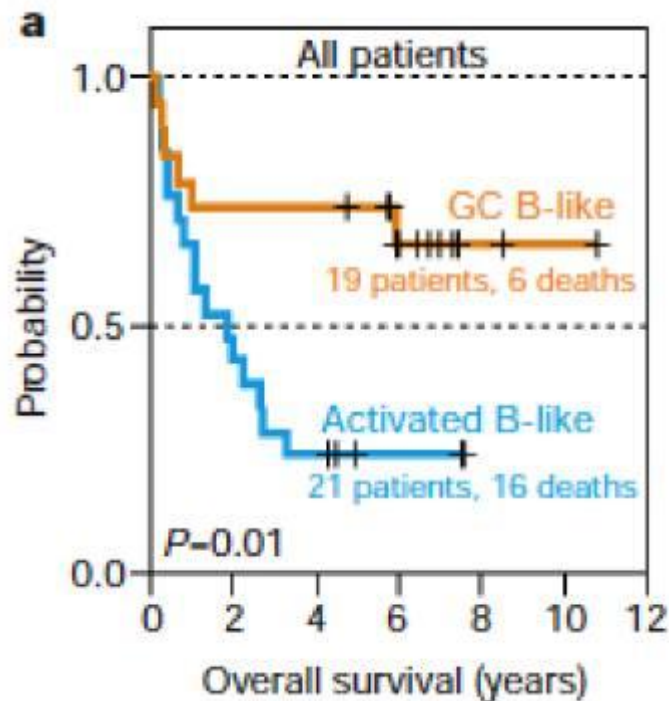
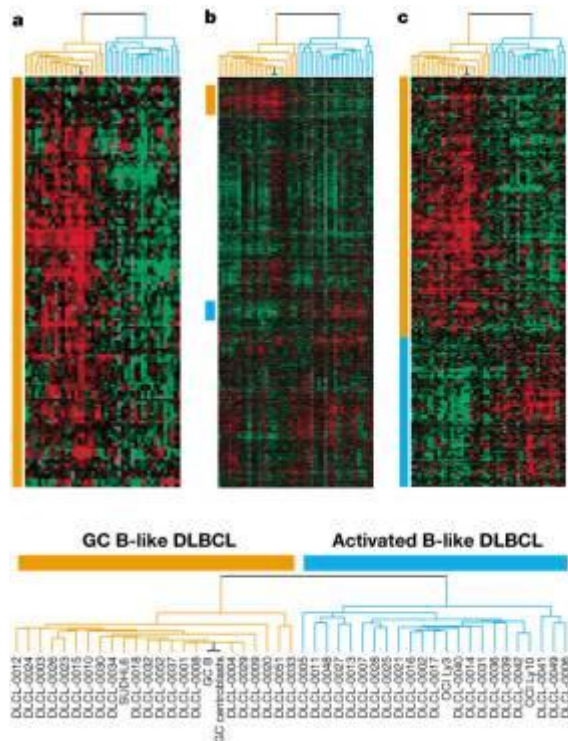
Моноклональные по сути, но поликлональные по IG или TCR :

- HHV8-ассоциированная болезнь Кастелмана
- HHV8 (KSHV8)- и EBV- ассоциированные герминотрофные лимфопролиферативные заболевания
- Атипичные гиперплазии маргинальной зоны MALT



Профиль экспрессии генов определяет прогноз ДБКЛ

Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.
Alizadeh AA, et al. Nature 2000; 403: 503-511

