

**A HAJAS SEJTES LEUKÉMIA IMMUNFENOTÍPUS
MARKER ANALÍZISE PARAFFINBA ÁGYAZOTT
CSONTVELŐ BIOPSZIÁS MINTÁKON**

Értekezés tézisei

Dr. Tóth-Lipták Judit

Témavezető: Dr. Krenács László PhD, DSc

Daganatpatológiai és Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium,

Szeged

2014

Bevezetés

A hajas sejtes leukémia (HSL) egy ritka indolens B-sejtes limfoproliferáció, melyet klinikailag pánцитopénia, szplenomegália, illetve a perifériás vérben keringő nyúlványos felszínű sejtek jelenléte jellemez. Az összes non-Hodgkin limfóma 2%-át adó betegség elsősorban csontvelő, illetve lépérintettséggel jár. Flow citometriás vizsgálattal a daganatsejtek jellegzetes immunfenotípust mutatnak: CD19/CD20/CD22/CD11c/CD25/CD103/CD123⁺. Egyes más egyéb indolens B-sejt limfómák, úgymint a hajas sejtes leukémia variáns (HSL-v), a szplenikus diffúz vörös pulpa limfóma (SDVPL), illetve a szplenikus marginális zóna limfóma (SMZL) klinikailag, illetve morfológiailag hasonló képet mutathatnak, de ez utóbbiak terápiaja merőben eltér a hajas sejtes leukémiáétól.

Tekintve, hogy a perifériás vérben a keringő daganatsejtek alacsony számban vannak jelen, illetve, hogy a betegséget kísérő fibrózis a csontvelő aspirációt gyakran eredménytelenné teszi, biztos diagnózist legtöbbször csak a csontvelő biopsziás vizsgálat nyújthat. Az irodalomban számos, a hajas sejtes leukémia diagnosztikájában alkalmazható, fixált és paraffinba ágyazott mintákon is működő antitest került már leírásra. Ezek között említhető a DBA.44, anti-tartarát-rezisztens savanyú foszfátáz (TRAP) antitest, cyclin D1, CD11c, T-bet, annexin A1 (ANXA1), BRAF V600E mutáció-specifikus antitest, anti-foszfo-ERK1/2 (pERK) és a CD103 antitest is.

Célkitűzések

- I.** A Hector Battifora mesothelial epitope-1 (HBME-1) monoklonális antitest alkalmazhatósága a HSL diagnosztikájában és differenciál diagnosztikájában.
- II.** A jelenleg elérhető, paraffinos metszeteken is hatékonyan publikált HSL markerek (CD11c, CD25, CD68, CD103, CD123, CD200, ANXA1, cyclin D1, DBA.44, HBME-1, pERK, TRAP, és T-bet) összehasonlítása, diagnosztikai alkalmazhatóságának átfogó elemzése.
- III.** Egy olyan immunhisztokémiai panel felállítása, mellyel a HSL és egyéb villózus, illetve nem villózus kis B-sejtes lymphomák nagy biztonsággal elkülöníthetők egymástól rutin paraffinos mintákon is.

Anyag és Módszer

A vizsgálatokhoz a Daganatpatológiai és Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumban (Szeged) feldolgozott mintákat elemeztünk. Első tanulmányunkban nem daganatos és daganatos mintákat vizsgáltunk. Reaktív csontvelő (n=15), nyirokcsomó (n=12), lép (n=13), tonsilla (n=7) és gyomor biopsziás minták mellett 427 malignus limfoproliferációt tartalmazó anyagot is értékeltünk. Ez utóbbi tartalmazott HSL (n=72), HSL-v (n=13), SDVPL (n=8), SMZL (n=59), szplenikus B-sejtes limfóma (SBSL) (n=37), nodalis (n=30) és extranodális (n=21) MZL, egyéb B-sejt limfóma (n=164), klasszikus Hodgkin limfóma (n=5), és T-sejt limfóma (n=18) eseteket is.

A HSL markerek összehasonlító vizsgálatához 73 esetet vizsgáltunk. Ezekben vegyesen voltak HSL (n=32), HSL-v (n=4), SDVPL (n=2), SMZL (n=8), SBCL (n=3), B-sejtes krónikus limfoid leukémia (B-CLL) (n=11), limfoplazmocitás limfóma/Waldenström makroglobulinémia (LPL/WM) (n=3), illetve köpenysejtes limfóma (KSL) (n=10) esetek is.

