Κλασική και μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση χρόνιων Β λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων

Αναστασία Αθανασιάδου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα τελευταία 40 χρόνια η κλασική κυτταρογενετική και η μοριακή κυτταρογενετική μελέτη ανέδειξαν μεγάλο αριθμό μη τυχαίων χρωμοσωμικών ανωμαλίων σε ασθενείς με χρόνια Β λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα. Η χρήση νέων μιτογόνων αύξησε τη δυνατότητα επίτευξης μεταφάσεων και ανίχνευσης του παθολογικού κλώνου. Η ανίχνευση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών βοηθά στην επιβεβαίωση της διάγνωσης μαζί με τη μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο, τα κλινικά χαρακτηριστικά και τους μοριακούς δείκτες της νόσου. Από την κυτταρογενετική μελέτη των χρόνιων Β λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων φάνηκε ότι η παρουσία εξελικτικών κλώνων και η πολυπλοκότητα του καρυοτύπου συσχετίζονται με επιθετικότερη πορεία νόσου. Σήμερα, η κυτταρογενετική μελέτη ασθενών με ΧΛΛ κατευθύνει τη θεραπευτική αντιμετώπιση: ιδιαίτερα η ανίχνευση της έλλειψης 17p θεωρείται ανεξάρτητος κακός προγνωστικός παράγοντας που χαρακτηρίζει μια ομάδα ασθενών με φτωχή απάντηση στη φλουνταραμπίνη και το Rituximab. Συμπερασματικά, η κλασική κυτταρογενετική και η μοριακή κυτταρογενετική βοηθούν στη διαστρωμάτωση των ασθενών και στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών.

Haema 2013; 4(2): 128-134 Copyright ΕΑΕ

Εισαγωγή

Τα χρόνια Β λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα είναι ετερογενής ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται συνήθως από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και συσσώρευση στο μυελό και στο αίμα κυττάρων της λεμφικής σειράς, σχετικά ώριμων. Παρότι ανήκουν στα χαμηλού βαθμού κακοήθειας νοσήματα και η φυσική πορεία της νόσου διαρκεί πολλά χρόνια, κάποιοι υπότυποι παρουσιάζουν επιθετική κλινική πορεία και συσχετίζονται με κακή πρόγνωση[1].

Ο αριθμός των χρόνιων Β λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων που διερευνήθηκε με κυτταρογενετική μελέτη έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Η δυσκολία που υπήρχε στην κυτταρογενετική μελέτη των νοσημάτων αυτών οφειλόταν κυρίως στο χαμηλό μιτωτικό δείκτη των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και στη μικρή απαντητική ικανότητα τους σε μιτογόνα. Αρχικά, το πιο διαδεδομένο μιτογόνο ήταν η φυτοαιμοσυγκολλητινίνη (PHA) η οποία προάγει κυρίως τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων. Η χρήση νέων μιτογόνων (Epstein-Barr virus, lipopolysaccharide από E. coli, protein A, phorbol ester TPA) που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων συνέβαλε καθοριστικά στην ανεύρεση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ασθενείς με χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα[2]. Η προσθήκη στις καλλιέργειες των Β νεοπλασματικών κυττάρων του συνδυασμού της ιντερλευκίνης-2 με τη φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) φάνηκε ότι αυξάνει σημαντικά την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και τη δυνατότητα ανίχνευσης κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών[3]. Το 2005 βρέθηκε ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα των περισσοτέρων κακοηθειών Β κυτταρικής προέλευσης, με εξαίρεση το πλασμοκύττωμα, απαντούν στη διέγερση με CpG ολιγονουκλεοτίδια με αύξηση της έκφρασης συνδιεγερτικών, αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων και του CD20 και αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κακοήθων κυττάρων[4,5]. Η χρήση της ιντερλευκίνης-2 σε συνδυασμό με CpG ολιγονουκλεοτίδια DSP30 βελτίωσε περαιτέρω τη δυνατότητα επίτευξης μεταφάσεων και κατάδειξης του παθολογικού κλώνου.