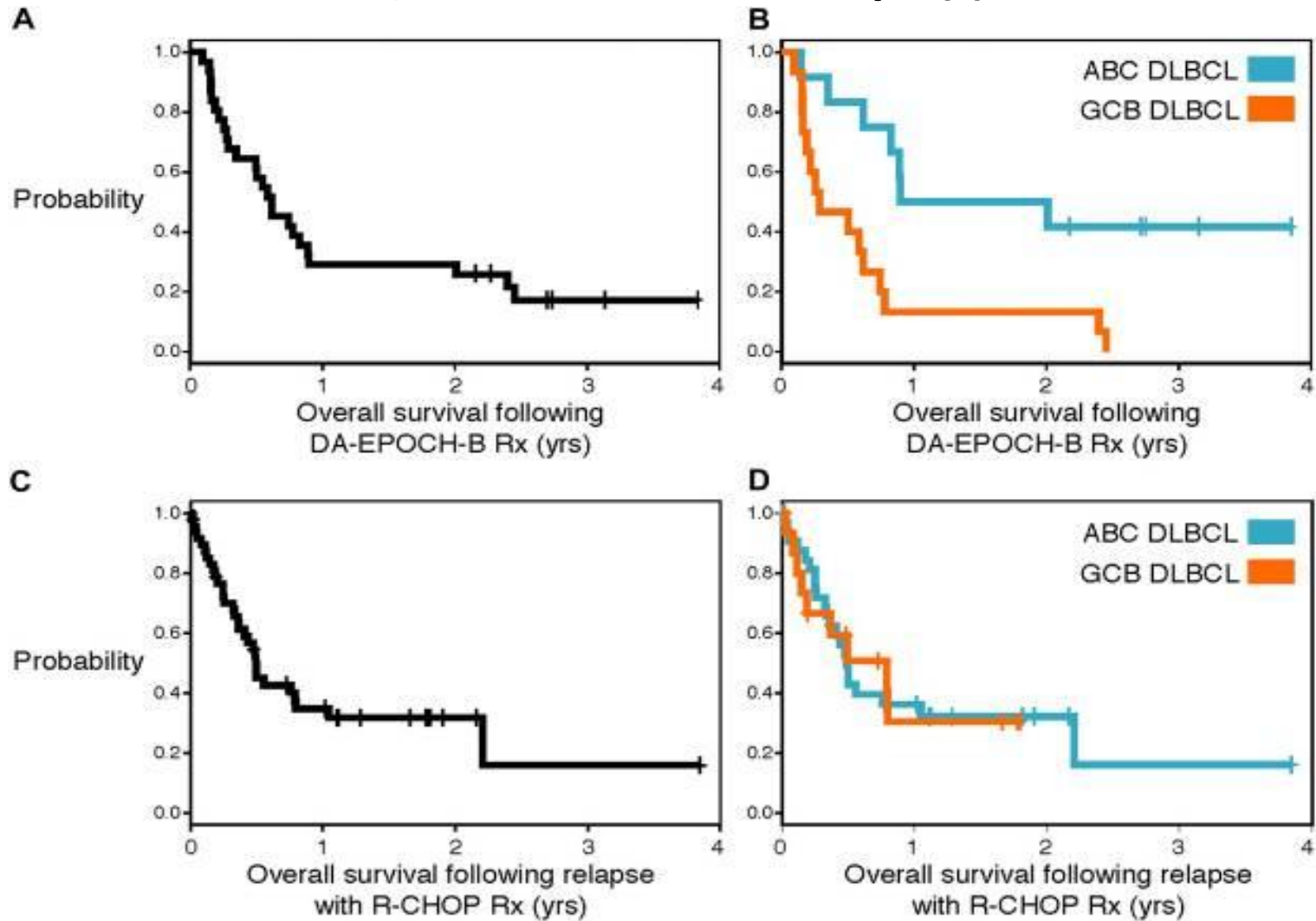


Две прогностические группы

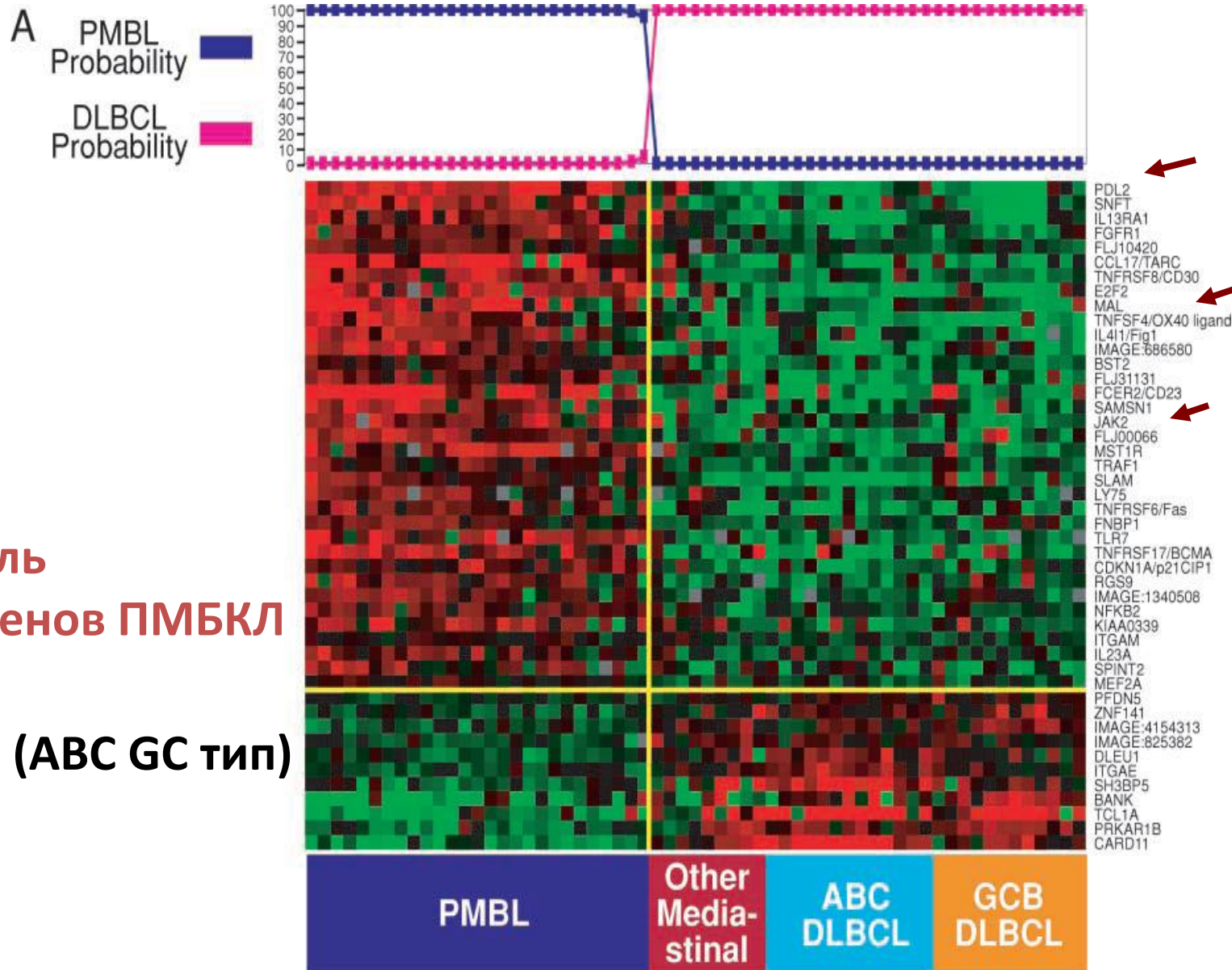
- **Germinal centre B-like: благоприятный прогноз**
- **Activated B-like; неблагоприятный прогноз**

Бортезомиб существенно улучшает выживаемость при рецидивах/рефрактерности АВЛ-ДБККЛ, но не GCB-ДБККЛ

Общая выживаемость при ДБККЛ



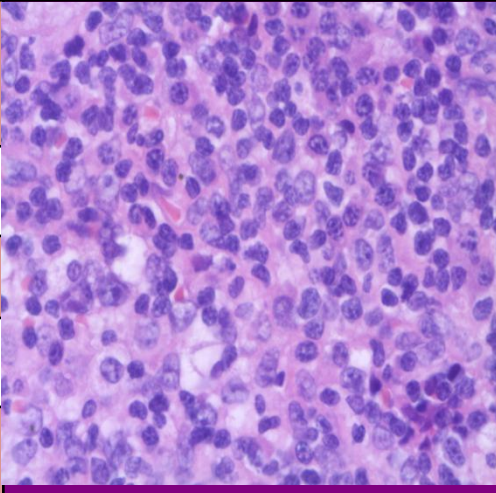
Профиль экспрессии генов (274 биопсии)



