

**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

Tartalomjegyzék	oldal	
1.	Bevezetés	4.
2.	Anapláziás nagysejtes lymphoma	5.
2.1.	Áttekintés, epidemiológia, morfológia	5.
2.2.	Diagnosztika és differenciál diagnosztika	6.
2.2.1.	Immunhisztokémia	6.
2.2.2.	Molekuláris genetika	9.
2.3.	Az ALCL klinikai jellegzetességei	15.
2.3.1.	ALK pozitív anapláziás nagysejtes lymphoma	16.
2.3.2.	ALK negatív anapláziás nagysejtes lymphoma	16.
2.3.3.	Primer cutan ALCL	17.
2.3.4.	Hodgkin like ALCL	19
2.3.5.	HIV asszociált ALCL	19.
3.	Az ALCL kezelése kemoterápiával	20.
3.1.	Hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben	21.
4.	Célkitűzések	23.
5.	Vizsgálatok	24.
5.1.	Immunhisztokémia	24.
5.2.	Molekuláris genetikai vizsgálatok	25.
5.2.1.	DNS és RNS izolálás	25.
5.2.2.	Polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatok	28.
5.2.2.1.	c-raf-1 gén	28.
5.2.2.2.	Imunglobulin nehéz lánc génátrendeződés (IgH)	29.
5.2.2.3.	T-sejt receptor génátrendeződés (TCR)	30.
5.2.2.3.1.	TCR- β	30.
5.2.2.3.2.	TCR- γ	30.
5.2.2.4.	Kromoszóma transzlokációs PCR vizsgálatok	31.
5.2.2.4.1.	t(2;5) transzlokáció	31.
5.2.2.4.2.	t(1;2) transzlokáció	32.
5.2.3.	Elektroforézisek	33.
5.2.4.	Multidrug rezisztencia gén vizsgálata	34.
5.2.5.	Thrombophilia genetikai vizsgálatok	36.
5.2.5.1.	Factor V Leiden mutáció	36.

5.2.5.2.	Prothrombin G20210A mutáció	37.
5.2.5.3.	PIA2 allél mutáció	37.
5.2.5.4.	MTHFR C677T mutáció	37.
5.3.	Citogenetikai vizsgálatok	38.
5.4.	Áramlási citometriai vizsgálatok	39.
5.5.	Keringő NPM-ALK- és ALK ellenes antitest kimutatása	40.
6	Magyar anapláziás nagysejtes lymphoma regiszter	40.
7	Anapláziás nagysejtes lymphoma kezelés hazánkban	45
7.1.	Kemoterápia	45.
7.2.	Autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben hazánkban	46.
8.	Eredmények értékelése	47.
8.1.	Immunhisztokémiai eredmények	47.
8.2.	Molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei	51.
8.2.1.	Génátrendeződési vizsgálatok eredményei	52.
8.2.2.	Transzlokációs vizsgálatok eredményei	57.
8.2.3.	Multidrug rezisztencia vizsgálatok eredményei	57.
8.2.4.	Thrombophiliás eredmények eredményei	59.
8.3.	Citogenetikai eredmények	60.
8.4.	Áramlási citometriai eredmények	62.
8.5.	NPM-ALK és ALK ellenes antitest immunprecipitációs eredmények	64.
9.	Összefoglalás-következtetések	67.
10.	Köszönetnyilvánítás	70.
11.	Irodalom	72.

1. Bevezetés

A daganatos betegségek között a malignus lymphoma incidenciája emelkedik a legkifejezettebb mértékben. A szomorú statisztikai adatok újabb és újabb kihívást jelentenek a klinikus és patológus számára.

Az utóbbi évek hematológiai irodalma számos új molekuláris genetikai eltérést írt le mind a leukémiák, mind a lymphomák területén. Magyarországon is alkalmaznak a vezető patológiai centrumok molekuláris genetikai vizsgálatokat több hematopatológiai betegségben (bcr/abl CML-ben, ALL-ben, bcl-2 follicularis lymphomában, cyclin D-1 mantle cell lymphomában stb.).

Az anaplázis nagysejtes lymphoma egy viszonylag új - 18 éves - entitás, Magyarországon nem történt a betegséget érintő komolyabb kutatás. Az utóbbi években bizonyos centrumokban a diagnosztikus procedúra során ugyan T-sejt receptor gén-, jóval ritkábban immunglobulin nehéz lánc génátrendeződési vizsgálatot végeznek, de ez nem általános protokoll. A betegség lényegét adó ritka kromoszóma transzlokáció vizsgálata viszont egyáltalán nem történt még hazánkban. Jelen tanulmányban az említett genetikai metodikák mellett az ALCL modern diagnosztikájában nagy jelentőséggel bíró transzlokációk vizsgálatára is sor került, kiegészítve kiterjedt immunhisztokémiai vizsgálatokkal. Francia partnerrel megkezdett kutatások távlatait is érinti a munka. Koprodukciónban egy angol munkacsoporttal az ALCL-ben kimutatható specifikus immunválaszt is tanulmányoztuk. A malignus betegségek prognózisát befolyásoló gyógyszer rezisztenciát előrejelző módszerek közül a multidrug rezisztencia gén jelenlétét vizsgáltuk. Klinikánkon évek óta folyó thrombophilia vizsgálatokat végeztünk az ALCL-es betegeken is. ALCL-es mintákon elvégzett citogenetikai és áramlási citometriai vizsgálatokról is számot adunk.

Hazánkban a hematológiai társaság új vezetése alatt számos hematológiai betegség országos epidemiológiai és klinikai feltérképezésére indult kezdeményezés. Ezek egyik első példája az országos ALCL regiszter, melynek megvalósítását a tanulmány szerzője vállalta el. Az elmúlt évek során nemzetközi viszonylatban is jelentős számú hazai beteg adatát gyűjtöttük össze a regiszter számára. A legfontosabb klinikopatológiai jellegzetességek ismertetése mellett az irodalommal is összehasonlítottuk a magyar adatokat. A modern terápiák közül az autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben történő alkalmazásáról is beszámoltunk.

2. Anapláziás nagysejtes lymphoma (ALCL)

2.1. Áttekintés, epidemiológia, morfológia

A malignus hematológiai kórképek közül a Non-Hodgkin lymphoma (NHL) a leukémiák után a leggyakoribb betegség. Gyakorisága földrajzi elhelyezkedéstől függően férfiakban 5,4-13,6/100000 fő, nőkben 3,1-8,9/100000 fő (1). A legkisebb érték az Európai Uniót, a legmagasabb az USA fehér lakosságát jelzi. A diagnosztika fejlődése önmagában nem magyarázat arra, miért háromszorozódott meg férfiakban az elmúlt 40 év alatt a NHL incidenciája, mialatt a Hodgkin lymphoma gyakorisága szinte változatlan maradt (2). Az USA-ban 1950 óta évente 4 %-kal nő a NHL incidenciája (3). A betegség valódi gyakoribbá válása mellett az átlag életkor növekedése is szerepet játszik a felismert lymphomás esetek számának növekedésében. Húsz-huszonöt éves kor felett a NHL incidenciája mindkét nemből az életkorral exponenciálisan emelkedik. Míg 20 éves korban férfiakban 1,8, nőkben 0,8/100000 fő az incidencia, addig 50 éves korban 17 illetve 8/100000, 75 évesen 67 illetve 37/100000 fő férfiak és nők esetében a NHL incidencia a Dán Rákregiszter adatai alapján (2). A T-, null-sejtes lymphomák az összes lymphomás eset 9-15 %-át teszik ki a nyugati társadalmakban, ezzel szemben a távol keleten ennél jelentősen gyakoribb az előfordulása. Ennek oka részben a HTLV-I-related T-sejtes és EBV asszociált „nasal-type” T/NK-sejtes lymphoma gyakori jelenléte, részben bizonyos B-sejtes lymphomák ritkább előfordulása. Az anapláziás nagysejtes lymphoma az összes lymphoma 2-5 %-a, a gyermekkori esetek 10-15 %-a. Gyakoriságában jelentősebb földrajzi eltérést nem említ az irodalom.

Az ALCL-t, mint önálló entitást először Harald Stein írta le 1985-ben (4). Ki-1, majd CD30 pozitív lymphomának nevezték el. A CD30 molekula egy 120 kDa tömegű transzmembrán citokin receptor, mely a Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor család tagja. Ezen lymphoma entitásban a CD30 erősen pozitív, főként a sejtmembránban és a Golgi régióban. Immunhisztokémiai analízis alapján a CD30 nemcsak az ALCL-ben pozitív, hanem Hodgkin lymphomában (HL) a Hodgkin és Sternberg-Reed sejtekben, illetve a nem hematológiai tumorok közül az embrionális karcinómákban is, valamint reaktív nyirokcsomó elváltozásokban.

ALCL-ben a nyirokcsomó alapszerkezete részlegesen vagy teljesen felbomlott, a tumorsejtek a nyirokcsomó sinusokat infiltrálják hasonlóan a metasztatizáló tumorok terjedésére. A paracortexet szintén kolonizálhatja a tumor, melynek növekedése gyakran kohezív jellegű. Nagy, anapláziás, bizarr alakú blast sejtek vannak jelen, melyek pleomorfak. Hatalmas

citoplazmájuk hematoxylin-eosin festéssel szürkés-kék színű, gyakran vakuolumok láthatók bennük. A sejtmagok jellegzetesen patkó illetve vese alakúak. A kiel-i klasszifikáció (5) anapláziás nagysejtes (LCA) CD30 pozitív lymphomaként említi. Tekintve, hogy a CD30 egyéb tumorokban is pozitív, a REAL (6) és a WHO malignus lymphoma klasszifikáció (7) ALCL-nek nevezi. Ez utóbbi két beosztás csak null- illetve T-sejtes fenotípust ismer el és a B-sejtes ALCL-t a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLCL) altípusaként kategorizálja.