Η ανάπτυξη μεθόδων μοριακής κυτταρογενετικής όπως ο in situ υβριδισμός με φθορίζουσες χρωστικές (FISH),

Αιματολογική Κλινική και Μ.Μ.Μ.Ο., Γ.Π.Ν. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

Διεύθυνση αλληλογραφίας: Α. Αθανασιάδου, e-mail: anastasiaathanas@yahoo.gr

ο συγκριτικός υβριδισμός του γονιδιώματος (CGH) και ο συγκριτικός υβριδισμός του γονιδιώματος με μικροσυστοιχίες (CGH-microarray) προσέφερε τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης των χρόνιων λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων επειδή δεν απαιτούν την ύπαρξη μεταφάσεων και έχουν καλύτερη διακριτική ικανότητα για την ανίχνευση χρωμοσωμικών μικροαλλαγών (<4Mb). Σε ερευνητικό επίπεδο, προσφέρουν πληροφορίες για την ύπαρξη έλλειψης ή πολλαπλασιασμού γονιδίων, συμβάλλουν στην αναγνώριση νέων χρωμοσωμικών ανωμαλιών και στη μοριακή ανάλυση της χρωμοσωμικής ανωμαλίας. Συμβάλουν επίσης στην κατάδειξη με ακρίβεια της συχνότητας συγκεκριμένων γενετικών βλαβών. Από τις μεθόδους της μοριακής κυτταρογενετικής, πιο διαδεδομένη είναι η μέθοδος FISH. Η συνεχής παραγωγή άμεσα σημασμένων νέων ανιχνευτών, η βελτίωση του φθορίζοντος σήματος και ο συνδυασμός με ειδικό τεχνολογικό εξοπλισμό αύξησαν περαιτέρω την ευαισθησία της μεθόδου και μείωσαν σημαντικά το χρόνο που απαιτείται για την εφαρμογή της. Η μέθοδος FISH εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις όπου η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση δεν ήταν δυνατή λόγω απουσίας μεταφάσεων ή όταν η ποιότητα των μεταφάσεων δεν επιτρέπει την πλήρη κυτταρογενετική μελέτη ή ακόμη όταν απαιτείται περαιτέρω μελέτη, για διευκρίνιση αναδιατάξεων με συμμετοχή τριών ή περισσοτέρων χρωμοσωμάτων αλλά και στα πλαίσια κλινικών μελετών.

Η κλασική κυτταρογενετική και η μοριακή κυτταρογενετική συμβάλλουν στην επιβεβαίωση της διάγνωσης, στην ταξινόμηση και την πρόγνωση των χρόνιων Β λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων.

Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η κυτταρογενετική μελέτη των ασθενών με ΧΛΛ είναι δύσκολη και επίπονη λόγω του χαμηλού μιτωτικού δείκτη των κυττάρων της νόσου, αλλά και επειδή μόνο ένα μέρος του νεοπλασματικού κλώνου εμφανίζει καρυοτυπικές ανωμαλίες. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή των μεταφάσεων που θα αναλυθούν: οι καλής ποιότητας μεταφάσεις συνήθως προέρχονται από λεμφοκύτταρα που δεν ανήκουν στον κλώνο και η ανάλυσή τους δε βοηθά στην ανεύρεση της χρωμοσωμικής βλάβης.

Οι πρώτες κυτταρογενετικές μελέτες των ασθενών με ΧΛΛ ανέφεραν ανεύρεση παθολογικού κλώνου σε ποσοστό 30 - 40%.[1,2,5] Το ποσοστό είναι υψηλότερο σε μελέτες που συμπεριλαμβάνουν ασθενείς προχωρημένων σταδίων νόσου με ανάγκη έναρξης θεραπείας. Συχνότερες ανωμαλίες είναι: t/del(13q), del(11q), +12, 14q+ και del(6q). Στις περισσότερες μελέτες φάνηκε ότι η μέθοδος FISH αυξάνει το ποσοστό των ανιχνεύσιμων χρωμοσωμικών ανωμαλιών επειδή μπορεί να ελέγχει μη διαιρούμενα (μεσοφασικά) κύτταρα. Με τη μέθοδο FISH διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στη ΧΛΛ υπερβαίνει το 80%. Το 2000, οι Doehner και συν. παρουσίασαν τη μεγαλύτερη κυτταρογενετική μελέτη με FISH σε 325 ασθενείς με ΧΛΛ[6]. Χρησιμοποιώντας 8 ανιχνευτές για αναζήτηση ελλείψεων στις περιοχές 6q21, 11q22-23, 13q14, 17p13, τρισωμίας στις περιοχές 3q26, 8q24, 12q13, καθώς και μεταθέσεων στην περιοχή 14q32, ανέφεραν χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε ποσοστό 82% των ασθενών. Σε στατιστική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 5 ομάδες ασθενών: ασθενείς που παρουσίαζαν μόνο έλλειψη 17p13 ή έλλειψη 11q22-23 ή τρισωμία 12 ή φυσιολογικό καρυότυπο ή έλλειψη 13q14 ως μοναδική χρωμοσωμική ανωμαλία. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την πιθανότητα ολικής επιβίωσης σε κάθε ομάδα που ήταν, αντιστοίχως, 32, 79, 114, 111 και 133 μήνες, καθώς και ως προς την πιθανότητα διάμεσης επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου που ήταν, αντιστοίχως, 9,13, 33, 49 και 92 μήνες. Η Γερμανική ομάδα μελέτης της ΧΛΛ (German CLL Study Group) έδειξε διαφορετική κατανομή των χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με το στάδιο των ασθενών αλλά και την πορεία της νόσου (επιθετική ή σταθερή)[7]. Έτσι, στην ομάδα CLL1 που περιλάμβανε ασθενείς σταδίου Α κατά Binet χωρίς ανάγκη έναρξης θεραπείας, η συχνότητα της έλλειψης 13q ήταν 59% και η συχνότητά της ως μεμονωμένη βλάβη 40%. Η έλλειψη 11q- βρέθηκε σε ποσοστό 10%, η έλλειψη 17p- σε ποσοστό 7% και η τρισωμία 12q+ σε ποσοστό 10%.