65% - профиль экспрессии генов ПМБКЛ

35% - ДБККЛ (ABC GC тип)

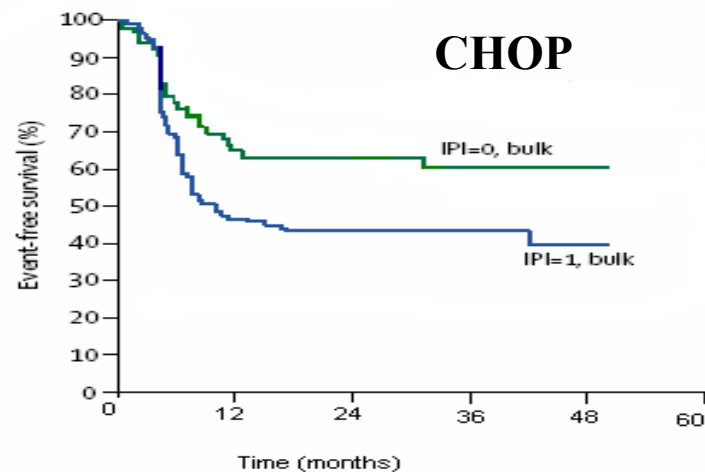
ДБККЛ

ИГХ	ГИСТОЛОГИЯ
CD79a+ sIg M+ (50-75%)	
CD20+	
CD23 -/+	
CD30 -/+	
CD10+ (<50%)	

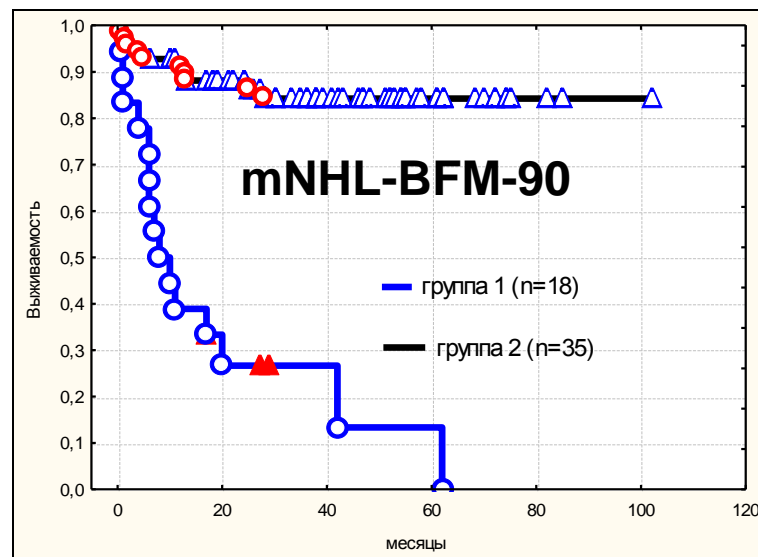
Цитогенетика	
del 3q27	30-40%
t (14;18)(q32q21)	20-30%
t (2;17)(p23q21)	редко

О
Б
Щ
А
Я
В
Ы
Ж
И
В
А
Е
М
О
С
Т
Ь

Michael Pfreundschuh Lancet
Oncol 2006; 7: 379–91

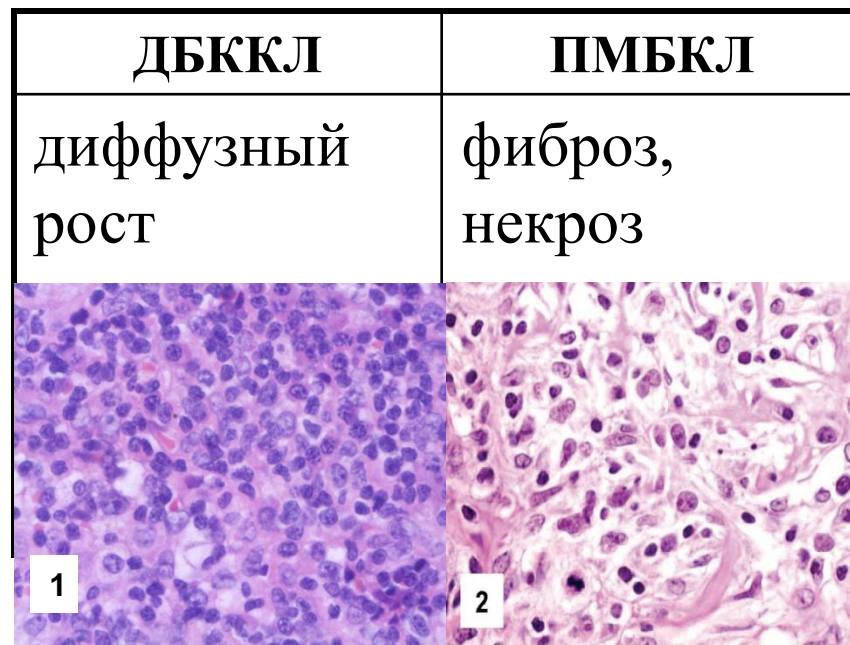


ГНЦ (Магомедова А.У.)