A csontvelő biopsziás mintákat 12-24 óráig Schaffer fixálóban rögzítettük. Dekalcinálásuk 12,5%(w/v)-os EDTA oldatban történt (pH=7,0). A mintákat ezután paraffinba ágyasztuk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz nagyrészt tissue microarray technikával előállított metszeteket használtunk. A 2-3 µm vastagságú metszeteket deparaffinálás és etanollal történő endogén peroxidáz gátlás után a megfelelő antigén feltáró oldatokkal hőkezeltük, majd fehérje blokkolást végeztünk. A vizsgálni kívánt primer antitestekkel (CD20, DBA.44, Annexin A1, Cyclin D1, CD11c, CD25, TRAP, HBME-1, CD103, pERK, T-bet, CD123, CD68, CD200) történő 70 perces inkubálás után a megfelelő szekunder antitest következett, majd a detektálást Novolink polymer kittel végeztük. Magfestésre Mayer hematoxylint használtunk.

A HBME-1 antitest vizsgálatához a HSL, HSL-v, SDVPL, SMZL és SBCL esetekben a festődési mintázatot a CD20 antitesttel párhuzamosan értékeltük ki, és összehasonlítottuk azokat a DBA.44 markerével. A látott kép alapján meghatároztuk a HBME-1, illetve a DBA.44 specificitását, szenzitivitását és pontosságát.

Eredmények

HBME-1 a nem daganatos mintákban

Valamennyi nem daganatos mintában, bár alacsony számban, de konzekvensen jelen voltak szinuszoidálisan és periszinuszoidálisan elhelyezkedő, villózus membránnal bíró HBME-1⁺ limfociták.

A HBME-1 és a DBA.44 antitestek festődési mintázata nagyrészt átfedést mutatott, bár erős köpenyzóna pozitívitas csak DBA.44-gyel volt megfigyelhető. A villózus felszínű limfocitákon kívül csak néhány nem limfoid sejt (bizonyos folliculáris dendriticus sejtesoport, valamint kevés extrafollicularis, illetve kordalis retikuláris sejt) mutatott HBME-1-gyel gyenge festődést.

Multikolor immunfluoreszcenciás festéssel a HBME-1⁺ limfociták CD20⁺/CD79a⁺/IgM⁺/CD35⁻/CD3⁻ B-sejt fenotípusúak voltak mind a nyirokcsomóból, mind a lépből származó mintákon. Emellett a szplenikus HBME-1⁺ B limfociták parciális IgD pozitívitas is megfigyelhető volt. A nem limfoid vonalhoz tartozó sejteket tekintve, a HBME-1 néhány CD68⁺ kordalis hisztiocitát, valamint gyengén és változó mértékben CD35⁺ folliculáris dendriticus sejtet festett.

HBME-1 a daganatos mintákban

A HBME-1 kizárólag a B-sejt vonalhoz tartozó lymphoproliferációkat jelölte.

Csaknem az összes HSL eset (69/72; 95.8%) HBME-1 pozitívnak bizonyult, mely eredmény megfelelt a DBA.44-gyel megfigyeltekének (70/72; 97.2%). A pozitív daganatos sejtek arányában lényegi eltérés nem volt a két antitest között.

Az egyéb szplenikus limfómákat tekintve HBME-1 pozitívitas 5/13 (38.5%) HSL-v, 4/8 (50%) SDVPL, 7/59 (11.9%) SMZL, és 7/37 (18.9%) SBCL esetben láttunk. Gyenge és fokális pozitívitas volt megfigyelhető az SMZL és SBCL mintákon. DBA.44-gyel magasabb pozitívitas láttunk valamennyi szplenikus limfómában, 11/13 (84.6%) HSL-v, 5/8 (62.5%) SDVPL, 18/57 (30.5%) SMZL, és 12/37 (32.4%) SBCL arány volt megfigyelhető.