Η μέθοδος FISH είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ από το λέμφωμα από το κύτταρο του μανδύα και άλλα λεμφώματα Β κυτταρικής αρχής. Σε περιπτώσεις ΧΛΛ με άτυπη μορφολογία ή ανοσοφαινοτυπικό score κατά Matutes 3/5 ή μικρότερο προτείνεται έλεγχος με break apart ανιχνευτή για το γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών IGH (14q32) και σε περιπτώσεις αναδιάταξης 14q32 γίνεται περαιτέρω διερεύνηση για καθορισμό του χρωμοσώματος που συμμετέχει στην αναδιάταξη [t(11;14),t(14;18), t(14;19)]. Η αναδιάταξη 14q32 ανιχνεύεται στο 6-19% των ασθενών με ΧΛΛ στη διάγνωση της νόσου και συσχετίζεται με πτωχή πρόγνωση[8].

Την τελευταία πενταετία, με τη χρήση των νέων μιτογόνων φάνηκε ότι ο αριθμός των ανιχνεύσιμων χρωμοσωμικών ανωμαλιών με την κλασική κυτταρογενετική είναι μεγαλύτερος έναντι εκείνων που βρέθηκαν με τη μέθοδο FISH με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές για την ΧΛΛ[5]. Ο σύνθετος καρυότυπος δεν καταδεικνύεται συνήθως με τη μέθοδο FISH και φαίνεται ότι συσχετίζεται με άλλους καθιερωμένους δυσμενείς βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες στη ΧΛΛ. Επίσης, επηρεάζει δυσμενώς την επιβίωση και στα δύο άκρα του φάσματος της προγνωστικής διαστρωμάτωσης, δηλαδή σε ασθενείς με διαταραχή του 17p και ασθενείς με μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV.[9,10]

Η τρισωμία 12 ανιχνεύεται στο 1/3 των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο όταν η μελέτη γίνεται με κλασική κυτταρογενετική. Σε έλεγχο με FISH, τρισωμία 12 ανιχνεύεται σε ποσοστό 15% των ασθενών με ΧΛΛ. Η τρισωμία 12 συχνά συσχετίζεται με άτυπη μορφολογία λεμφοκυττάρων[11,12]. Με κλασική κυτταρογενετική μελέτη πρόσφατα βρέθηκε ότι η τρισωμία 19 συνυπάρχει με τρισωμία 12 σε συγκεκριμένη ομάδα ασθενών με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV[13,14].

Η προγνωστική σημασία των χρωμοσωμικών ανωμαλιών εκτός βασικών προγνωστικών κατηγοριών, ιδίως των χρωμοσωμικών μεταθέσεων, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση[17,18]. Στην πορεία της νόσου το 11.5-38% των ασθενών παρουσιάζουν κλωνική εξέλιξη[12,19]. Οι ελλείψεις 11q, 6q, και 17p θεωρούνται οι πιο συχνές δευτεροπαθείς χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η κλωνική εξέλιξη συσχετίζεται με επιθετικότερη πορεία νόσου και πτωχή πρόγνωση.

Σύμφωνα με τις Κατευθυντήριες Οδηγίες του iwCLL/NCI, συνιστάται έλεγχος με FISH πριν την έναρξη θεραπείας για τη διερεύνηση της ύπαρξης ανωμαλίας στις περιοχές 11 q22 (ATM), 13q14(D13S319), TP53(17p13) καθώς και για την κατάδειξη τρισωμίας 12. Επίσης προτείνεται έλεγχος για έλλειψη στο μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στις περιοχές 6q21 ή/και 6q23[20]. Το National Comprehensive Cancer Network (NCCN) συνιστά έλεγχο με FISH ή κυτταρογενετικό έλεγχο με τη χρήση νέων μιτογόνων ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη ανωμαλιών όπως t(11;14), t(11q;v), +12, del(11q), del(13q) και del(17p13).