Дифференциальная диагностика ДБККЛ и ПМБКЛ

ИГХ	ДБККЛ	ПМБКЛ
CD79a+sIg M+	+	-
CD20+	+	+
CD23+	-/+	+
CD30+	-/+	-/+
CD10+	+/-	-
MUM 1+	-/+	+

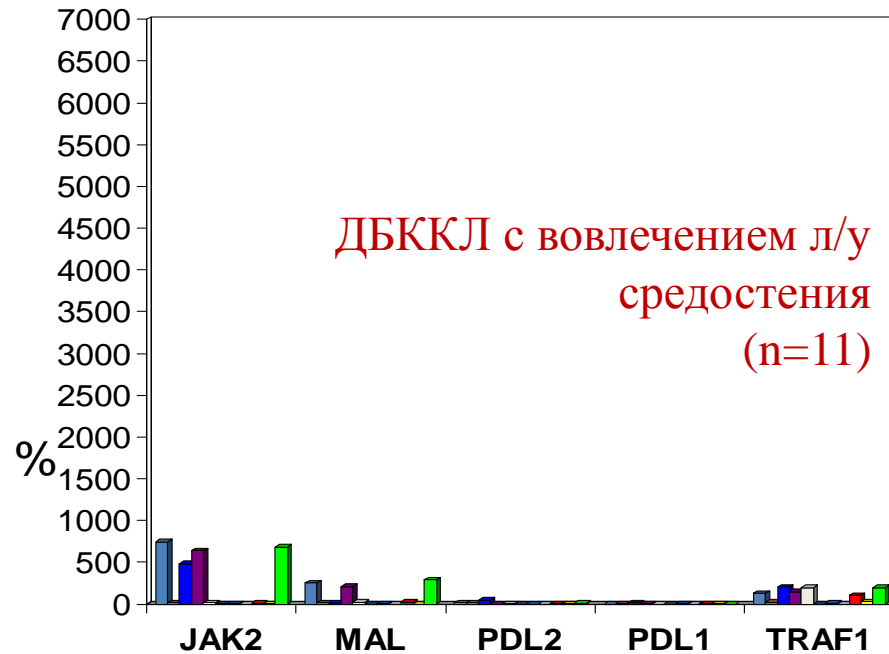
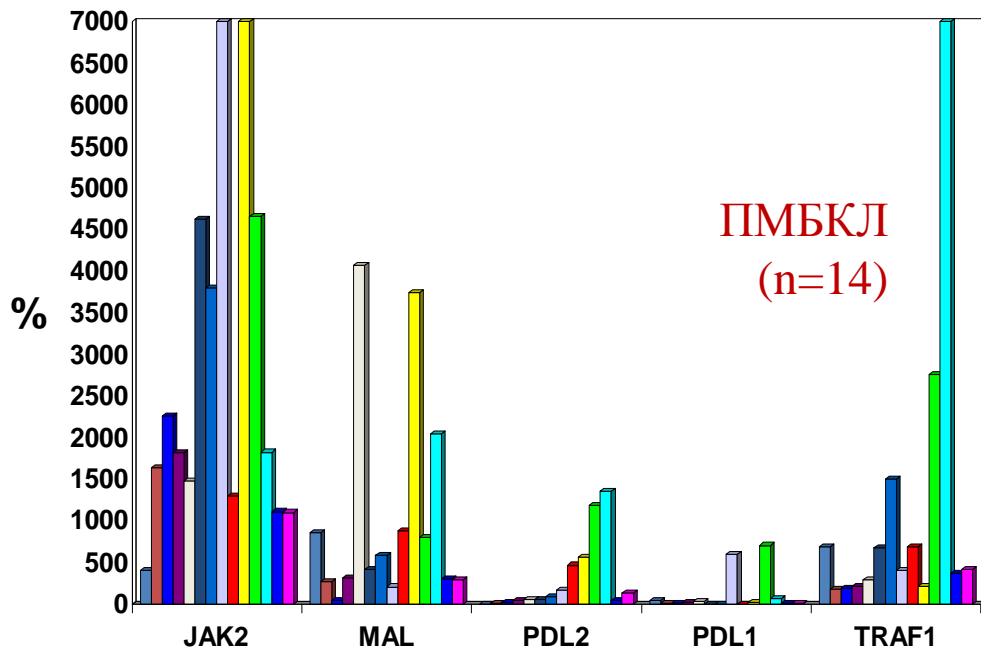
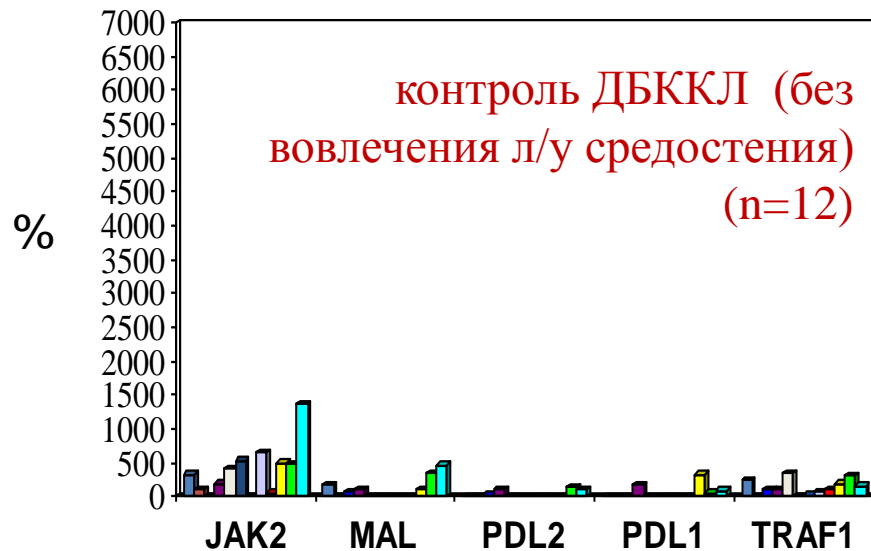


ДБККЛ		ПМБКЛ	
del 3q27	30-40%	Амплификация 9p24 (локус JAK2)	65- 75%
t (14;18)(q32q21)	20-30%	Амплификация 2p15 (локуса REL)	15%
t (2;17)(p23q21)	редко	Амплификация 12q24	10%

Относительный уровень экспрессии генов (ПЦР в реальном времени) (n=37)

Вывод:

Гены JAK2, MAL, PDL2, TRAF1 являются специфическими и чувствительными маркерами в дифференциальной диагностики ДБККЛ с первичным вовлечением л/у средостения и ПМБКЛ



J Mangasarova ,A Misyurin ,A Magomedova. EHA 2011. Abstract 1385.

Я.К.Мангасарова, А.В.Мисюрин, А.У.Магомедова, С.К.Кравченко, А.М.Кременецкая, А.И.Воробьев. Клиническая онкогематология. 2011; 2, с.142-145.