Az ALCL egy heterogén lymphoma csoport klinikai, morfológiai és fenotípus szempontjából egyaránt. Hisztológiailag számos altípust írtak le a pleomorf képtől a monomorf változatig. Ezek közül leggyakoribb az un. „common-type”, az esetek ~ 70%-a, a kis sejtes és a lymphohistiocytás forma 5-10 %-ban fordul elő. Ritka variánsok: óriás sejtes (8), sarcomatoid forma (9), neutrophil gazdag (10), pecsétgyűrű sejtes (11), granulomatosus (12), eosinophil gazdag (13), hypocellularis (14) és Hodgkin like formák (15). Ez utóbbi altípus diagnosztikája rendkívül nehéz, nincs egyetlen olyan marker, mely egyértelművé tenné az állásfoglalást a két entitás között. Ezek az esetek azok, amikor a patológus az alábbi diagnózisokat adhatja: HL vagy ALCL, HL syntitialis variáns, HL sarcomatoid variáns, nem osztályozható HL. Felmerül a kérdés, hogy Hodgkin-like ALCL-ről, vagy ALCL-like Hodgkin lymphomáról van-e szó. Egyes szerzők szerint nem is létezik ilyen köztes forma, hanem valójában itt „tumorsejt gazdag” Hodgkin lymphomával állunk szemben.

2.2. Diagnosztika és differenciál diagnosztika

2.2.1. Immunhisztokémia

Az CD30 pozitív ALCL-es esetek 70-80 %-a T-vagy null sejtes fenotípussal rendelkezik, míg B-sejtes eredetű mintegy 20 %. Itt ütköznek az irodalmi adatok, tekintettel a fent említett REAL és WHO klasszifikációra, ahol a B-ALCL nem önálló entitás, a DLCL variánsa. A WHO klasszifikáció különösen hosszasan foglalkozik az ALCL-lel (7). Megállapítja, hogy a primer cutan forma eltér a szisztémás formától, a lymphomatoid papulosist – mely a CD30 pozitív lymphoproliferative betegség egy tagja – nem javasolja a lymphoid neopláziákhoz sorolni. Kiemeli, hogy változatlanul nincs egyenlőre „gold standard” az ALCL diagnosztikájában, de mindenképpen célszerű elkülöníteni az ALK pozitív és ALK negatív eseteket. Kimondja, hogy a Hodgkin-like ALCL nem egy önálló entitás, a morfológiai határesetekben a molekuláris genetikai vizsgálatokra érdemes hagyatkozni kiegészítve az immunfenotipizálással. A leukocytá common antigén CD45 az ALCL-ben változó gyakoriságú, ugyanakkor a Hodgkin lymphomában többnyire negatív.

1. Sejtvonal specifikus markerek:
T-sejtvonal markerek: CD3, CD45Ro (UCHL1), CD4, CD7, CD43 (MTI), Citotoxikus T-sejt markerek: CD8, TIA-1, Perforin, Granzyme-B
B-sejtvonal markerek: CD20 (L26), CD79a (JCB 117), CD23, CD19. BSAP
Monocita vonal marker: CD68 (Kp1)
2. Vegyes markerek
CD30 (Ki-1)
Proliferációs marker (Ki-67, MIB-1, B56)
CD45 (leukocita common antigén – LCA)
CD15 (granulocita associált antigén – hapténX – LeuM1)
EMA (epithelialis membrán antigén)
Anticitokeratin (KL1, MNF 116)
BNH9 (vércsoport antigénnel kapcsolatos H és Y antigéneket detektál)
CBF 78 (normális timocitákon és T-sejtes tumorokon)
EBV LMP1 (latent membrán protein 1)
3. Anapláziás lymphoma kináz (ALK) specifikus markerek
Poliklonális (p80)
monoklonális (ALK1, ALKc)

1. táblázat. Legfontosabb immunhisztokémiai reakciók ALCL-ben

Az epithelialis membrán antigén (EMA) egy emlő mucin komplex, melyet az 1. kromoszóma MUC1 génje kódol (1q21-24). A hematolymphoid sejtek közül a plazmasejtek, a B-sejtes lymphoproliferatív betegségek közül a DLCL és a T-sejt-gazdag B-sejtes lymphoma expresszálják, az összes B-sejtes eset mintegy 10 %-ban. A T-sejtes lymphomában gyakrabban pozitív (22 %-ban), leginkább az ALCL-ben. Nagy esetszámot - 1043-at - feldolgozva (16) ALCL-ben az EMA 56,5 %-ban pozitív (T-sejtes esetben 67 %-ban, null-sejteseknél 48 %-ban, B-sejteseknél 29 %-ban). Az EMA pozitivitás jól korrelál az ALK pozitivitással, ez a párhuzam együtt jár azzal, hogy a fiatalkori illetve gyerekkori ALCL-es esetek zöme szintén EMA pozitív. Az ALCL altípusok közül minden histiocyta gazdag ALCL

EMA pozitív volt, ugyanakkor a ritka altípusok (neutrophil gazdag, microvillosus) EMA negatívak. Hodgkin lymphomában rendkívül ritka az EMA pozitivitás, mindössze a noduláris lymphocytá predománás altípusban észlelhető. A CD15 (granulocytá asszociált antigén, másnéven haptén X) a Hodgkin lymphomás esetek 80 %-ban pozitív, míg ALCL-ben mindössze 0-20 %-ban. (15)

Anticytokeratin antitesteket (KL1, MNF116) a metasztatizáló tumorok kizárására alkalmazzák, míg az ALCL-ben általában negatív, addig a karcinómákban többnyire pozitív. A glycoprotein és glycolipid szerkezetű vércsoport antigének közül a H és Y determinánsok expresszióját vizsgálták legszélesebb körben normál és malignus epitheliális sejteken. Valószínűleg szerepet játszanak az urotheliális karcinómák invazív viselkedésében. Hasonló feladatuk lehet bizonyos malignus lymphoproliferatív betegségekben. Kifejlesztettek egy monoklonális antitestet H és Y vércsoport antigén determinánsok ellen, BNH9 néven. (17) Míg ez a legtöbb lymphomában negatív (5,7 % pozitív), addig ALCL-ben 51 %-ban pozitív (gyerekkorban 71 %, felnőtt korban 42 % pozitív). Hodgkin lymphomában csak 6,9 %-ban pozitív (itt is a lymphocytá predománás esetekben gyakoribb a pozitivitás: 21 %). Hasonló segítséget nyújthat a CBF78 antitest alkalmazása az ALCL és a Hodgkin lymphoma elkülönítő diagnosztikájában (ALCL-ben 80 % körül pozitív, míg klasszikus Hodgkin lymphomában a pozitivitás < 10 %). (18)

Az Epstein-Barr vírus (EBV) Hodgkin lymphomával sokkal szorosabb összefüggést mutat, mint az ALCL-lel. Az EBV jelenlét jól korrelál az EBV-LMP1-el (látens membrán protein 1). Még biztosabb EBV diagnosztikai lépés az EBER-1 in situ hybridisatio módszer az EBER RNS kimutatására, illetve a PCR metodika EBER-1 igazolásra. Egy újabb tanulmány kis esetszámon azt mutatta, hogy EBER-1 pozitivitás az ALK negatív esetek 20 %-ban van jelen. Az ALK pozitív esetek közül a diffúz mag, magvacska, citoplazma ALK pozitív esetek között nem volt EBER-1 pozitivitás (ezekben NPM/ALK fúzió van jelen), míg a csak citoplazmatikus ALK pozitív esetek 60 %-ban. Ez a tény felveti az EBV etiológiai szerepét a t(2;5) transzlokáció nélküli ALK pozitív ALCL-ben. (19)

Mami Shiota és mtsai 1994-ben a t(2;5)(p23;q35) transzlokációval járó Ki-1 lymphomában egy 80 kD molekulatömegű hyperphosphorizált protein tirozin kinázt mutattak ki, melyet p80-nak neveztek el (20). 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 pozitívnek 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. Az anti-p80 antitest festés széles körben elterjedt. Egy évvel később egy japán multicentrikus vizsgálatban 105 ALCL-es mintán alkalmazva 30 esetben észleltek pozitívítást anti-p80 antitesttel (21). Tizenhat esetben a citoplazma, 7 esetben a mag és 7 esetben mind a mag, mind a citoplazma pozitív volt az anti-p80 festés során. További 50 nem ALCL-es lymphoma, illetve 20 Hodgkin lymphomás minta negatívnak bizonyult. Érdekes megfigyelés volt, hogy a p80 pozitív esetek fiatal életkorban fordultak elő és sokkal jobbak voltak a túlélési mutatók. 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 (22). A normál szövetek közül a központi idegrendszer egyes sejtjei voltak ALK1 pozitívak. Kettőszázharminckilenc lymphoma és 80 nem hemopoetikus tumor esetén vizsgálták meg az új antitestet. A 73 CD30 pozitív ALCL közül 39 (53,4 %) volt pozitív. Három CD30 negatív B-ALCL-t leszámítva minden más eset, beleértve a Hodgkin lymphomát, lymphomatoid papulosist is, negatívnak adódott. Később kimutattak néhány rhabdomyosarcomás és neuroblastomás esetet, valamint gyulladássos myofibroblastos tumort, melyben szintén pozitív volt az ALK1 festés.

A morfológiai altípusok közül a monomorf esetek 80 %-a, a kis sejtes variáns 75-100 %-a, a pleomorf szövettani típus mintegy 30 %-a ALK pozitív.