Οι ασθενείς που παρουσιάζουν ως μοναδική χρωμοσωμική ανωμαλία την έλλειψη στην περιοχή 13q14 εμφανίζουν μακρά επιβίωση. Οι ελλείψεις 11q, 6q και 17p συσχετίζονται με γρήγορη εξέλιξη νόσου και κακή πρόγνωση. Η ανίχνευση έλλειψης 11q και 17p κατευθύνει τη θεραπευτική αντιμετώπιση. Η θεραπεία με συνδυασμό φλουνταραμπίνης κυκλοφωσφαμίδης και rituximab (FCR) βελτίωσε πολύ το ποσοστό επίτευξης πλήρους ύφεσης και της ολικής επιβίωσης των ασθενών με έλλειψη 11q. Η ανίχνευση της έλλειψης 17p έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή ταυτοποιεί μια ομάδα ασθενών με φτωχή απάντηση στη φλουνταραμπίνη και στο Rituximab. Στους συγκεκριμένους ασθενείς επιβάλλονται εναλλακτικές προσεγγίσεις, μεταξύ άλλων και μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων[21].

Β Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η Β προλεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι εξαιρετικά σπάνια νόσος[1,2]. Τα κυτταρογενετικά δεδομένα είναι περιορισμένα λόγω της σπανιότητας του νοσήματος αλλά και της δυσκολίας επίτευξης μεταφάσεων από προλεμφοκύτταρα. Πολύ συχνά ανιχνεύεται σύνθετος καρυότυπος. Έλλειψη 17p βρίσκεται στο 50% των περιπτώσεων και συνυπάρχει και με μεταλλάξεις του γονιδίου TP53[1,22], προσφέροντας μια βιολογική ερμηνεία για την επιθετική κλινική συμπεριφορά της νόσου. Με τη μέθοδο FISH ανιχνεύθηκαν ανωμαλίες όπως έλλειψη 13q-, έλλειψη 11q και 17p-, ενώ η τρισωμία 12 είναι σπάνια. Άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι η έλλειψη 6q-, t(6;12), δομικές ανωμαλίες του 1p και του 1q. Χρωμοσωμικές μεταθέσεις με συμμετοχή της ζώνης 8q24 συσχετίζονται με επιθετικότερη νόσο[23].

Σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης

Το ΣΛΟΖ είναι διακριτή κατά WHO κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα με χαρακτηριστικό (όχι ειδικό) ανοσοφαινότυπο ο οποίος συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση του ΣΛΟΖ από άλλα λεμφώματα από μικρά Β λεμφοκύτταρα που διηθούν δευτερογενώς τον σπλήνα. Χωρίς βιοψία του σπλήνα είναι δύσκολη η διαφορική διάγνωση από άλλα χαμηλού βαθμού κακοήθειας Β κυτταρικής αρχής νεοπλάσματα[1].

Το ΣΛΟΖ δε συσχετίζεται με κάποια ειδική ή έστω χαρακτηριστική γενετική βλάβη. Τα κυτταρογενετικά ευρήματα είναι ετερογενή. Αναφέρεται η ύπαρξη δύο υποτύπων ΣΛΟΖ, με έλλειψη 7q και τρισωμία 3q, αντιστοίχως[2,24]. Έλλειψη της περιοχής 7q21-32 έχει αναφερθεί σε ποσοστό έως 40% και συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση. Τρισωμία 3q ανιχνεύεται συχνά (17%) και συσχετίζεται με καλή πρόγνωση. Μη τυχαία είναι και η μετάθεση t(2;7)(p12;q21) που βρίσκεται σε μικρό αριθμό ασθενών με ΣΛΟΖ και συσχετίζεται με ενεργοποίηση του γονιδίου CDK6[25]. Η μετάθεση t(11;14)(q13;q32) που αποτελεί χαρακτηριστική χρωμοσωμική ανωμαλία του λεμφώματος από το κύτταρο του μανδύα βρίσκεται και σε ασθενείς με ΣΛΟΖ[26,27].

Το 2010, σε μελέτη που περιλάμβανε 330 ασθενείς με ΣΛΟΖ βρέθηκε ότι 72% παρουσίαζαν παθολογικό καρυότυπο, 53% είχαν πολύπλοκο καρυότυπο και 29% παρουσίαζαν μια μόνο χρωμοσωμική ανωμαλία[28]. Οι συχνότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι επιπρόσθετο 3/3q και 12q, έλλειψη 6q και 7q καθώς και μεταθέσεις των 8q, 1q και 14q. Ασθενείς με αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV είχαν ελλείψεις του 7q και του TP53. Φάνηκε επίσης ότι ο πολύπλοκος καρυότυπος, οι ανωμαλίες 14q και η έλλειψη 17p (TP53) συσχετίζονται με κακή πρόγνωση.

Εξωλεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης τύπου MALT

Το 7-8% των λεμφωμάτων από Β λεμφοκύτταρα και το 50% των πρωτοπαθών λεμφωμάτων του στομάχου είναι εξωλεμφαδενικά λεμφώματα οριακής ζώνης τύπου MALT[1]. Η κυτταρογενετική μελέτη των λεμφωμάτων αυτών είναι δύσκολη επειδή το υλικό της βιοψίας συνήθως είναι περιορισμένο. Τρεις είναι οι συχνότερες

μεταθέσεις σε ασθενείς με λέμφωμα MALT: t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21) και t(1;14)(p22;q32). Όλες τελικά ενεργοποιούν την οδό του NF-κB[2]. Η αναδιάταξη t(11;18)(q21;21)/API2;MALT1 έχει αναφερθεί σε γαστρικό και πνευμονικό λέμφωμα[1,29]. Οι μέθοδοι FISH συμβάλλουν πολύ στην ανίχνευση της t(11;18)(q21;21) στους συγκεκριμένους ασθενείς. Η αναδιάταξη t(11;18)(q21;21) δε βρίσκεται ποτέ σε λέμφωμα στομάχου από μεγάλα κύτταρα. Η αναδιάταξη t(14;18)(q32;q21) έχει βρεθεί σε MALT λέμφωμα οφθαλμού και σιελογόνων αδένων. Τέλος, η αναδιάταξη t(1;14)(p22;q32) παρατηρείται σε ποσοστό <2% των MALT λεμφωμάτων και είναι συχνή στο πνευμονικό λέμφωμα (7-9%). Όταν συνυπάρχουν επιπρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συνήθως πρόκειται για τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 12 και 18. Η αναδιάταξη t(3;14)(p14.1;q32) ανιχνεύεται στο 10% των MALT λεμφωμάτων θυρεοειδούς, οφθαλμού και δέρματος άλλα έχει βρεθεί και σε άλλα Β κυτταρικής αρχής νεοπλάσματα[1,2].

Τα περισσότερα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα οριακής ζώνης τύπου MALT δεν είναι επιθετικά και απαντούν στη ακτινοθεραπεία. Ενώ τα λεμφώματα του στομάχου με παρουσία ελικοβακτηριδίου του πυλωρού απαντούν στη χορήγηση αντιβιοτικών, οι ασθενείς με t(11;18) και t(1;14)(p22;q32) συχνά δεν απαντούν στην αντιελικοβακτηριδιακή θεραπεία[2,30]. Η παρουσία αυτών των μεταθέσεων στα νεοπλασματικά κύτταρα φαίνεται να προσδίδει πλενονέκτημα πολλαπλασιασμού, ανεξάρτητα από την αντιγονική διέγερση. Η παρουσία της τρισωμίας 18 φαίνεται να σχετίζεται με επιθετικότερη κλινική συμπεριφορά της νόσου[31].

Λεμφοζιδιακό λέμφωμα

Το λεμφοζιδιακό λέμφωμα χαρακτηρίζεται από τη μετάθεση t(14;18)(q32;q21) που οδηγεί σε αναδιάταξη του γονιδίου BCL2 το οποίο μεταφέρεται κοντά στον ενισχυτή του γενετικού τόπου της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, με συνέπεια να προκαλείται υπερέκφρασή του. Η υπερέκφραση της BCL2 πρωτεΐνης προκαλεί παράταση της επιβίωσης των κυττάρων με αναστολή της απόπτωσης[1,2]. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί οι παραλλαγές της t(14;18) t(2;18)(p11q21) και t(18;22)(q21;q11), όπου το γονίδιο BCL2 επηρεάζεται από τον ενισχυτή του γενετικού τόπου της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, κ (2p) ή λ (22q).

Η κυτταρογενετική μελέτη αποκάλυψε την παρουσία της t(14;18)(q32;q21) σε ποσοστό >90% των low grade (1-2) λεμφοζιδιακών λεμφωμάτων. Το ποσοστό ανίχνευσης της μετάθεσης εξαρτάται από την τεχνική που χρησιμοποιείται: πιο ευαίσθητη είναι η μέθοδος FISH. Τα λεμφοζιδιακά λεμφώματα εμφανίζουν επιπρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε ποσοστό 90%, με συχνότερες τις ακόλουθες: απώλεια 1p, 6q, 10q, 17p καθώς και παρουσία επιπρόσθετου τμήματος του χρωμοσώματος στις περιοχές 1q21-44, 6p, 7, 8, 12q, X, 18q[1,2]. Με την τεχνική FISH, η συχνότητα των ελλείψεων 6q και 17p13 είναι 60% και 20%, αντίστοιχως.