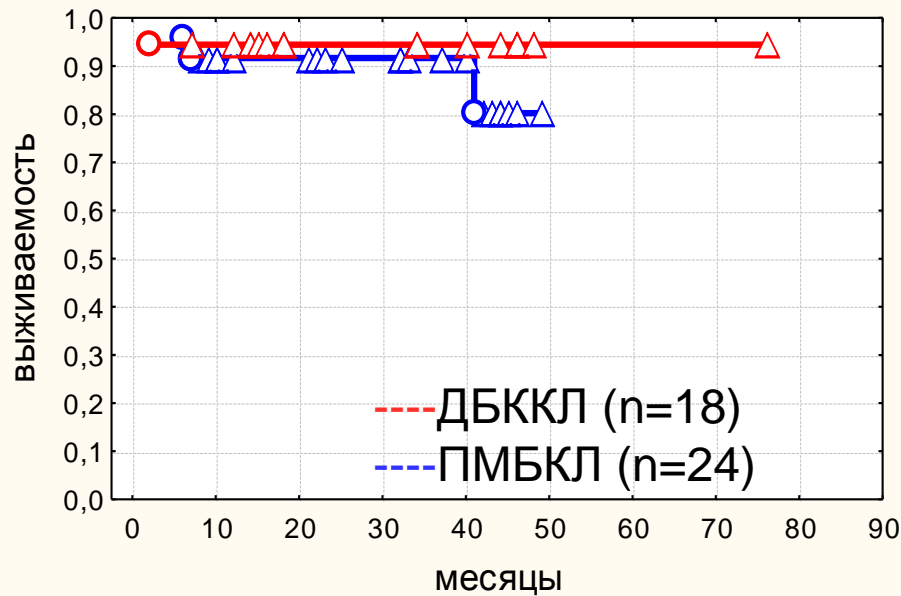
Гиперэкспрессия 2-х и более генов

- ПМБКЛ - 18 из 18 (100%)
- ДБККЛ с первичным вовлечением медиастинальных л/у - 0
- ДБККЛ генерализованная форма - 0

J Mangasarova ,A Misyurin ,A Magomedova. EHA 2011. Abstract 1385

*Я.К.Мангасарова, А.В.Мисюрин, А.У.Магомедова, С.К.Кравченко, А.М.Кременецкая, А.И.Воробьев.
Клиническая онкогематология. 2011; 2, с.142-145*

Общая выживаемость



ОВ:

ДБККЛ=94%

ПМБКЛ=80%

БРВ:

ДБККЛ=94%

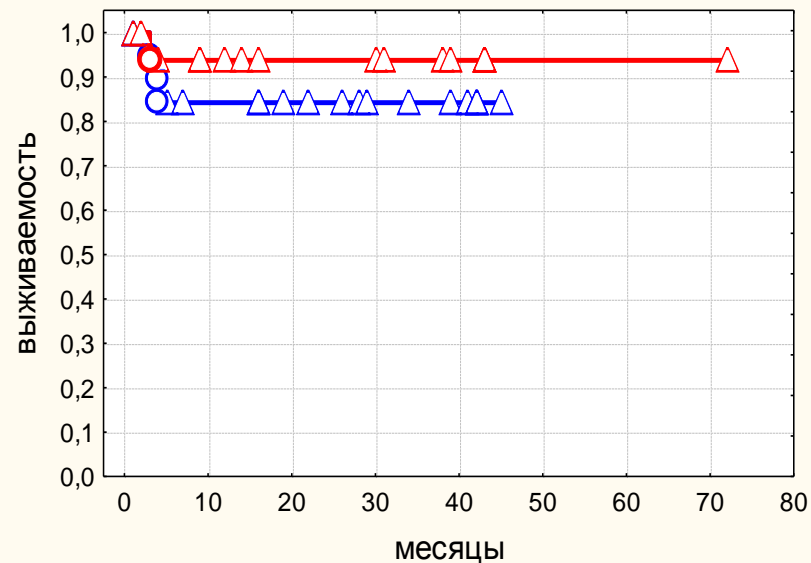
ПМБКЛ=85%

ЭФФЕКТИВНОСТЬ

mNHL-BFM-90

(n=42)

Безрецидивная выживаемость



--- ДБККЛ (n=18)

--- ПМБКЛ (n=21)

J Mangasarova ,A Misyurin ,A Magomedova. ЕНА 2011. Abstract 1385.

Я.К.Мангасарова, А.В.Мисюрин, А.У.Магомедова, С.К.Кравченко, А.М.Кременецкая, А.И.Воробьев. Клиническая онкогематология. 2011; 2, с.142-145.

Анапластическая Т-крупноклеточная АЛК-позитивная лимфома (АККЛ)

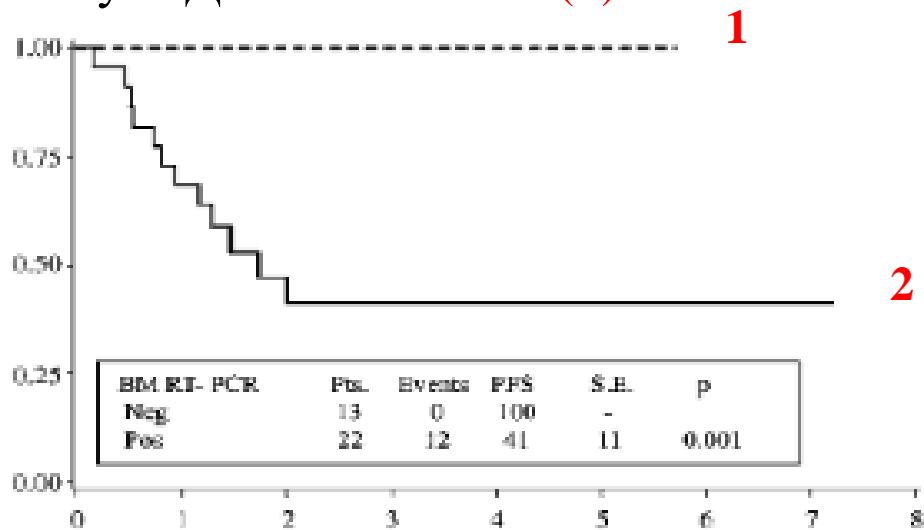
- 15-30% неходжкинских лимфом у детей, 3-5% - у взрослых пациентов;

опухоль характеризуется:

- диффузным ростом крупных полиморфных опухолевых клеток, экспрессирующих антиген CD30 на клеточной мембране и в области аппарата Гольджи (H.Stein, 1985 г);
- ядерной и цитоплазматической экспрессией киназы анаплазированных лимфом (АЛК) в опухолевых клетках;
- транслокацией $t(2;5)(p23;q35)$ с образованием химерного гена (и белка) *NPM-ALK* (в 80% случаев) или вариантными транслокациями с вовлечением локуса 2p23 (в 20% случаев);
- первичные и вторичные опухоли (трансформации из других лимфом).