2.2.2. Molekuláris genetika

Nagy előrelépést jelentett a betegség patogenezisének pontos tisztázásában, amikor 1989-ben leírtak ALCL-es eseteket, melyben t(2;5)(p23;q35) transzlokáció volt megfigyelhető (23). Öt évvel később sikerült klónozni a fúziós gént, felismerésre került, hogy egy nucleophosmin (NPM) és egy anapláziás lymphoma kináz (ALK) nevű gén fúziójáról van szó. (24) Ettől kezdve az ALCL részletes molekuláris genetikai tanulmányozása nagy fordulatot vett, sorra jelentek meg újabb és újabb módszerek a genetikai eltérés pontos megismerésére. Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR), fluoreszcens in situ hybridisatio (FISH) és immunhisztokémiai módszerek kerültek kifejlesztésre egyre pontosabb eredményeket mutatva.

Az ALK gén a 2. kromoszóma rövid karján található (2p23). A vad ALK gén egy hosszú 200 kDa tömegű glikozilált transzmembrán receptort kódol, mely a leukocita tirozin kináz család tagja. (24) A receptor tirozin kinázok közül 17 alcsoport ismert, a X. csoportba tartoznak a

leukocita tirozin kináz-receptor család tagjai (25). A ligandot ezidáig nem sikerült felismerni. Élettani állapotban a gén csak a fejlődő és érett központi és perifériás idegrendszer sejtjein expresszálódik, normális funkciója ismeretlen. A citoplazmában és a sejtmembránon van jelen a teljes hosszúságú ALK. Az intracitoplazmatikus farka hordozza a tirozin kináz katalitikus domaint, mely fiziológiásan úgy aktiválódik, hogy a ligand kötés után homodimerizálódik. A másik vége a transzmembrán domain.

A vad NPM egy filogenetikailag konstans (konzervált) folyamatosan expresszálódó 37 kDa móltömegű savanyú foszfoproteint kódol, melyet B23-nak illetve numatrinnak is neveznek. Főként a sejtmagban található (26), ahol egy ezüsttel festődő nucleolaris proteinként van jelen (AgNOR). Az újonnan szintetizálódott fehérjéket szállítja a citoplazmából a magvacskába. Az N-terminálisnál lévő oligomerizációs motif és a C-terminálisnál levő kettő maglokalizációs jel feltétlenül szükséges a funkciója elvégzéséhez.

A t(2;5) translocatio során az NPM aminoterminális 1-116 aminosav fúzióval az ALK cytoplasmaticus régiójában található utolsó 563 aminosavval. (27) A transzlokáció során az ALK gén az NPM promotor kontrollja alá kerül, mely folyamatos NPM-ALK hibrid gén transzkripcióhoz vezet. Ennek terméke a 80 kDa-os kiméra protein az NPM-ALK. Az ALK-NPM reciprok der(2) nem íródik át. Az NPM-ALK fúziós fehérje tartalmazza az NPM oligomerizációs domainjét és az ALK intracitoplazmatikus régióját. Az NPM maglokalizációs domainje és az ALK extracelluláris, valamint transzmembrán domainje nincs a fúziós fehérjében. Az NPM-ALK kiméra protein homodimert alkot egy másik NPM-ALK-kal, vagy heterodimert alkot egy vad NPM-mel, mely a magba is bejuttatja a heterodimert. Amennyiben homodimer képződik, úgy az ALK katalitikus domainje konstitutívan aktiválódik, mintha ligand kötődött volna az ALK receptorhoz. (28) Kevésbé ismert a jelátviteli mechanizmus, mellyel az NPM-ALK dolgozik. A Phospholipase C- γ játszik valószínűleg fontos szerepet a tirozin foszforilációban, aktivációban, mely folyamatos mitotikus jelet biztosít. (29) A phosphatidylinositol-3-kinázhoz (PI-3-kináz) kapcsolódik az NPM-ALK fehérje és konstitutívan aktiválja az antiapoptotikus PI-3-kináz/Akt utat. (30,31) Kevésbé ismert más jelátviteli utakkal való kapcsolat, mint a krónikus myeloid leukémiában (CML) jelenleg sokat vizsgált STAT5 (32) vagy a CD30 intracelluláris domainje. (33) Shc és insulin receptor substrate-1 (IRS-1), valamint GRB2 fehérjéket is vizsgálják az NPM-ALK lymphoma genézisben betöltött szerepüket illetően. NPM-ALK-kal „transzfektált” egerek hemopoetikus sejtjeit, amennyiben beültetik szubletális dózissal sugárkezelt egerekbe, lymphoma fog kialakulni, de érdekes módon B-sejtes lymphoma, mely teljesen eltér a human, null/T fenotípusú ALK pozitív lymphomától (34,35).

Rendkívül fontos az immunhisztokémiai vizsgálat – korábban poliklonális anti p80-at, újabban monoklonális ALK1 illetve ALKc antitesteket használnak.

Az NPM-ALK fúziós fehérje a malignus sejtekben mind a magban, magvacskában, mind a citoplazmában is jelen van, melynek oka az NPM fehérje sejtmagba, nucleolusba szállító tulajdonsága. Az immunhisztokémiai festés során diffúz pozitivitás észlelhető a magban, magvacskában és a citoplazmában is. Ez figyelhető meg az ALK1 pozitív lymphomák 70-80%-ában. Ezzel szemben az ALK expresszáló ALCL-ek 15-20%-ban az ALK festődés csak a citoplazmára korlátozódik. (36) Mindebből adódott az a következtetés, miszerint az NPM-on kívül más fúziós partnere is lehet az ALK fehérjének.

Lamant (37) és munkatársai 1999-ben újabb t(1;2)(q25;p23) transzlokációt írtak le ALCL-ben, melyben egy non muscularis tropomyosin-nal (TPM3) fuzionál az ALK fehérje. Az 1q25-nél helyet foglaló TPM3 gén promoterként funkcionál és az ALK katalitikus domain-jének expresszálódását idézi elő, mely a proliferációért felelős. Ezt a TPM3 gént a tropomyosin receptor kináz (TRK) génnel történő fúziója miatt ismerik, mely humán papilláris pajzsmirigy karcinómában illetve colon karcinómában került felismerésre. A TPM3 gén kimutatására a 2. kromoszómán „walk”-PCR metodikát alkalmaztak a töréspont felé és így tudták kimutatni az ismeretlen gént az 1. kromoszómán. A tropomyosin egy aktin kötő fehérje, melyet először izomban mutattak ki, de nem izomsejtekben is jelen van. A citoskeleton mikrofilamentumok fő komponense nem izomsejtekben. Pontos szerepe nem ismert. Legalább 15 izoformja ismert, négy gén kódolja. A különbözőséget a szövetspecifikus alternatív RNS érés okozza. A TPM3 gén legalább 42 kb hosszúságú és 13 exont tartalmaz. A t(1,2) transzlokációban – hasonlóan a TPM3-TRK kiméragénhez - a TPM3 génen a töréspont egy 12 kb hosszúságú intronban van, mely a 7. és 8. exonok között helyezkedik el. A TPM3-ALK-ot, mint onkogen fúziós proteint kimutatták gyermekkori myofibroblastos gyulladós tumorban is. (38) Mindez azt bizonyítja, hogy a TPM3-ALK fúziós transzkript mind mesenchymalis, mind lymphoid human sejtvonalon képes malignus transzformációt létrehozni. (35) A kiméra fehérje 784 aminosavból áll, melynek első 221 aminosavát a TPM3 adja, a második 563-at az ALK, molekulatömege 104 kDa.

Hernandez és munkatársai 1999-ben (39) kimutatták az ALK egy másik fúziós partnerét. A „tropomyosin receptor kinase (TRK)-fused” gén (TFG) a 3. kromoszómán helyezkedik el. Ez a gén 3 különböző változatban fuzionálhat az ALK génnel. Az egyik egy 97 kDa tömegű fehérjét kódol: TFG-ALK (L), a másik egy kisebb, 85 kDa-osat: TFG-ALK (S). A

legújabbann leírásra került TFG változatban egy 113 kDa hosszúságú kiméra fehérje jön létre: TFG-ALK (XL) (40). A genomikus analízis alapján a TFG génben a töréspont a 3, 4, 5-ös intronokban van, míg az ALK génben konstans helyen. Mindhárom változat az NPM-ALK-hoz hasonlóan a Grb2, Shc és PLC-gamma jelátviteli mechanizmusokkal is dolgozik. A vad TFG konstitutíven expresszálódik számos különböző szövetben. Az ALK génnel történő transzlokációkor t(2;3)(p23;q21) jön létre. A TFG-ALK (L) esetben a fúziós fehérje 756 aminosavból áll (193 aminosavat a TFG, 563 aminosavat az ALK adja), molekulatömege 97 kDa.

Touriol és munkatársai 2000-ben (41) újabb fúziós partnert írtak le. Ebben a transzlokációban szintén citoplazmára korlátozódó finom granuláris ALK pozitivitás detektálható az ALCL-es sejtekben. Ez esetben a clathrin nehéz lánc gén (CLTCL) az ALK gén fúziós partnere. A clathrin az emlősökben konzervált struktúrájú nehéz és könnyű láncból áll és a „coated” vezikulák fő szerkezeti fehérjéje. A hidrolizáló enzimek szelektív intracelluláris transzportere. Ezek a vezikulumok vagy a plazmamembránból vagy a Golgi régióból képződnek. A gén a 22. kromoszómán a q11.2 régióban helyezkedik el és a „clathrin heavy polypeptide like chain”-t kódolja. Ugyanez a 22. kromoszómán levő fúziós gén transzlokálódik a DiGeorge szindróma / velocardiofacial szindrómában t(21;22)(p12;q11). Az ALCL-es transzlokáció tehát a t(2;22)(p23;q11.2), melynek során létrejött fúziós fehérje 2197 aminosavból áll, ebből 1634-et a CLTCL kódol, 562-t az ALK gén. A molekula tömege 248 kDa (viszonylag nagy fehérje). Újabb vizsgálatok szerint a transzlokáció nem a fenti kromoszómák között, hanem a 2. kromoszóma és a clathrin nehéz lánc gént érintve a 17. kromoszómák között zajlik le t(2;17)(p23;q11ter) transzlokációt létrehozva. A kiméra protein 250 kDa tömegű, és CLTC rövidítéssel illetik..