Το 5-15% των ασθενών με λεμφοζιδιακό λέμφωμα, κυρίως grade 3B, δεν εμφανίζουν τη μετάθεση t(14;18)(q32;q21) αλλά μεταθέσεις με συμμετοχή της περιοχής 3q27 (γονίδιο BCL6)[1,32,33]. Η πολυπλοκότητα του καρυότυπου αυξάνει ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας του λεμφώματος καθώς και κατά την εξέλιξη ή την εκτροπή του[1,2,32]. Ο πολύπλοκος καρυότυπος συσχετίζεται με κακή πρόγνωση. Επίσης οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες: del6q23-26, del 17p, 1p-, +12,+18p, +Xp συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και βραχύτερο χρόνο εκτροπής της νόσου. Στις σπάνιες περιπτώσεις που συνυπήρχε η t(14;18) με την t(8;14), η πρόγνωση ήταν επίσης δυσμενής.

Λέμφωμα από το κύτταρο του μανδύα

Το λέμφωμα από το κύτταρο του μανδύα έχει τη χειρότερη πρόγνωση από οποιοδήποτε άλλο Β λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα και η ακριβής διάγνωσή του είναι ιδιαίτερα σημαντική[1]. Η t(11;14)(q13;q32) αποτελεί τη χαρακτηριστική χρωμοσωμική ανωμαλία αυτού του τύπου λεμφώματος. Αποτέλεσμα της μετάθεσης είναι η μετατόπιση του ογκογονιδίου BCL1 (11q13) δίπλα στο γονίδιο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (14q32). Η αναδιάταξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της κυκλίνης D1, η οποία παραβλάπτει τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Η ανίχνευση της t(11;14)(q13;q32) με κλασική κυτταρογενετική μελέτη δεν υπερβαίνει το 70-75% των ασθενών. Η μέθοδος FISH βοηθά στην κατάδειξη της αναδιάταξης σε περισσότερους ασθενείς (>96%)[34,35]. Μεταθέσεις του γονιδίου BCL1 στους γενετικούς τόπους της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (t(2;11)(p12q13)/IGK/BCL1 και t(11;22)(q13:q11)IGL/BCL1) είναι εξαιρετικά σπάνιες σε ασθενείς με λέμφωμα από το κύτταρο του μανδύα.

Από την κυτταρογενετική μελέτη των λεμφωμάτων αυτών βρέθηκε ότι εμφανίζουν συχνά επιπρόσθετες δευτερογενείς «μη τυχαίες» χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται ελλείψεις στις περιοχές 1p13-p31 (29-52%), 6q23-27 (23-38%), 9p21 (18-31%), 11q22-q23 (21-59%), 13q11-q13 (22-55%), 13q14-q34 (43-51%) και 17p13-pter (21-45%), καθώς και η παρουσία επιπρόσθετου τμήματος χρωμοσώματος στις περιοχές 3q26 (31-50%), 7p21 (16-34%) και 8q24 (16-36%: MYC).

Η τρισωμία 12 βρίσκεται στο 25% των ασθενών ως επιπρόσθετη χρωμοσωμική ανωμαλία και συσχετίζεται με μικρότερη επιβίωση. Τετραπλοειδικοί κλώνοι βρίσκονται κυρίως στον πλειόμορφο (80%) και βλαστικό (36%) υποτύπο του λεμφώματος παρά στον υποτύπο με τυπική

μορφολογία. Η παρουσία τριών ή περισσοτέρων επιπρόσθετων χρωμοσωμικών ανωμαλιών, οι ελλείψεις 17p- και 9q- καθώς και η τρισωμία 3q+ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κακής πρόγνωσης[1,2]. Πρόσφατα, με τη μέθοδο FISH βρέθηκε ότι η έλλειψη 13q14 συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση[36].

Οι περιπτώσεις λεμφώματος από το κύτταρο του μανδύα με απουσία έκφρασης κυκλίνης D1 και απουσία της μετάθεσης t(11;14) είναι πολύ σπάνιες. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις παρατηρείται υψηλή έκφραση κυκλίνης D2 ή D3 και σε κάποιες από αυτές ανιχνεύεται η μετάθεση t(2;12)(p12;p13).

Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα

Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες χαρακτηριστικές του λεμφοπλασματοκυτταρικού λεμφώματος. Η μετάθεση t(9;14) (p13;q32) PAX5/IGH αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι πολύ συχνή (έως και 50%) στο συγκεκριμένο νόσημα, αλλά στις μελέτες που επακολούθησαν φάνηκε ότι υπερεκτιμήθηκε η συχνότητά της και ότι η συγκεκριμένη μετάθεση παρατηρείται και σε άλλα Β λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. Με τη μέθοδο FISH, έλλειψη 6q ανιχνεύεται σε ποσοστό 42% και συσχετίζεται με επιθετικότερη πορεία νόσου[2,33,37]. Οι ελλείψεις 13q14 και 17p13 συσχετίζονται με προχωρημένο στάδιο νόσου. Πρόσφατη μελέτη με κλασική κυτταρογενετική και FISH έδειξε ότι κύριες ανωμαλίες στη μακροσφαιριναιμία Waldenstrom είναι οι ελλείψεις 6q- (30%) 13q- (13%) 17p- (8%), 11q- (7%) και οι τρισωμίες 4 (8%) και 18 (15%)[38] και ότι οι ελλείψεις 6q- και 11q- καθώς η τρισωμία 4 επίσης επιβαρύνουν την πρόγνωση.

Λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα

Οι κυτταρογενετικές μελέτες ασθενών με λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα είναι λίγες. Συχνά παρατηρούνται αναδιατάξεις με συμμετοχή του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 14[39]. Έχει επίσης αναφερθεί μετάθεση t(14q32) με ταυτόχρονη έλλειψη τμήματος του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 11q22-24. Δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος 5, του τύπου του διπλασιασμού τμήματος 5q13-31, βρέθηκαν σε δύο μελέτες με CGH στο 20% των ασθενών[40,41].

Σχόλια – Προοπτικές

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την κυτταρογενετική και μοριακή μελέτη των χρόνιων Β λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονταια από μεγάλη γενετική ετερογένεια. Οι νεότερες μέθοδοι της μοριακής κυτταρογενετικής και μοριακής βιολογίας βοηθούν επακριβώς στον καθορισμό της γενετικής βλάβης του νοσήματος, στην επιβεβαίωση της διάγνωσης και στην κατανόηση της κλινικής συμπεριφοράς. Η συσσώρευση των γνώσεων σχετικά με τις συγκεκριμένες χρωμομοσωμικές ανωμαλίες βοηθά στον καθορισμό της πρόγνωσης και κατευθύνει τη θεραπευτική αντιμετώπιση. Η γνώση της γενετικής βλάβης της νόσου βοηθά επίσης στην κατανόηση της βιολογίας και αποτελεί έναυσμα για την ανάπτυξη πιο εξατομικευμένων θεραπειών.

Classic and molecular cytogenetic analysis of B chronic lymphoproliferative disorders

by Anastasia Athanasiadou

Hematology Department and Hematopoietic Cell Transplantation (HCT) Unit, "G Papanicolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece

ABSTRACT: Chronic lymphoproliferative disorders represent a heterogeneous group of diseases characterized by uncontrolled proliferation and accumulation of malignant mature lymphoid cells. Although usually classified as low-grade malignancies with relatively prolonged survival, certain histotypes are aggressive and associated with inferior outcome. Recent developments in molecular biology, classical and molecular cytogenetics (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH) techniques, along with an in-depth analysis of the cell phenotype, have contributed significantly to our understanding of these entities. In particular, it is now established that cytogenetic investigation is of great diagnostic value and also provides important prognostic information, which may be used for patient stratification in risk groups and design of the therapeutic strategy: for instance, deletion of chromosome 17p in chronic lymphocytic leukemia is now considered as an independent adverse prognostic factor associated with refractoriness to purine analogs. Furthermore, molecular analysis of cytogenetic aberrations has proven of critical importance in elucidating important disease pathways and identifying possible therapeutic targets.