АККЛ: Детекция минимальной диссеминированной болезни

- МДБ - минимальная детекция специфического химерного транскрипта в образцах периферической крови и/или костного мозга методом ПЦР в реальном времени при отсутствии лабораторных изменений и гистологического поражения костного мозга;
- Исследования Mussolin et al¹, 2005 г: обнаружение NPM-ALK у детей методом ПЦР (МДБ) имеет прогностическое значение;
- Бессобытийная выживаемость: 100% у МДБ-негативных пациентов (1) в сравнении с 41% у МДБ-позитивных (2).



АККЛ: Детекция минимальной диссеминированной болезни

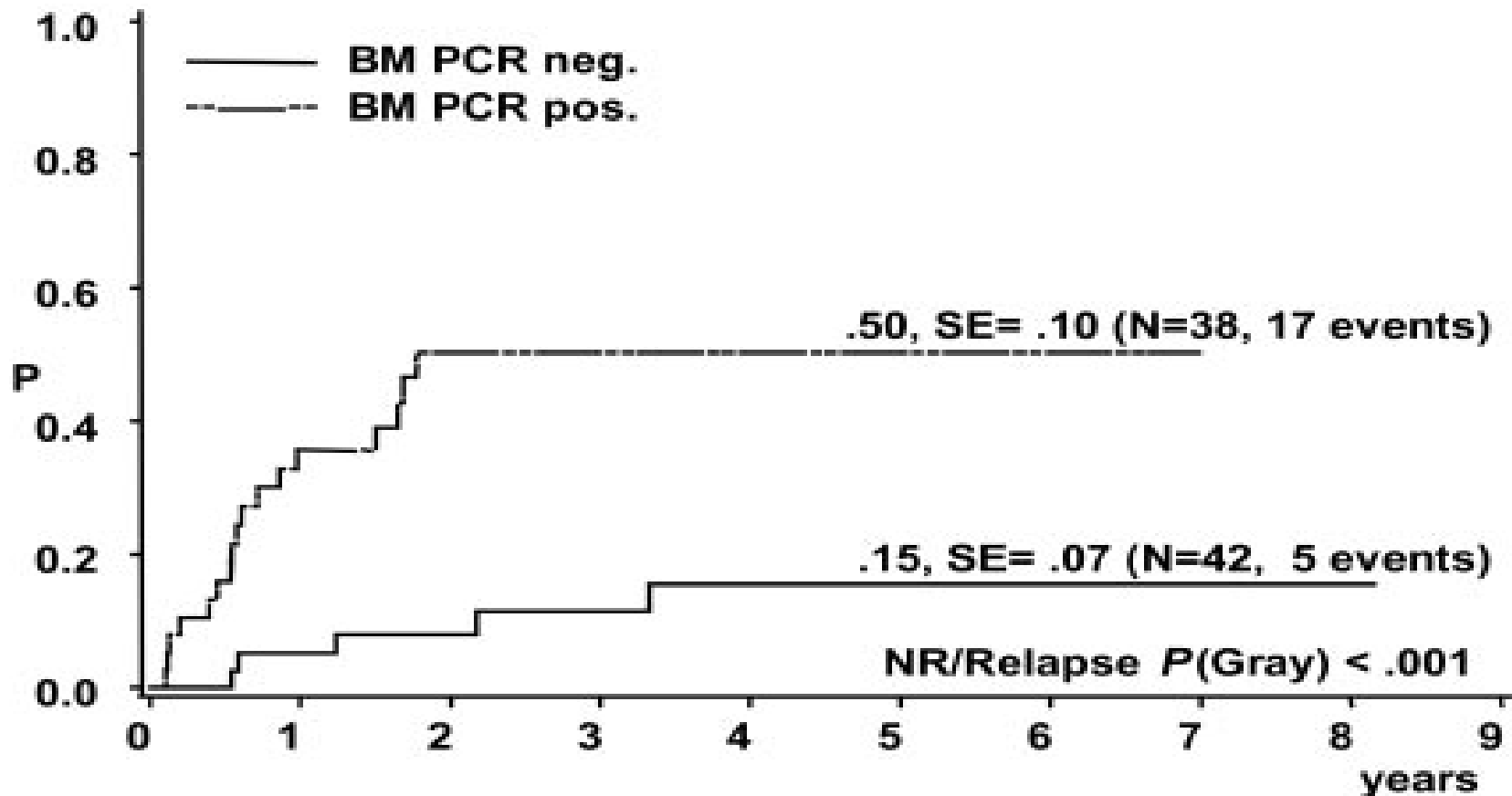
Christine Damm-Welk с соавторами (2008 г)¹: 220 детей (ср.возраст 12 лет), протокол лечения “NHL BFM 95” и “ALCL 99”

	Кол-во пациентов ¹	МДБ-	МДБ+
Общее число пациентов	80	42 (53%)	38(47%)
Кожа			
Да	14	7(50%)	7(50%)
Нет	66	35(53%)	31(47%)
Средостение			
Да	39	13(33%)	26(67%)
Нет	41	29(71%)	12(29%)
ЦНС			
Да	4	1(25%)	3(75%)
Нет	76	41(54%)	35(46%)
Костный мозг			
Да	8	0	8(100%)
нет	72	42(58%)	30(42%)
Стадия			
I	8	8(100%)	0(0)
II	14	12(86%)	2(14%)
III	48	21(44%)	27(56%)
IV	10	1(10%)	9(90%)

1. C.Damm-Welk K.Busch B.Burkhardt. Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Blood,2008

АККЛ: Детекция минимальной диссеминированной болезни

У пациентов с **NPM-ALK+** к/м риск развития рецидива был существенно выше в сравнении с **NPM-ALK-**: $50\% \pm 10\%$ и $15\% \pm 7\%$ соответственно.