Szintén citoplazmára korlátozódó ALK pozitivitás észlelhető olyan ALCL-ben, melyben a molekuláris genetikai eltérés az inv(2)(p23;q35), ahol az ALK gén fúziós partnere az ATIC (5 aminoimidazol-4-carboxamid-1-beta-D-ribonucleotid transformylase/inosine monophosphate cytohydrolase. (42, 43, 44) Az ATIC a de novo purin nukleotid bioszintézisben szerepet játszó enzim. A fúziós fehérje 792 aminosavból áll, melynek első 229 aminosava az ATIC-ből, a második 563 az ALK-ból származik. Molekulasúlya 96 kDa.

Meech és munkatársai 2000-ben a (45) egy szokatlan gyermekkori ALCL-es esetet írtak le, melyben a t(2;19)(p23;p13) transzlokáció mutatható ki. Itt a TPM4 a fúziós partnere az ALK-

nak. Az eset érdekessége az, hogy natural killer sejt immunfenotípus és funkcionális sajátosságok voltak észlelhetők. Ezt a transzlokációt a myofibroblastos gyulladáshoz társított tumorban írták le.

2001-ben felfedezett ALK fúziós partner a moesin (MSN), mely az ezrin/radixin/moesin fehérjecsaldába tartozó sejtadhézióban és mozgásban szerepet játszó membrán protein. Ez a fehérje a sejtmembrán és a cytoskeleton közötti kapocs. A fúziós MSN-ALK fehérje 125 kDa tömegű. A transzlokációban az X kromoszóma vesz részt: t(X;2)(q11;p23) és annyiban tér el az eddigi transzlokációktól, hogy itt az ALK gén töréspontja abban az exonban van, mely a juxtamembránt kódoló génszakaszon van, vagyis 17 bázispárral közelebb az ALK 5' végéhez. Az 1005 aminosavból álló kiméra protein első 448 aminosavát adja a moesin, a többi 557 aminosav az ALK-ból származik. A fehérje molekulatömege 115 kDa. (46)

Az utóbbi 2 évben újabb 2 fúziós partnert írtak le: 2002-ben Cools és munkatársai (47) az ALO17-et (ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17) mutatta ki az ALK fúziós partnereként, mely egy ismeretlen funkciójú 1550/1599 aminosav hosszúságú fehérjét kódol (splicingtól függ). A pontos transzlokáció: t(2;17)(p23;q25).

Az ALK gén legújabb felfedezett fúziós partnere egy MYH9 nevű gén (48), mely egy nem izom eredetű myosin nehéz láncot kódol. Az ALK génben a töréspont máshol van, mint az eddig leírt esetekben. A kiméra fehérje 2201 aminosavból áll, molekulatömege 220 kDa. A MYH9-ALK fúzió a t(2;22)(p23;p11.2) transzlokáció során keletkezik.

Az ALK1 immunhisztokémiai festés pozitívítás minden esetben csak a citoplazmára korlátozódik, amennyiben az NPM-en kívül más az ALK fúziós partnere. Két esetben jellegzetes festődés észlelhető: CLTC-ALK esetében típusos citoplazmatikus granuláris pozitívítás látható, köszönhetően a „coated vesicles” felszínén megjelenő clathrinnak. A MSN-ALK esetében pedig sejt felszíni membránra szorítkozik csak a festődés, mivel a moesin egy sejtmembrán protein. A típusos NPM-ALK transzlokációval járó esetekben ezzel szemben erős citoplazma, mag és magvacskas festődés észlelhető ALK immunhisztokémiai vizsgálat során.

Az ALK pozitív tumorokat vizsgálva meglepő, ritka esetekre derült fény: rhabdomyosarcoma, neuroblastoma (49) és egy ritka B-sejt lymphoma típus is pozitívnak bizonyult. Ez utóbbi immunoblastos/plasmoblastos morfológiájú lymphoma, citoplazmatikus IgA expresszióval és

CD30 negativitással jár (50, 51). Ebben az esetben nem NPM-ALK fúziós fehérje van jelen, hanem a teljes hosszúságú (200 kDa), vad típusú ALK mutatható ki. A festődés a citoplazmában és a sejtmembránban volt jelen.

Az elmúlt években az anapláziás nagysejtes lymphoma kutatásában a leginkább keresett kérdés a jelátviteli mechanizmusok finom részleteinek megismerése. A tirozin kinázok specifikus inhibitorait bizonyos betegségekben – a krónicus myeloid leukémia (CML), Philadelphia pozitív akut lymphoid leukémia (ALL), stroma sejtes gyomor tumor – megtalálták, sőt már a klinikai gyakorlatban is hasznosítják. A legfontosabb onkogén tirozin kinázok a hematológiában a következők:

Tirozin kináz	Betegség
BCR/ABL	CML, ALL
TEL/ABL	AML
TEL/PDGFR	CMML
NPM/ALK	ALCL

2. táblázat. Fontosabb onkogen tirozin kinázok

Mindegyik onkogén tirozin kináz közös szerkezeti jellegzetessége, hogy a NH₂ terminális domain felelős a folyamatos, szabályozatlan oligomerizációért és aktivációért, a COOH terminális domain pedig maga a stimulált tirozin kináz.

Tekintettel arra, hogy az ALCL-ben is a tirozin kináz aktivitás felelős a malignus átalakulásért, kézenfekvő, hogy annak specifikus gátlói a betegséget gyógyíthatnák. A nagy gyógyszercégek ugyanakkor nem áldoznak annyit az anapláziás lymphoma kináz kutatására, mivel nagyságrenddel kevesebb beteget érintő problémáról van szó, mint a CML, ALL esetén. Ennek ellenére számos vonalon sikerült behatárolni azokat a molekulákat, melyek kulcsszerepet játszanak a proliferáció indukálásában, illetve az apoptózis gátlásában. Kimutatták, hogy az NPM-ALK folyamatosan aktiválja a foszfolipáz C γ -t (PLC γ), mely indukálja a sejtproliferációt. (52). Az NPM-ALK fehérje 664. pozíciójában helyet foglaló tirozinnal (Tyr664) kötődik a PLC γ SH2 domain-jéhez. Ez a Tyr664 elengedhetetlenül fontos az NPM-ALK indukálta mitogenicitáshoz. Amennyiben ezen a helyen mutáció történik, akkor az NPM-ALK elveszíti növekedési faktor independens proliferációs aktivitását. Mivel ez a 664. tirozin pozíció az egyetlen, ami az NPM-ALK mitogén szignáljához feltétlen szükséges, lehetőség van arra, hogy molekuláris szinten beavatkozzunk az NPM-ALK pozitív ALCL-es

betegek kezelésébe. Kimutatták, hogy nemcsak az NPM-ALK által transzformált egér lymphoid sejtvonalon (BaF3), de t(2;5) transzlokációt hordozó ALCL-es humán sejtvonalon (Karpas 299, SUDHL-1 és JB6), valamint ALCL-es betegektől frissen nyert ALK pozitív lymphoid sejtekben is a Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt jelátviteli útvonal stimulálódik. A PI3K p85-ös subunitjával lép kapcsolatba a NPM-ALK fúziós fehérje. Kettő inhibitorral találtak, melyek apoptosist indukálva szelektív módon tudták gátolni a PI3K-t. Az egyik ilyen szer, a Wortmannin a normál csontvelő sejtekre nem volt hatással. Ezzel bizonyítást nyert, hogy a PI3K antiapoptotikus hatása és kulcsszerepet játszik az NPM-ALK okozta malignus átalakulásban. (30)

Az ALK pozitív ALCL klinikopatológiai kutatásaiban új fejezetet jelent a betegek szérumában keringő anti-ALK és anti NPM-ALK antitestek vizsgálata. Speciális plazmidokkal átfertőznek majom epitheliális sejt kultúrákból készített citocentrifuga preparátumokat, majd ezeket inkubálják a betegek plazmáinak különböző hígításaival. Megvizsgálják, hogy létrejön-e immunprecipitáció. (53,54).

Az elmúlt 1-2 év legújabb molekuláris genetikai módszere, a DNS microarray technika az anaplázias nagysejtes lymphomát sem kerülte el (55). „Subtractive suppression hybridization” módszert alkalmazva feltérképezték az ALK pozitív COST sejt kultúra illetve ALK negatív ALCL-es betegek sejtjeiben azokat a géneket, melyek különbözőképpen expresszálódnak. Huszonkilenc ilyen cDNS szakaszt izoláltak és klónoztak.

2.3. ALCL klinikai jellegzetességei

Korábban az ALCL-t klinikai szempontból 4 csoportra osztották fel:

- Szisztémás forma (nodális, extranodális)
- Primer cutan forma
- HIV-related
- 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:

- ALK1 pozitív szisztémás ALCL
- ALK1 negatív szisztémás ALCL
- Primer cutan ALCL (ALK1 negatív)

Az elmúlt évek során az ALK1 festéssel egymástól klinikai viselkedés alapján számottevő különbséget mutató két fő típust lehet elkülöníteni.