A nem szplenikus eredetű MZL esetek hasonló HBME-1 pozitívitas arányt mutattak a SMZL esetekkel (6/51; 11.8%), melyekben a DBA.44 szintén magasabb festődési aránya volt megfigyelhető (2/11; 18.2%). A nodális és extranodális marginális zóna limfóma esetek 13.3% (4/30), illetve 9.5% (2/21) HBME-1 pozitívitas mutattak. Az egyéb B-sejtes limfómák közül mindössze 3/21 (14.3%) folliculáris limfóma (FL), 2/33 (6.1%) KSL, és 1/41 (2.4%)

diffúz nagy B-sejt limfóma (DNBSL) (valószínűleg transzformálódott MZL) volt HBME-1 pozitív.

Néhány elszórt reaktív limfocitától és retikuláris sejttől eltekintve a T-sejt limfómás, illetve Hodgkin limfómás esetek negatívnak bizonyultak HBME-1-gyel.

A HSL diagnózisában használt markerek összehasonlító elemzése

A legtöbb vizsgált marker erős reakciót mutatott a HSL esetekben. Azok a markerek, melyek membránban mutattak pozitívítást, kiemelték a daganatsejtek „hajas” jellegét is.

A csontvelő érintettség mértékének megbecsléséhez CD20 festést használtunk.

Az ANXA1 antitest a HSL esetekben 100%-ban pozitívnak bizonyult, és nem festette a nem HSL eseteket, ám a metszetek kiértékelését nehezítette a csontvelői mintákban a granulocita vonal pozitívítása.

A pERK antitest is hasonló jó eredményeket hozott, a festések pozitív endogén kontrolljaként néhány nem daganatos mezenhímális sejt szolgált.

A CD11c és CD103 markerek 100% szenzitivitást mutattak könnyen értékelhető membránfestődés mellett. Azonban a HSL esetek mellett HSL-v, SDVPL, ill. B-CLL eseteket is jelöltek.

A CD25 antitest az összes HSL esetben membranózus pozitívítást hozott, és nem festette a HSL-v, SDVPL, SMZL, és SBCL mintákat. Ellenben a B-CLL és KSL esetek felében pozitívnak bizonyult.

HBME-1-gyel valamennyi HSL eset pozitívnak látszott, mellyel a sejtek villózus jellege is vizualizálható volt. Emellett azonban 2/4 HSL-v, 1/8 SMZL, és 2/2 SDVPL eset is jelölődött.

A cyclin D1 antitest könnyen kiértékelhető magpozitivitást mutatott a HSL-sejteken, illetve valamennyi KSL esetben.

A CD68/KP1, CD200, T-bet, és az anti-TRAP markerek valamennyi HSL esetben pozitívítást mutattak, azonban specificitásuk rendkívül alacsony volt, és a CD68 a csontvelői makrofág illetve mieloid sejteket is festette.

Egy kivétellel valamennyi HSL minta pozitívnak bizonyult DBA.44-gyel, ám ez a marker is festett számos HSL-v, SDVPL, SMZL, és SBCL esetet is.

A legalacsonyabb szenzitivitást a CD123 antitest mutatta.

Összefoglalás

A HBME-1 antitest egy, a mezotél sejtek membránján elhelyezkedő ismeretlen biokémiájú antigénnel reagál kiemelve a sejtek mikrovillózus megjelenését, ún. vastag membrán jelleggel. Az általános patológiai diagnosztikában is széleskörűen használt ez a marker, számos epiteliális és mezenhímális eredetű tumorban pozitivitást mutat.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy nem daganatos nyirokcsomóból, tonsillából, csontvelőből, illetve lépből származó mintákon alacsony számban, de konzekvensen jelen vannak HBME-1-pozitív limfociták. A multikolor immunfluoreszcenciás festéssel végzett konfokális mikroszkópiás vizsgálataink megerősítették ezen limfociták B-sejtes eredetét.

A daganatos mintákon végzett további vizsgálataink kimutatták, hogy HBME-1 pozitivitás kizárólag B-sejt eredetű daganatokban fordul elő, azok közül is olyan betegségekben, ahol a tumor sejtek villózus megjelenéssel bírnak. A HBME-1 szenzitivitásával és specificitásával megközelítette, illetve meg is haladta a DBA.44-gyel kapott eredményeket.