Детекция МДБ при АККЛ

- Молекулярное исследование выполнено у 21 больного (64 биологических образца);
- В дебюте заболевания образцы исследовались на обнаружение химерных транскриптов: *NPM-ALK*, *AT1C-ALK*, *TPM4-ALK*, *TPM3-ALK*, *CTCL-ALK*, *SEC31A-ALK*, *MYH9-ALK*, *MSN-ALK*, *ALO17-ALK*;
- При детекции МДБ производился мониторинг минимальной резидуальной болезни по этапам терапии:
 - после 2 и 6 курсов ХТ
 - после окончания лечения – каждые 3 мес в течение 1 года
 - каждые 6 мес в течение 2 года наблюдения

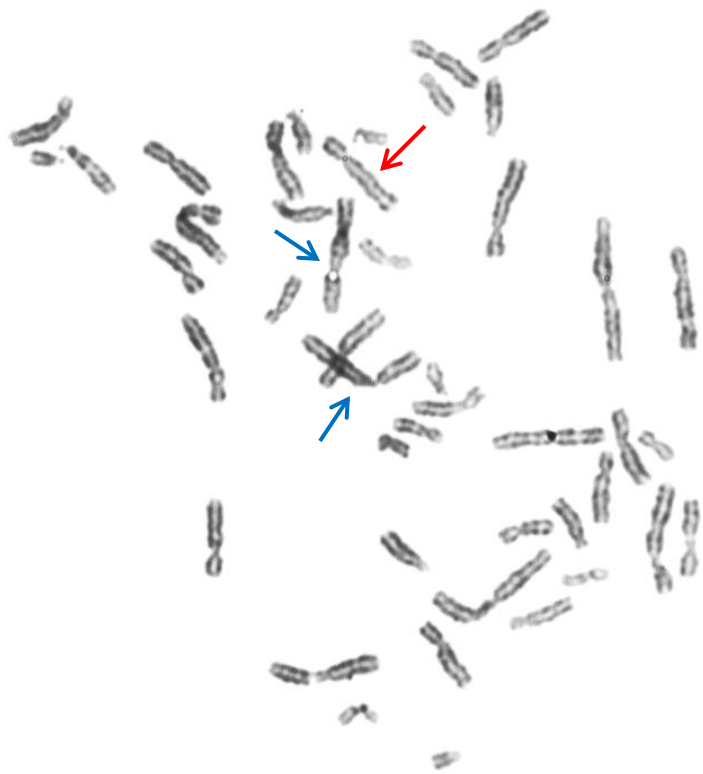
Л.Г. Горенкова, С.К. Кравченко, А.В. Мисюрин и др. 2012 Гематология и трансфузиология, №3, стр. 43. Материалы Конгресса гематологов России 2-4 июля 2012 г., Москва

Liliya Gorenkova, Sergey K Kravchenko, MD, Yulia Vinogradova, Ekaterina Ilyushkina, Andrey Misurin and Valery G Savchenko. #1622, ASH 2011

Детекция МДБ при АККЛ

№ пациента	материал	Химерный ген	Относительный уровень экспрессии (ген/ABLx100%) до лечения	После 2 курса ХТ	После 6 курса ХТ	Период наблюдения (от 10 до 28 мес)
Пациент №1	кровь	NPM-ALK	0,03%	0%	0%	0%
Пациент №2	кровь	ATIC-ALK	7,43%	0,01%	0%	0%
	к/м		11,03%	0,01%	0%	
Пациент №3	кровь	NPM-ALK	20,88%	0,33%	0%	0%
	к/м		24,03%	1,23%	0%	
Пациент №4	кровь	NPM-ALK	Отсутствовал материал	Отсутствовал материал	Отсутствовал материал	1,12%

Лимфома АККЛ, NPM1-ALK-позитивная



46,XX,t(2;8)

--- der(8)

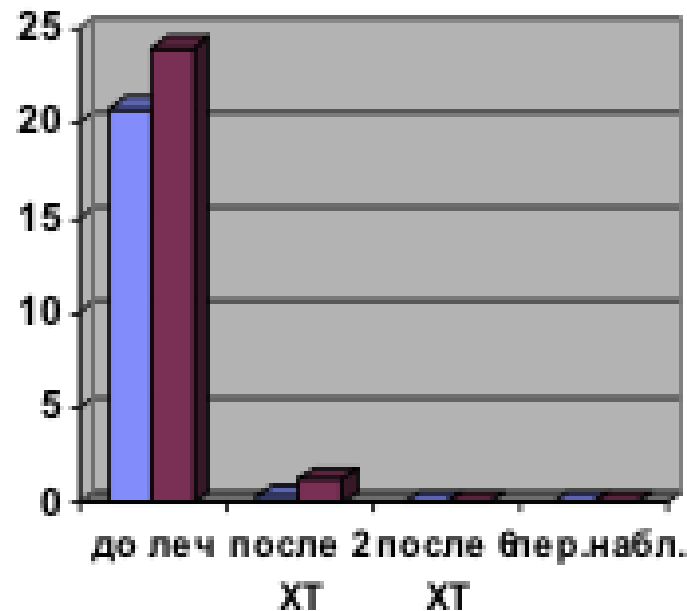
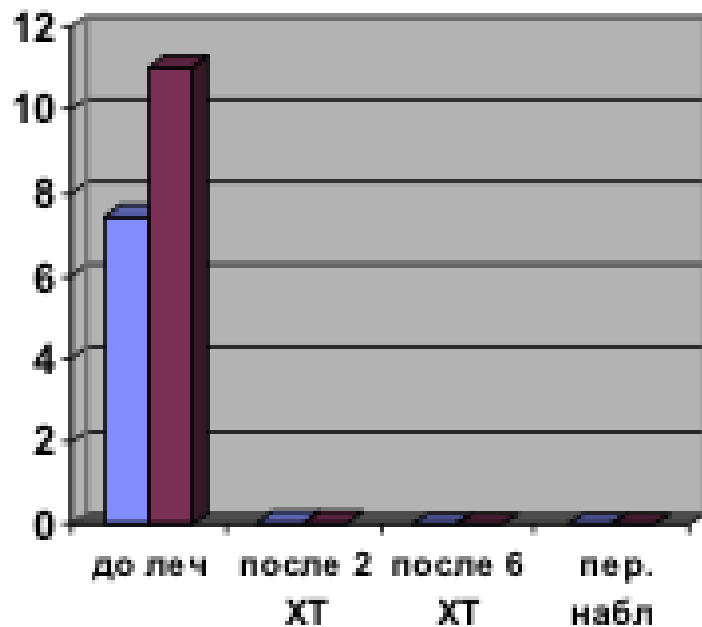
--- 2, der(2)