2.3.1. ALK1 pozitív anapláziás nagysejtes lymphoma

Főként fiatalokat érinti a megbetegedés, döntően 30 éves életkornál fiatalabbakat. A gyerekkori ALCL-es esetek döntő többsége ALK1 pozitív.

A betegség dominálón a férfiaknál fordul elő. Nő – férfi arány 1 : 6,5. Az esetek mintegy 60 %-ban extranodális manifesztáció is jelen van. Leggyakrabban érintett szervek: bőr, csont, tüdő, pleura, gyomor-bél traktus, de ezek közül a gyomor érintettség viszonylag ritkább a többi gastrointestinalis lymphomához képest. Gyakran a betegség diagnosztizálása során III-IV. Ann Arbor stádiumban jelentkeznek a betegek, az esetek háromnegyed részében B-tünet is jelen van. Mindezen körülmények ellenére (előrehaladott, kiterjedt betegség) a prognózis a legtöbb irodalmi adat szerint szignifikánsan jobb az ALK1 negatív esetekhez képest (56)

Irodalom	Betegszám	ALK + arány (%)	5 éves túlélés ALK + (%)	5 éves túlélés ALK – (%)
Falini (57)	78	68	71±6	15±11
Gascoyne (51)	57	54	93	37
Shiota (21)	105	29	80	33
ten Berge (58)	42	31	100	45
Cataldo (59)	27	52	84	35
Greer (60)	65	68	66	61
Herling (61)	56	Na.	52	54

3. táblázat. ALK pozitív és negatív ALCL-es betegek túlélése, irodalmi adatok. Na: nincs adat.

2.3.2. ALK negatív anapláziás nagysejtes lymphoma

Idősebbek betegsége, kisebb a férfi/nő arány, ritkább az Ann Arbor-i III, IV. klinikai stádium és az extranodális manifesztáció. A túlélés lényegesen kedvezőtlenebb, mint az ALK pozitív esetekben (8, 56). Egy típusos, bulky nyaki nyirokcsomó megnagyobbodással járó esetet mutat az 1. ábra.

2.3.3. Primer cutan ALCL

A primer bőr ALCL különbözik a szisztémás ALCL-től mind a klinikumban, mind a betegség eredetében is (62). A primer cutan forma főként idősebbek megbetegedése (> 60 év), de novo bőr kiindulású. Az összes bőr lymphoma 9 %-át teszi ki. A tumor általában szoliter, aszimptomatikus, cutan vagy subcutan vöröses-lila színű, némelykor felszínesen kifekélyeződött. Jóval ritkábban multiplex megjelenésű a folyamat. Definíció szerint primer bőr ALCL az a folyamat, amikor nincsenek szisztémás tünetek, a folyamatot nem előzte meg sem lymphomatoid papulosis, sem mycosis fungoides vagy Hodgkin lymphoma. A regionális nyirokcsomó megnagyobbodás bonyolítja a képet, jelenlétük a folyamat megítélését megnehezíti. A szövettani vizsgálat a tumorsejtek dermist infiltráló nagy csoportját mutatja, mely a subcutisba is betérjedhet. A tumorsejtek inkább anapláziásak, mintsem monomorfak. Vascularis infiltráció jelen van, de destrukció nem észlelhető. Nehéz a folyamatot eldifferenciálni a lymphomatoid papulosistól (LyP), mely a cutan ALCL mellett a leggyakoribb CD30+ lymphoproliferatív betegség. A LyP általában multiplex kis papulákból áll (< 1 cm), többnyire a törzsön és a végtagokon jelentkeznek, gyakran kifekélyeződnek és 4-6 hét alatt heggel gyógyul. A LyP-nak 3 szövettani megjelenése ismert:

- a. Lymphocytákból, más gyulladáshoz vezető sejtekből és nagy atipusos CD30 pozitív, Reed-Sternberg szerű sejtekből áll.
- b. Sávyszerű epidermotrophismust mutató, kis-közepes nagyságú cerebriform lymphocytákból álló infiltráció, mely a klasszikus plakk stádiumú mycosis fungoidest utánozza
- c. Nagy, CD30 pozitív T-sejtekből felépülő homogén sejtpopuláció néhány gyulladáshoz vezető sejtrel.

Fontos elkülöníteni a szisztémás ALCL bőrmanifesztációját a primer bőr ALCL-től, mivel az 5 éves túlélés a szisztémás formában 29-44 %, szemben a primer cutan formával, ahol ez 90-100 %. Az előbbi rossz túlélés főként az ALK negatív esetekből adódik. A monomorf szöveti kép inkább szisztémás típusra utal. Kis esetszámon vizsgálva hasznos segítség lehet a clusterin nevű adhéziós molekula vizsgálata, mely a szisztémás típusban, különösen ALK pozitív esetekben gyakorlatilag 100 %-ban, míg a primer cutan formákban 41-56 %-ban pozitív, ugyanakkor DLCL-ben csak 12 %-ban, peripheriás T-sejtes lymphomában 7 %-ban, illetve Hodgkin lymphomában 3 %-ban pozitív (63,64). A primer cutan ALCL az esetek negyedében mutat spontán regressziót, ezért kezdetben a „figyelmes várakozás” elvét kell követni. Amennyiben mégis kezelést indikálnak, az többnyire sebészi eltávolítás, esetleg



1. ábra Bulky jobb oldali nyaki-submandibularis nyirokcsomó megnagyobbodás ALK negatív ALCL-s betegünkénél



2. ábra. Primer bőr ALCL-s betegünk. A betegség különböző fázisai láthatóak: bal alszáron szőlőfürtszerű tumorózus elváltozás, jobb alsó végtagon nagy kiterjedésű, kifehélyesedett, helyenként pörkkel fedett hatalmas tumor, a széli területeken markáns tumoros határvonal. radioterápia. Amennyiben multiplex bőrelváltozások lépnek fel, illetve a lokális nyirokcsomót beszűrő forma esetén kombinált kemoterápia jön szóba. Ez utóbbi esetekben gyakori a

relapszus. Saját beteganyagunkból mutatunk be két különböző stádiumban levő állapotot a 2. illetve 3. ábrán.



3. ábra. Primer bőr ALCL, tumoros burjánzás a lábszáron, proximálisan hipopigmentáltan gyógyult korábbi lézió.

2.3.4. Hodkin-like ALCL

Ezen entitás létjogosultságát taglalja a WHO klasszifikáció egyik fejezete. Érvek és ellenérvek sorakoznak fel mindkét oldalon. Az ALK pozitív esetekhez hasonlóan fiatalok betegsége, ugyanakkor számos klinikai vonatkozásban jelentősen eltér (8). Az ALK pozitív ALCL-hez képest sokkal gyakoribb a mediastinális érintettség, 60 %-ban bulky tumor képében jelentkezik, nagyobb arányú a II. stádium. Nem érinti sem a bőrt, sem a csontot. Mindezen klinikai tulajdonságok, illetve az hogy ALK negatívak, ugyanakkor gyakran BSAP (PAX-5 gén terméke: B-sejt specifikus aktivációs protein) azt sugallja, hogy valójában Hodgkin lymphomához tartozik, nem pedig az ALCL-hez.

2.3.5. HIV asszociált ALCL

A HIV infekcióhoz társuló ALCL ritka, főként neutrophil gazdag altípusú, T-fenotípusú és legtöbbször a bőrt érinti.

3. Az ALCL kezelése kemoterápiával

Az anapláziás nagysejtes lymphoma a többi nagy malignitású lymphomához hasonlóan nagy proliferációs készségű malignus betegség, mely kezelés nélkül gyorsan halálhoz vezet. Az elmúlt 2 évtized klinikai tapasztalatai egyértelműen bizonyították, hogy legcélszerűbb a kombinált kemoterápia, mégpedig anthracyclint tartalmazó, agresszív kezelés a választandó. Az utóbbi évek néhány ALCL terápiájával foglalkozó tanulmány legfontosabb eredményeit mutatja a 4. táblázat.

Szám	Kezelés	CR %	PR%	OS %hó	DFS%hó	Ref.
17	ProMACE-CytaBOM	62,5	12,5	66 (3év)	65	65
36	MOPP/EBV/CAD	78	6	69(74hó)		66
31	CHOP (22) + más	81 (48 % CCR)				67
31	Vegyes	91 (52 % CCR)		73 (2év)	39	68
16	F-MACHOP/Tx	100		45 hónál 100	100 (33hó)	69
15	CEEP-MINE/Tx	100 (CCR:100 % 68 hónál)				70
146*	ACVBP mBACOD	75		66 (5 év)		71
90	FMACHOP/MACOPB	70	18	63 hónál	74	72
82 gy	COPADM/VEBBP	95		83 (3év)	66	73
78	Vegyes	ALK+77,3	15	71±6		74
		ALK- 56	28	15±11		

4. táblázat. ALCL kezelése, válaszarány, túlélés irodalmi adatok alapján.

Szám: betegszám, CR. Komplet remisszió, PR: parciális remisszió, OS: összesített túlélés, DFS: betegség mentes túlélés, Ref: irodalmi hivatkozás.

A fenti táblázatból kitűnik, hogy mindinkább tért hódít az agresszív kemoterápia alkalmazása, szekvenciális nagy dózisu citosztatikumok használatával. Két tanulmányban is „frontline” hemopoetikus őssejt transzplantációt alkalmaztak. A terápiás válaszarány magas (62,5-100 %, de zömmel 90% körüli), a túlélési mutatók is rendkívül jók. Az elmúlt évtizedek számos lymphoma klasszifikációja közül egy kevésbé elterjedt beosztás a klinikai lefolyást tekintve elsődleges szempontnak. Figyelembe veszi ugyanakkor a patológiai, molekuláris genetikai viszonyokat is. Négy alcsoportot alkottak: „good”, „not so good”, not so bad” és

„bad”. E beosztás szerint az ALCL a jó prognózisú lymphomák közé tartozik, a nagy sejtesek közül a legjobb. (75)

3.1. Hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben

Európában összesen 451 centrumban végeztek 2001-ben hemopoetikus őssejtátültetést.