Mivel terápiája merőben eltér egyéb indolens B-sejtes lymphomákétól, ezért a HSL-t igen fontos elkülöníteni a szintén lép és csontvelői érintettséggel járó HSL-v, SDVPL, és SMZL esetektől. Ennek érdekében második tanulmányunkban azt kívántuk megvizsgálni, hogy az összes eddig publikált antitest közül melyek azok, melyek a HSL diagnosztikájában valóban hasznos antitest panel részét képezhetik paraffinos metszeteken is.

Irodalmi adatok alapján a génexpressziós profil vizsgálattal előállított ANXA1 antitest 100%-os specificitással és szenzitivitással bír a HSL eseteknél, melyet a mi vizsgálataink is megerősítettek. Mindazonáltal ez a marker ugyanolyan erősséggel festette a csontvelői granulocita vonal sejtjeit is, mint a HSL-sejteket, ezzel jelentősen megnehezítve e minták kiértékelését, és szükségessé téve egyéb markerek egyidejű alkalmazását.

Újabban kimutatták, hogy a HSL háttérében is a BRAF-V600E mutáció áll, melynek kimutatásában már egy új, mutáció specifikus antitest is rendelkezésre áll. Ezen markert azért nem vizsgáltuk, mert meglehetősen magas ára miatt igen kevés immunhisztokémiai laborban áll csak rendelkezésre. A mutáció eredményeként a konstitutívan aktívvá váló BRAF foszforilálja a MEK és ERK kinázokat, és a pERK fehérje jelenléte a sejtben immunhisztokémiai módszerekkel is detektálható. Eredményeink megerősítették, hogy a pERK antitest 100% szenzitivitású a HSL esetekre vonatkozóan, és egy kivétellel valamennyi nem-HSL esetben negatívnak bizonyult. Alacsony tumorsejt tömeg mellett

azonban zavaró lehet a minták kiértékelésénél, hogy az aktivált csontvelői mezenhímális sejtek is pozitivitást mutatnak.

Flow citometriás vizsgálatoknál már régóta használatos a CD103 antitest a HSL diagnosztikájában. Eddig azonban nem állt rendelkezésre paraffinos mintákon is megbízhatóan működő antitest. Egy új, paraffinos metszeteken való alkalmazásra tervezett monoklonális antitesttel végzett vizsgálatunk azonban megerősítette, hogy ez a marker a HSL-sejtek kimutatásában 100%-ban szenzitív, bár a HSL-v esetektől nem tudta őket hatékonyan elkülöníteni.

Vizsgálataink során a CD11c antitest 100% szenzitivitást mutatott HSL esetekben és csak 1 HSL-v, illetve SDVPL mintát, valamint 3 B-CLL-t jelölt ezen kívül.

A flow citometriában a CD25 antitestet eddig is kiterjedten használták a HSL diagnózisában. Paraffinos mintákon azonban eddig nem közöltek eredményeket az általunk használt CD25/4C9 markerrel. A csontvelő biopsziás mintákon végzett vizsgálataink alapján úgy találtuk, hogy a HSL vonatkozásában szenzitivitása igen magas, és alkalmas a betegség HSL-v-től, SMZL-től, SDVPL-től, illetve SBCL-től való elkülönítésére. Az irodalmi adatoknak megfelelően azonban ez a marker a CLL-es és KSL-es esetek felében is pozitivitást mutatott, ezen kívül aktivált B és T-sejteket is jelölt, mely tulajdonsága zavaró lehet a minimális reziduális betegség csontvelői megítélésénél.

A HBME-1 antitest a CD103 markerével azonos eredményeket hozott, mely megerősítette, hogy használható a HSL diagnosztikájában. Mindamellet az időnként inhomogén és részleges pozitivitas, melyet tapasztaltunk alacsony tumorsejt tartalomnál zavaró lehet.

A cyclin D1 expressziója KSL-ben régóta jól ismert, ám publikálták már a HSL-sejtek pozitivitasát is ezzel a markerrel, bár expressziója HSL-ben nincs összefüggésben a BCL-1 lokusz átrendeződésével. Az irodalmi adatoknak megfelelően a cyclin D1 HSL eseteknél is nagy specificitással és szenzitivitással bír. A magfestődés intenzitása azonban változó, így alacsony csontvelői tumorsejt tartalomnál az infiltrátum azonosítása nehézkes lehet.