46,XX,t(2;5)

--- der(5)

Детекция МДБ при АККЛ: клиренс опухолевого клона по этапам лечения

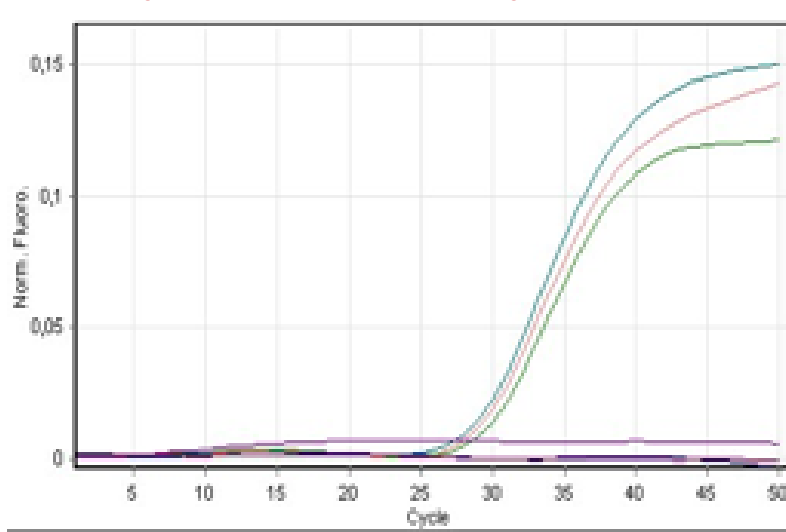
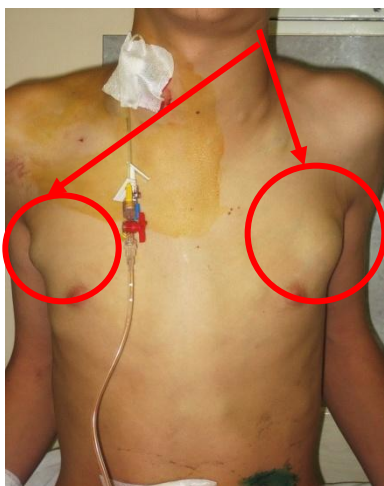
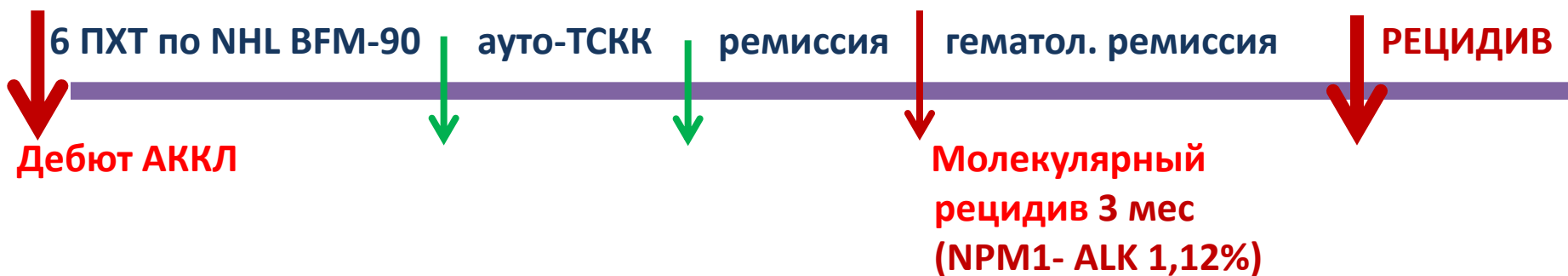


АККЛ: анализ рецидива

Пациент N, 17 лет.

Объем поражения - гепатоспленомегалия, периферическая, абдоминальная лимфоаденопатия, множественные подкожные образования

При гистологическом и ИГХ исследовании поражение к/м не выявлено



Ответ на лечение бортезомибом множественной миеломы и экспрессия генов PRAME и XIAP

Результат терапии бортезомибом	Ген	До назначения медиана %	После назначения бортезомиба медиана %
ПР + ЧР (n=6)	PRAME XIAP	0,04 (0,02–5) 66 (11–325)	0,05 (0,02–2,7) 20 (1–123)
Минимальный ответ (n=4)	PRAME XIAP	8,5 (0,001–14) 36,5 (16–127)	24,8 (4,7–45) 121 (22–528)

Т.В.Гапонова, Л.П.Менделеева, А.В.Мисюрин, Е.Ю.Варламова, В.Г.Савченко.
Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой//Онкогематология. -2009.- №2.-С. 52-57.

Заключение

- Молекулярно-биологические и цитогенетические методы применяются для установления диагноза НХЛ, с целью определения клинического прогноза, а также для мониторинга минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни.
- В качестве анализируемого биологического материала для молекулярной диагностики используют биоптаты пораженных лимфоузлов, костный мозг и периферическую кровь, взятые с применением ЭДТА или цитрата, а также архивный материал в виде парафиновых блоков, содержащих фиксированную опухолевую ткань.
- Молекулярными маркерами, которые при этом определяют, являются области слияния ДНК хромосом, вовлечённые в характерные для НХЛ хромосомные абберации, гиперэкспрессия генов, являющаяся результатом этих аббераций, экспрессия некоторых химерных онкогенов, моноклональные перестройки генов Ig и TCR, мутации некоторых генов, а также изменения на уровне целого клеточного генома, проявляющиеся в виде особенностей профиля экспрессии множества генов, нехваток либо приобретений отдельных генетических локусов.

Мисюрин Андрей Витальевич

and@genetechnology.ru

+7 499 530 01 95