Ország	Magyar	Horvát	Cseh	Szlovák	Lengyel	Ausztria	Szlovén	Jugoszl	Orosz
Tx/10 ⁷ fő/év (1998)	71	198	377	180	78	386	82	21	6
Tx/10 ⁷ fő/év (1999)	101	184	405	207	106	384	111	30	9
Eü kiadás \$/fő ('99)	602	NA	904	NA	371	1793	743	NA	NA

Ország	Magyar	Német	Olasz	Francia	NagyBr	Spanyol	Svájc	Izrael	Görög
Tx/10 ⁷ fő/ év (1998)	71	434	500	501	355	508	363	791	165
Tx/10 ⁷ fő/ év (1999)	101	440	507	486	351	489	385	NA	181
Eü kiadás \$/fő ('99)	602	2339	1589	2103	1347	1168	2547	NA	974

5. táblázat Európai országok és hazánk 1998-as, 1999-es hemopoetikus őssejt transzplantációs mutatói 10 millió lakosra vonatkoztatva, illetve az egy főre eső egészségügyi kiadás adatai USA dollárban (76). NA: nincs adat

Hazánk hemopoetikus őssejt transzplantációs mutatói jelentősen elmaradnak az európai átlagtól, de még a környező országokétól is. Hazánkban 1998-ban 71, 1999-ben 101, 2001-

ben 128, 2002-ben 152/10 millió lakos transzplantáció történt. 2003-ban 210 transzplantációt végeztünk el. Összehasonlításképpen néhány ország adatát mutatja be az 5. táblázat.

A European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) - Európai csontvelő transzplantációs társaság legfrissebb adatai szerint Európában 2001-ben 18508 hemopoetikus őssejt transzplantáció történt. Ebből autológ 12335, allogén 6173 átültetés volt. Részletes adatok az ún. első transzplantációban részesült betegekről állnak rendelkezésre. Ez a szám 15581 volt a 2001-es évben. A diagnózisok szerinti felosztásban a leggyakoribb betegség a NHL volt (3479 eset), az összes transzplantáció 22,3 %-a. Ez az arány még nagyobb, ha az autológ átültetések arányát vizsgáljuk: 3083 NHL-s eset / 10173 összes autológ őssejt átültetés (30,3 %). Allogén átültetés mindössze 396 volt NHL-ban, ez az összes allogén átültetés (5408) 7,3 %-a. NHL-ban tehát az őssejt átültetések közül 88,6 %-ban autológ transzplantációra került sor (77).

Arról nem áll rendelkezésre adat, hogy a NHL-s betegek közül milyen arányban voltak az ALCL-es betegek. Egy 1999-es EBMT által közölt retrospektív tanulmányban 64 ALCL-es beteg (T- és null fenotípusú) autológ őssejt transzplantációról számolnak be (78).

Az előző fejezet táblázatában említett 2 tanulmányban a kemoterápiát követve, a remisszió elérése után azonnal transzplantációban részesültek a betegek. A rendkívül agresszív kezelés hatására 100 %-os teljes választ, összesített túlélést és betegség mentes túlélést sikerült elérni. Egy másik tanulmány kiemeli, hogy ugyan 2-5 %-os a transzplantációval összefüggő halálozás, mégis a rendkívül jó eredmények miatt ez a kezelési stratégia biztosítja a legjobb hosszú távú túlélést. Transzplantáció nélküli agresszív kezeléssel nem történt még prospektív összehasonlítás. Ezeknél az átültetéseknél még nem vették figyelembe, hogy az ALCL-nek van jó és rossz prognózisú formája. Tekintettel arra, hogy az ALK pozitív ALCL-nek nagyon jó a prognózisa a szerzők sem tudnak egyértelműen állást foglalni ezen alcsoportban a „front-line” transzplantáció szükségességéről. Kiterjedt, extranodális manifesztációval járó esetekben jó eredménnyel járhat az intenzív kemoterápiát követő autológ perifériás vérőssejt transzplantáció. Egyértelmű azonban a transzplantáció létjogosultsága a kemoszenzitív relapszusban (79).

4. Célkitűzések

Célunk volt az anapláziás nagysejtes lymphoma differenciál diagnosztikai nehézségei miatt a pontos szövettani besorolást elősegíteni az immunhisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokkal.

1. Paraffinos szövettani blokkokon ismételten elvégeztük a hematoxylin eosin festést, valamint számos immunhisztokémiai reakciót, köztük az ALK1 reakciót is.
2. Az ALK pozitív eseteknél megvizsgáltuk a festődés intracitoplazmatikus eloszlását, mely a specifikus molekuláris genetikai eltérésekre nézve is irányadó (NPM-ALK vagy egyéb fúziós partnerek).
3. Az ALK pozitív eseteknél egyéb kiegészítő immunhisztokémiai reakciókat is elvégeztünk a folyamat pontosabb igazolására (TIA-1, Perforin, Granzyme-B, CD68, ALK festés mag háttérfestés nélkül).
4. Elvégeztük a rendelkezésre álló fagyasztott mintákból izolált DNS-eken polimeráz láncreakcióval (PCR) a folyamatok genotípusának megállapítása céljából az immunglobulin nehéz lánc (IgH) és a T-sejt receptor (TCR) béta- illetve gamma génátrendeződés vizsgálatot.
5. Elvégeztük – magyar mintákon először – a t(2;5) és t(1;2) transzlokációk DNS alapú PCR vizsgálatát, valamint ezen minták reverz transzkriptáz (RT-PCR) vizsgálatát az extrahált RNS-ek felhasználásával.
6. Megvizsgáltuk PCR metodikával 33 ALCL-es és 28 B-sejtes lymphomás beteg perifériás véréből a multidrug rezisztencia (MDR) gén mutációjának (3435) gyakoriságát, 2 esetben csontvelő aspirátumból funkcionális MDR tesztet végeztünk. A genetikai eredményeket megvizsgáltuk a betegség lefolyása tekintetében. Értékeltek a kemoterápiás válasz, a kemorezisztencia és a relapszus gyakoriságát a különböző betegcsoportokban.
7. Szintén PCR-al 4, a vénás és artériás thrombembolia kialakulásában rizikó tényezőként szerepet játszó mutációt vizsgáltuk 43 ALCL-es és 22 B-sejtes nagy malignitású lymphomás beteg perifériás véréből (FV Leiden mutáció, Prothrombin G20210A mutáció, PIA2 allél, MTHFR C677T mutáció).
8. Citogenetikai vizsgálatot végeztünk 5 ALCL-es beteg csontvelő mintájából, 4 beteg nyirokcsomójából, illetve egy ALCL-es leukémiás beteg perifériás véréből.
9. Áramlási citometriai vizsgálatokat végeztünk 9 ALCL-es csontvelő mintán, valamint 17 ALCL-es beteg perifériás vérén T- és B-sejt markereket alkalmazva, továbbá 2 esetben funkcionális multidrug rezisztencia tesztet végeztünk.

10. Megvizsgáltuk 27 ALCL-es, 8 DLCL-es és 2 Hodgkin lymphomás beteg szérumát keringő NPM-ALK és ALK ellenes antitest irányában.
11. Létrehoztunk egy országos ALCL regisztert, melyben 179 beteg klinikopatológiai adatai állnak rendelkezésre. Megvizsgáltuk a legfontosabb demográfiai, klinikai, szövettani, kezelési és túlélési eredményeket.
12. Megvizsgáltuk a hazai 3 felnőtt transzplantációs centrumban végzett 23 ALCL-es beteg autológ hemopoetikus őssejt transzplantációs eredményét.

5. Vizsgálatok

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 Osztályától) volt módomban megvizsgálni.

5.1. Immunhisztokémia

A paraffinos blokkok közül hatot reparaffinálni kellett, részben a minta sérülése, részben mérete miatt. Microtommal 10 µm vastagságú szeleteket készítettünk, majd megkezdtük a hisztokémiai, immunhisztokémiai festéshez az előkészületeket.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz módosított Shi módszerrel (22) végeztük a paraffinos blokkokból az antigén előhívást. A metszeteket deparaffináltuk, műanyag edényekbe helyeztük, melyek 350 ml 10 mmol/l-es Na-citrát puffert (pH:6) tartalmazott. Mikrohullámú sütőben melegítettük 750 W-on 15 illetve 10 percre. Harminc perces lehűtés következett szobahőn. Vízben mostuk, majd az endogén peroxidázt blokkoltuk metanolban oldott 0,3 %-os hidrogén peroxiddal 30 percre. A metszeteket vízben, illetve PBS-ben öblítettük. ALK1 festést streptavidin-biotin-peroxidáz komplex módszerrel végeztük. Dako StreptABCComplex/HRP Duet (Mouse/Rabbit) kit (Dako, kód: No. K492; Copenhagen, Denmark).

Az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

1. Hematoxylin-eosin festés (HE)

Mind a 33 blokkból megtörtént a metszetek festése.

2. ALK1 festés

Mind a 33 blokkból megtörtént a metszetek festése.

3. Perforin festés

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

Ez utóbbi kiegészítő festéseket csak az ALK1 pozitív, illetve a bizonytalan, nem egyértelmű esetekben végeztük.