Βιβλιογραφία

1. Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, et al. International Agency for Research on Cancer . WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 4th Edition World Health Organization 2008. Geneva, Switzerland.
2. Heim S, Mitelman F. Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations in tumor cells. 2009, 3nd ed, Wiley-Liss, New Jersey.
3. Morgan R, Chen Z, Richkind K, Roherty S, Velasco J, Sandberg AA. PHA/IL2: an efficient mitogen cocktail for cytogenetic studies of non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 1999;109:134-137.
4. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff S, Blackwell S, et al. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. Clin Cancer research. 2005; 11:1490-1492.
5. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. Leukemia. 2007; 21:2442-2451.
6. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A. Genomic aberrations and survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2000; 343:1910-1916.
7. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia. 2002; 16:993-1007
8. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. Br J Haematol. 2008; 142:529–537.
9. Ισκάς Μ,. Μπαλιάκας Π, Gardiner A, και συν. Σύνθετος καρυότυπος στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία: ένας νέος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας? 23ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 22-24 Νοεμβρίου 2012 Abstract 5.
10. Travella A, Ripollés L, Aventin A, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. Hematol Oncol. 2012 Sep 7. doi: 10.1002/hon.2025. [Epub ahead of print]
11. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. Br J Haematol. 1996; 92:382-388.
12. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Tsompanakou A, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of trisomy12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison withother karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis. Cancer Genetics and Cytogenetics 2006; 168:109–119.
13. Sellmann L, Gesk S, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2007; 138:217-220.
14. Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton LA, et al. Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. Leukemia. 2012; 26:170-172.
15. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. Haematologica. 2008; 93:473-474.
16. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. Haematologica. 2010; 95:1519-1525.
17. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006; 107:742-751.
18. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, et al. A reappraisal of the biological and clinical implications of chromosomal translocations in chronic lymphocytic leukemia. 54rd Annual Meeting of ASH, Atlanta, Georgia USA, 8-11/12/2012. Blood. (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012; 120:3915.
19. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. Haematologica. 2007; 92:1242-1245.
20. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008; 111:5446-5456.
21. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. Blood. 2004; 103:3278-3281
22. Dearden C. How I treat prolymphocytic leukemia. Blood. 2012; 120:538-551.
23. Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, et al.Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations:a subgroup with an aggressive disease course. Ann Hematol. 2012; 91:863-873.
24. Sole F, Salido M, Espinet B, et al. Splenic marginal zone lymphomas: two cytogenetic subtypes one with gain of 3q and the other with loss of 7q. Haematologica. 2001; 86:71-77.
25. Brito-Babapulle V, Gruszka-Westwood AM, Platt G, et al. Translocation t(2;7)(p12;q21-22) with dysregulation of the CDK6 gene mapping to 7q21-22 in a non-Hodgkin's lymphoma with leukemia. Hematologica. 2002; 87:357-362.
26. Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, et al. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire stud. Br J Hematol. 1998; 101:712-721.
27. Baro C, Salido M, Espinet B, et al. New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping. Leuk Res. 2008; 32:727-736.
28. Salido M, Baró C, Oscier D, et al. Cytogenetic aberrations

and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the splenic B-Cell Lymphoma Group. Blood. 2010;116:1479-1488.
29. Kobayashi Y, Maekawa M, Matsuno Y. Detection of t(11;18) in MALT-type lymphoma with dual-color fluorescence in situ hybridization and reverse transcriptase –polymerase chain reaction analysis. Diagn Mol Path. 2001;10:207-213.
30. Isaacson PG, Du MQ. Gastric lymphoma: genetics and resistance to H.pylori eradication. Verh Dtch Ges Pathol. 2003;87:116-122.
31. Nakamura Y, Ye H, Bacon CM, et al. Clinical impact of cytogenetic aberrations in gastric MALT lymphoma: comprehensive analysis using interphase fluorescence in situ hybridization. Gut. 2007;56:1358-1363.
32. Mohamed NA, Palutke M, Eisenberg L. Chromosomal analysis of 52 cases of follicular lymphoma with t(14;18), including blast/ blastoid variant. Cancer Genet Cytogenet. 2001;126:45-51.
33. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2011; 117:5019-5032.
34. Remstein E, Kurtin P, Buno I. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. Br J Hematol. 2000; 110:856-862.
35. Sander S, Bullinger L, Leupolt E, et al. Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase FISH. Incidence and clinicopathological correlations. Hematologica. 2008; 93:680-687.
36. Sander S, Bullinger L, Leupolt E, et al. Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase FISH. Incidence and clinicopathological correlations. Hematologica. 2008; 93:680-687; 98(4)
37. Schop RF, Kuehl WM, Van Wier SA, et al. Waldenström macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. Blood. 2002; 100: 2996-3001
38. Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. Haematologica. 2013; 98:649-654.
39. Sambani C, Trafalis DT, Mitsoulis-Mentzikoff C, et al. Clonal chromosome rearrangements in hairy cell leukemia: personal experience and review of literature ancer Genet Cytogenet. 2001;129:138-144.
40. Ostergaard M, Lindbjerg Andersen C, Pedersen B, Koch J, Nielsen B. Recurrent imbalances involving chromosome 5 and 7q22-q35 in hairy cell leukemia: a comparative genomic hybridization study. Genes Chromosomes Cancer. 2001; 30:218-219.
41. Nessling M, Solinas-Toldo S, Lichter P, et al. Genomic imbalances are rare in hairy cell leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 1999; 26:182-183.