A CD68/KP1 antitest egy széles körben használt monocita/makrofág marker. Bár a HSL diagnosztikájában ritkán használják, de irodalmi adatok vannak arra, hogy pozitív HSL-sejtekben is. Vizsgálatunkban 100%-ban szenzitivnek bizonyult a HSL esetekben, azonban számos egyéb indolens limfómában, a makrofágokban és a mieloid sejtekben is pozitivitas mutatott, mely alapján a HSL rutin diagnosztikájában kevésbé használható.

A DBA.44 antitest egy fixáció-rezisztens B-sejt differenciációs antigént jelöl, és HSL-ben ismert az expressziója. Hosszú ideig a DBA.44-et tartották a standard festésnek a HSL immunhisztokémiai diagnózisában. Megfigyeléseink alapján ez a marker nem tud hatékonyan különbséget tenni a HSL és egyéb szplénikus limfómák között. Ezen kívül reaktív állapotokban is megfigyelhetők elszórtan DBA-44 pozitív, nem daganatos limfociták, mely alapján reziduális tumor sejtek azonosítására szintén nem alkalmas. Azonban valamennyi B-CLL, LPL/WM és KSL eset konzekvensen negatívnak bizonyult.

Irodalmi adatok alapján a TRAP antitestet a HSL meglehetősen szenzitív markerének tartják, főleg DBA.44 festéssel kombinálva. Eredményeink alapján valóban az összes HSL esetben pozitívnak bizonyult, azonban szinte valamennyi egyéb B-sejt limfómát is jelölte, így valódi diagnosztikus értéke meglehetősen alacsony.

A T-bet, egy T-sejt asszociált transzkripció faktor expressziója HSL-sejtekben jól ismert jelenség, és a minimális reziduális betegség azonosításában is megfelelő markernek gondolják. Vizsgálatunkban a T-bet valamennyi HSL esetben pozitívnak bizonyult, de jelölte csaknem az összes B-sejtes limfómát, és a mintákban jelenlévő reaktív T-sejteket is. Követéses csontvelő biopsziák értékelésében azonban hasznos lehet, hogy a HSL-sejtekben erős mag pozitivitást mutat.

A CD200 (OX-2) irodalmi adatok alapján konzekvensen expresszálódik a HSL-sejteken, azonban egyéb B-sejt eredetű daganatokban is. Vizsgálataink alapján valóban az összes HSL esetet jelölte, de ezen kívül pozitívnak bizonyult az egyéb indolens limfómák többségében is. Azonban megfigyeléseink alapján elég hatékonynak bizonyult a B-CLL és KSL esetek elkülönítésében.

Szintén a flow citometriában használták eddig a CD123 markert. Bár publikáltak adatokat több olyan antitestről is, mely paraffinos blokkokon is működik, mi egyik elérhető antitesttel sem tapasztaltunk kielégítő szenzitivitást a HSL eseteken. Vizsgálatainkat 2 ismert CD123 antitest keverékével végeztük, azonban még így is ez a marker mutatta a legalacsonyabb szenzitivitást mind közül a HSL mintákon.

Fentiek alapján a legnagyobb diagnosztikai kihívást a paraffinba ágyazott csontvelő mintákon az alacsony sejtszámú infiltrátum detektálása jelenti. A legspecifikusabbnak tartott HSL marker, az ANXA1 kereszt reaktivitást mutat a granulocita vonal sejteivel, a pERK, a CD11c, a CD25, a HBME-1, a CD68/KP1, a DBA-44, a T-bet, CD200, és a TRAP antitestek

nem daganatos csontvelői elemekben észlelt pozitivitása szintén nehézkessé teszi a minimális tumorsejt tartalom felismerését. A HBME-1, cyclin D1, és CD123 antitesteknél észlelt inhomogén festődési mintázat szintén korlátozhatja ezen antitestek diagnosztikus értékét. Figyelembe véve a festődési mintázatot, és az intenzitást is a CD20 antitest CD103-mal, illetve T-bet-tel kombinálva, kettős jelölést alkalmazva tűnik a legígéretesebbnek követéses biopsziáknál, illetve minimális infiltrátum azonosításánál, ám ezek további vizsgálata még folyamatban van.