5.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

5.2.1. DNS és RNS izolálás

A megérkezett fagyasztott mintákat 3x3x4 cm-es műanyag tartályokba helyeztük. Minden mintát egy Tissue Tek (Sakura) nevű ragasztóval rögzítettük a „satuba” az elmozdulás megakadályozására. Kryostat microtommal -20 C-on 10µm vastagságú, átlagosan 8x5 mm-es szeleteket vágunk. Ilyen szeletből 10 került bele egy-egy microcentrifugacsőbe. Amennyiben a minta kisebb volt, akkor több szeletet vágunk. Minden mintából 4-4 lenyomati készítményt is félretettünk hematoxylin-eosin és ALK1 festés céljából, illetve tartaléknak. A minták lysisét két módszerrel végeztük. Amennyiben bőven rendelkezésre állt anyag, akkor úgynevezett SDS (Na-dodecyl sulphat), fenol/kloroform-os extrakciót, ha a minta nagyon kevés volt, akkor „csak fehérjeemésztős” DNS extrakciót alkalmaztunk, ugyanis az SDS gátolja a DNS polimerázt. Mindkét módszerben használtunk „lysis puffert”, Proteináz K-t (PK), EDTA-t, NaCl-ot. Általában a nyirokcsomó, nagyobb tumorszövet, csontvelő biopsziás mintákból az SDS-es módszer, liquor, bőr, csontvelő aspirátumból SDS nélküli módszer az alkalmasabb DNS izolálásra. Egyetlen mintánk volt olyan kis méretű, hogy SDS nélküli módszert kellett alkalmaznunk, itt 100 µl lysispuffert, 20 µl proteináz K-t tettünk a mintára. A többi mintához egy olyanelegyet adtunk hozzá, mely 350 µl lysispuffert, 50 µl proteináz K-t, 50 µl SDS-t tartalmazott. Éjszakára 37 C-on a rázóba helyeztük. Másnap a mintákat 5 percre 95 C-os vízfürdőbe helyeztük. Az egyetlen csontvelő aspirátumból készített Ficoll-os szeparátumot (15700, 2190) felolvasztás után 3 percig 9 C-on 3500 rpm-mel centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntését követően újabb 3 percig 11 C-on 3500 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszót ismét leöntöttük, majd a lysispuffert, SDS-t, PK-t adtuk hozzá 65 C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a fehérjeemésztést 5 perces 95 C-os vízfürdőbe helyezéssel állítottuk le. Innen a többi mintához hasonlóan folytattuk a műveleteket. Szemkontrollt alkalmaztunk, amelyik minta homogénnek tűnt – a fehérje megemésztődött – azokat hűtőbe helyeztük, amelyekben zavaros csomók maradtak, azokat 65 C-os vízfürdőbe helyeztük, egy-egy

mintába újabb 30 µl PK-t adtunk. A proteináz K-t kis porciókban (50 µl) lefagyasztva tárolták megakadályozva a korai megromlását.

Egyszerre 8 mintával dolgoztunk. Mindegyik cső mögé 2-2 újabb kis centrifugacsövet tettünk, megszámoztuk. Minden mintára 450 µl fenolt mértünk, majd 5 perces gépi „körrázást” alkalmaztunk. Ezután 18 C-on 5 percig 4500 rpm-mel centrifugáltuk Eppendorf Centrifuge 5810 R centrifugával. A felső réteget leszívtuk, a megszámozott újabb csövekbe tettük, az alsó réteget kidobtuk. A mintákra 450 µl fenol/kloroform 1:1 arányú elegyét mértük rá. 5 perc rázás után újabb 5 perc centrifugálás (18 C, 4500 rpm) következett. Kisebb pipettával a felülúszót ismét újabb csövekbe tettük, melyre ezúttal kloroform/isoamyl alkohol 49:1 arányú keverékéből 450 µl-t mértünk be. Már láthatóak voltak a DNS szálcsák. 5 perc rázás majd 5 perc előzőekkel megegyező centrifugálás következett. Óvatos felülúszó leszívás után 45 µl 2M-os NaCl-ot adtunk a mintához illetve 990 µl abszolút alkoholt. Jobbra-balra történő döntögetés során a „DNS-felhők” láthatóak voltak a mintában. Egy éjszakára –20 C-ra tettük a mintákat. Másnap reggel a mintákat 4 C-on 14000 rpm-el 15 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után 300 µl 70%-os etanolt adunk hozzá, 15 perces újabb centrifugálás következett 4 C-on 14000 rpm-mel. Ezután kicsepegtettük belőle az alkoholt, óvatosan tiszta papírra ráütögettük, majd fejjel lefelé a laminár boxban – ahol eddig is az összes műveletet végeztük – száradni hagytuk a nyitott csöveket. Időközben a maradék mintákon elvégeztük a teljes műveletsort. Továbbra is nagyon ügyelve a kontamináció elkerülésére a kiszáradt DNS mintákra gyári puffert (TE 1x koncentrációjú) adagoltunk 100 µl/ minta, ahol nagyon kevésnek tűnt a DNS ott csak 70 µl-t. A kis centrifuga csöveket óvatosan pöcögtettük, majd egy éjszakára ismét a „körrázóba” helyeztük.

Mivel az immunhisztokémiai reakció kiértékelése során a 34 paraffinos blokkból 4 bizonyult első vizsgálat során ALK pozitívnak, DNS izolálást kezdtünk ezekből a mintákból is. Ezúttal egy másik – paraffinba ágyazott anyagok metszésére alkalmas – géppel végeztük a szeletelést hasonló technikával. Ezúttal 5 µm vastag 20 metszetet helyeztünk a microcentrifugacsőbe. A metszetekre 1 ml xylene-t tettünk, mellyel 5 percig ráztuk, majd 18 C-on 5 percig 8000 rpm-mel centrifugáltuk. Két alkalommal megismételtük a xylenes rázást és centrifugálást, majd 1 ml abszolút alkoholt tettünk a mintához, 2 perc rázás után 18 C-on 8000 rpm-mel 5 perc centrifugálás következett. Ezt a műveletet megismételtük, majd leszívtuk, eltávolítottuk az alkoholt. Egy ml SDS nélküli lysispuffert adtunk a mintához (Tris 1M; pH:7,5 25 ml, EDTA 0,5 M; pH:8 10 ml, NaCl 1M 50 ml, Lithium carbonat 1 g, 4x autoklávozott H₂O 500 ml-re hígítva). Ezután 15 perc pihentetés, majd hasonló centrifugálás (5 perc 18 C, 8000 rpm) után a felülúszó leöntése következett.

Sor-Szám	A260	DNS konc. ng/ µl	1000/DNS koncentr.	200 ng/ µl-hez DNS µl	200 ng/ µl-hez TE µl
2176	0,232	1160	0,862	17,24	82,76
2177	0,236	1180	0,847	16,94	83,06
2178	0,214	1070	0,935	18,7	81,3
2179	0,146	730	1,370	27,4	72,6
2180	0,201	1010	0,990	19,8	80,2
2181	0,124	620	1,613	32,26	67,74
2182	0,189	950	1,053	21,06	78,94
2183	0,347	1740	0,575	11,5	88,5
2184	0,131	650	1,538	30,76	69,24
2185	0,151	760	1,316	26,32	73,68
2186a	Lysis	X	X	X	X
2186b	0,176	880	1,136	22,72	77,28
2187a	0,090	450	2,222	44,44	55,56
2187b	0,295	1470	0,680	13,6	86,4
2188	0,387	1930	0,518	10,36	89,64
2189	0,133	660	1,515	30,3	69,7
2190	0,109	550	1,818	36,36	63,64
2191a	0,452	2260	0,442	8,84	91,16
2191b	0,222	1110	0,901	18,02	81,98
2192F	0,525	2620	0,382	38,2*	61,8*
2193F	0,129	650	1,538	153,8*	0*

6. táblázat Munkatáblázat (DNS mennyiség kiszámítása)

A 2192F és a 2193F minták paraffinos blokkból izolált minták voltak.

*: a paraffinos blokkból izolált mintákon a DNS koncentrációt nem 200ng/µl-re, hanem 1 µg/µl-re állítottuk be. A DNS koncentráció értékét az A260x50x100 képlettel számoltuk ki, ahol az 50-es érték a DNS fényelnyelési faktora, a 100-as érték a 100x-os hígításból adódik.

Mivel az utolsó mintában a kívánt végvolumennél (100 µl) több volt a DNS mennyisége, a PCR során a bemért víz mennyisége kisebb lett.

Lithium carbonatot nem tartalmazó lysispufferből 450 µl-t, proteináz K-ból 125 µl-t mértünk az oldathoz, mely 50 C-os vízfürdőben egy úszó lyukas szivacs lapba dugva egy éjszakát pihent. A lysatumokból biztonsági tartaléknak lefagyasztottunk 125 µl-t. Ezután a fagyasztott mintákkal megegyező fenol, fenol/kloroform, kloroform/isoamyl alkohol extrakciók következtek, majd a 2 M-os NaCl, illetve a különböző töménységű alkohol kezelések következtek a centrifugálásokkal. Lecsepegtetés, szárítás után 100 µl TE puffert tettünk a mintákhoz. Ebből az oldatból 1 µl-t kivettünk és 99 µl desztillált vízbe tettük. A DNS koncentráció mérés ebből az oldatból történt fotométerrel. A DNS koncentrációt úgy állítottuk be, hogy az 200 ng/µl legyen. A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) ebből kellett mintánként 2,5 µl-t kimérni, így 500 ng DNS került bele a PCR elegybe mintánként. Az RNS extrakcióhoz a kereskedelemben kapható RNeasy Mini Kit (Quiagen) technikát alkalmaztunk.

5.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatok

5.2.2.1. 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.