Összegezve, eredményeink megerősítették az ANXA1 és pERK antitestek magas szenzitivitását és specificitását, illetve az olyan standard HSL markerek, mint a CD11c, CD25, és a CD103 paraffinos blokkokon való alkalmazhatóságát. A HSL differenciál diagnosztikájában szintén hasznos markernek bizonyultak a HBME-1, cyclin D1, CD200, és a T-bet antitestek. Véleményünk szerint a leoptimálisabban ajánlható diagnosztikus panelnek HSL gyanús paraffinos csontvelő biopsziás minták esetén tartalmaznia kell a CD20, ANXA1, pERK, CD103, és HBME-1 antitesteket.

Eredeti megfigyelések

1. Tanulmányom az első, mely a HBME-1 monoklonális antitest hematopatológiai diagnosztikában történő alkalmazhatóságával foglalkozik.
2. Kimutattam, hogy a HBME-1 pozitivitást mutat bizonyos, villózus felszínnel bíró nem daganatos és daganatos limphoid sejteken.
3. Multikolor immunfluoreszcenciás festés segítségével munkatársaimmal kimutattam, hogy ezen HBME-1 pozitív villózus limfociták a B-sejt vonalhoz tartoznak.
4. Elsőként bebizonyítottam, hogy a HBME-1 hasznosítható HSL markerként és megbízhatóbb, mint a betegségre kevésbé specifikus DBA.44.
5. Egy kivételével valamennyi elérhető HSL marker specificitását, szenzitivitását és pontosságát megvizsgáltam. Tudomásom szerint ezidáig ez a legátfogóbb immunhisztokémiai vizsgálat, melyet HSL vonatkozásában készítettek.
6. Elsőként használtam a CD25/4C9 antitestet a HSL differenciál diagnosztikájában. Eredményeim alapján a CD25/4C9 a HSL igen szenzitív markere, és képes azt elkülöníteni egyéb kis B-sejtes limfómáktól, HSL-v-től, SMZL-től, SDVPL-től valamint SBSL-től is paraffinos csontvelő biopszias mintákon.
7. Bebizonyítottam, hogy a flow citometriában rutinszerűen használt CD25, CD11c és CD103 antitestek megbízhatóan működnek formalin fixált, paraffinban ágyazott szövetmintákon is.
8. Összeállítottam egy olyan optimális antitest panelt HSL gyanús paraffinos mintákra, mely magas szenzitivitású, specificitású és elfogadható költségvonzattal járó markerekből áll (CD20, ANXA1, pERK, CD103, és HBME-1).

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Krenács Lászlónak szeretném megköszönni a lehetőséget, hogy laborjában végezhettem a munkámat, illetve a napi szinten adott útmutatást és bátorítást, melyet tőle kaptam. Köszönettel tartozom Dr. Bagdi Enikőnek az önzetlen segítségért, melyet munkám során nyújtott. Köszönetemet fejezem ki Dudás Ágnesnek a hibátlanul szép immunhisztokémiai reakciókért. Munkámat édesanyámnak és lányaimnak ajánlom, akik mindig átsegítettek a nehéz pillanatokon.

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

I. Krenács L, Tóth-Lipták J, Demeter J, Piukovics K, Borbényi Z, Gogolák P, Sári E, Bagdi E (2013) Monoclonal antibody HBME-1 reacts with a minor subset of B cells with villous surface and can be useful in the diagnosis of hairy cell leukemia and other indolent lymphoproliferations of villous B lymphocytes. *Virchows Arch.* 463:787-794. doi: 10.1007/s00428-013-1490-52013

II. Tóth-Lipták J, Piukovics K, Borbényi Z, Demeter J, Bagdi E, Krenács L (2014) A Comprehensive Immunophenotypic Marker Analysis of Hairy Cell Leukemia in Paraffin-Embedded Bone Marrow Trepine Biopsies - A Tissue Microarray Study. *Pathol Oncol Res.* Jun 6. [Epub ahead of print]