A fent jelzett 21 mintán (2176-2193F) kívül az utolsó kettőből 2-2 mintán, valamint 12 Toulouse-i anyagon végeztük el a PCR-t az alábbi kondíciók szerint:

Anyag	H₂O	dNTP	TP10x	MgCl₂	8+primer	9-primer	Taq	DNS
MI	28,25	8	5	5	0,5	0,5	0,25	2,5
Σ µl	988,75	280	175	175	17,5	17,5	8,75	35x2,5



Ebből a hat anyagból áll az ún. mix, melyből 19,25 µl-nyit mértük rá az egyes csövekbe előre bemért 28,25 µl vízre. A DNS mennyisége PCR elegyenként 2,5 µl volt. A két primer szekvenciája a következő volt:

Raf 8 +: 5'-GAT GCA ATT CGA AGT CAC AGC G-3'

Raf 9 -: 5'-TTT TCT CCT GGG TCC CAG ATA-3'

Két-két csepp steril ásványi olajjal zártuk le a csöveket, megakadályoztuk a kontaminációt. A csövek alufóliázott kis csőtartó állványon sorakoztak, mely jégzúzalékban állt. „Hot start” után indult a PCR 34 ciklusa, Gold Taq-ot alkalmaztunk, célja a nem specifikus amplifikátumok elkerülése. A DNS polimeráz csak az első denaturáció után válik aktívvá. A denaturáció 93 C-on, az annealing 54 C-on, az elongáció 72 C-on történt.

Két százalékos agaróz elektroforézissel, ethidium bromiddal UV fény alatt vizualizáltuk az amplifikátumot. PCR során az amplifikációs band-et a 258 bp fragmentumnál észleltük. RT-PCR során kettő amplifikátum képződik, az egyik 148 bp az RNS, illetve a cDNS, míg egy 258 bp hosszúságú a genomikus DNS amplifikátuma, mivel a DNS-t nem távolítjuk el az RNS extrakció során DNS emésztéssel.

Az összes fagyasztott mintából nyert DNS jól amplifikálódott. A paraffinos blokkokból extrahált DNS-ek ugyanakkor nem voltak használhatók további vizsgálatokra. Ez azért is nagyon sajnálatos, mert időközben felkészültünk a Southern blot-ra, melyen a 15404-es csak citoplazma lokalizációban észlelt ALK1 pozitívítású esetet kívántuk tovább tanulmányozni. Elviekben fennállt annak a lehetősége, hogy vagy egy ritka transzlokáció típus, vagy egy korábban eddig nem ismert transzlokációt mutathattunk volna ki. Amersham Pharmacia Biotech Hybound-N pozitív töltésű nylon membránját használtuk a Southern blot vizsgálatra.

5.2.2.2. Imunglobulin nehéz lánc génátrendeződés (IgH)

A B-sejtes lymphoproliferatív betegségek klonális eredetének bizonyítására seminested PCR technikát alkalmaztunk Trainor illetve Ramasamy módszerével. (80,81) E két módszer során a FRII-VH illetve a FRIII-VH specifikus band-ek nyerhetők, míg Aubin metodikáját követve (82) a FRI régiót is amplifikáltuk.

Az alábbi primereket használtuk:

FR1c: 5'-AGG TGC AGC TG(G/C) (A/T)G(G/C) AGT C(G/A/T)G G-3'

FR2a: 5'-TGG (A/G)TC CG(C/A) CAG (G/C)C(T/C) (T/C)CN GG-3'

FR3a: 5'-ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT-3'

LJH: 5'-TGA GGA GAC GGT GAC C-3'

VLJH: 5'-GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG-3'

A PCR kondíciók a következők voltak: 35 ciklus 10 perces hot starttal (93 C), denaturáció 93 C, annealing 50 C a FR2a/JH-nál, 54 C a FR1c/JH és FR3a/JH esetén, elongáció 72 C. Minden lépés 1 percig tartott, végső elongáció 10 percig 72 C-on.

A vizsgálat szenzitivitása – klonálisan átrendeződött B-sejtes populáció - $\geq 1\%$ az összes polyclonalis B-sejt közül, mely a nyirokcsomókban normálisan jelen vannak, míg az összes mononuclearis csontvelői sejt közül $\geq 0,1\%$.

5.2.2.3. T-sejt receptor génátrendeződés (TCR)

5.2.2.3.1. TCR-béta

A T-sejt receptor- β génátrendeződést két lépéses PCR-val végeztük McCarthy módszerével (83). A két diversity (D) szegmens közül a D β 1, a 13 J régió szegmense közül a J β 2 átrendeződését vizsgáltuk az első, a variábilis V β és szintén a J β 2 átrendeződését a második lépésben. Az alábbi primereket alkalmaztuk:

D β 1: 5'-CAAAGC TGT AAC ATT GTG GGG AC-3'

J β 2: 5'-AGC AC(C/T/G) GTG AGC C(T/G)G GTG CC-3'

V β : 5'-TGT A(C/T)C TCT GTC GTG CCA GCA G-3'

A kondíciók a következők voltak: denaturálás 93 C-on 1 perc, D β 1/ J β 2: annealing 59 C-on, V β /J β 2: annealing 53 C-on egyaránt 1-1 perc, elongáció 73 C-on 1 perc, 30 ciklus, majd egy végső 10 perces elongáció. A PCR termékek várható nagysága 55-100 bp közötti.

5.2.2.3.2. TCR-gamma

A T-sejt receptor- γ génátrendeződést kettős (γ 1 és γ 2), un. multiplex PCR-ral, seminested technikával végeztük összesen 7 primer felhasználásával (83). A alábbi szekvenciákat tartalmazó primereket alkalmaztuk:

V γ I cons: 5'-CTG GTA CCT ACA CCA GGA GGG GAA-3'

V γ 9.2: 5'-GAA AGG AAT CTG GCA TTC CG-3'

V γ 10: 5'-GCA GCA TGG GTA AGA CAA GC-3'

V γ 11: 5'-GAT TGC TCA GGT GGG AAG AC-3'

J γ 2S2: 5'-CCT GTG ACA ACA AGT GTT GT-3'

JP: 5'-TTG TTC CGG GAC CAA ATA CC-3'

JP1/2: 5'-CCA GGT GAA GTT ACT ATG AG-3'

A primerekből 2 keveréket készítettünk: Pmix1: V γ I cons, J γ 2S2, JP és JP1/2, Pmix2: V γ 9.2, V γ 10, V γ 11, J γ 2S2, JP és JP1/2.

Az első, γ_1 nevű PCR-hoz az alábbi anyagokat használtuk:

Anyag	H ₂ O	dNTP	TP10x	MgCl ₂	DMSO	Pmix1	Taq	DNS
MI	23	8	5	5	5	0,5	0,25	2,5
$\Sigma \mu\text{l}$	782	272	170	170	170	17	8,5	34x2,5

A második, γ_2 nevű PCR csak a primer keverékben tér el az elsőtől:

Anyag	H ₂ O	dNTP	TP10x	MgCl ₂	DMSO	Pmix2	Taq	DNS
MI	23	8	5	5	5	0,5	0,25	2,5
$\Sigma \mu\text{l}$	782	272	170	170	170	17	8,5	34x2,5

Mindkét esetben a denaturálás 93 C-on, az annealing 55 C-on, az elongáció 72 C-on történt. Úgynevezett seminested PCR-t alkalmaztunk, mely azt jelenti, hogy az első amplifikátum 1 %-a volt a második PCR templátja újabb 35 ciklusban az elsővel megegyező PCR kondíciók szerint.

5.2.2.4. Kromoszóma transzlokációs PCR vizsgálatok

5.2.2.4.1. t(2;5) transzlokáció

Az ALK pozitív anapláziás 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 (85), melynek során az első amplifikátum 1-2 %-a (0,5-1 μl) volt a 2. PCR templátja, akkor a nagyobb adag, ha az amplifikátum nem túl nagy. Az első PCR-hoz az alábbi primereket használtuk:

5'NPM: 5'-TCC CTT GGG GGC TTT GAA ATA ACA CC-3'

ALK1: 5'-GCC AGC AAA GCA GTA GTT GGG GTT G-3'

A második PCR-hoz pedig az előzővel megegyezően 5'NPM primert, illetve:

ALK2: 5'-GTC GAG GTG CGG AGC TTG CTC AGC 3' -t.

Az alábbi anyagokat használtuk a vizsgálathoz mintánként:

Anyag	H ₂ O	dNTP	TP10x	MgCl ₂	5'NPM	ALK1	Taq	DNS
MI	25,25	8	5	5	2	2	0,25	2,5

A második PCR-hoz mivel az első amplifikátumból 0,5 µl DNS-t használtunk, ezért a víz mennyisége 2 µl-rel több volt, itt az ALK2 primer volt az 5'NPM primer párja:

Anyag	H ₂ O	dNTP	TP10x	MgCl ₂	5'NPM	ALK2	Taq	DNS
MI	27,25	8	5	5	2	2	0,25	0,5

Természetesen negatív kontrollként használtunk „vak” mintaként vizet, a másik negatív kontroll (T-) egy reaktív T sejt mintából nyert DNS, a pozitív kontroll pedig a SU DHL1 ALK pozitív anapláziás nagysejtes lymphoma sejtvonalból nyert DNS volt. A PCR kondíciók az alábbiak voltak: 5 perces 94 C-os hot start, majd a program: 30” 94 C, 3’ 68 C 35 cikluson keresztül, majd 8’ 72 C-os elongáció befejezésként. Látható, hogy az eddigi PCR-októl eltérően nincs harmadik hőmérséklet – mely általában 54-55 C – hanem csak kétfajta hőmérsékleten történik a program. A mintákat 4 C-on tároltuk a vizsgálat után. A második PCR kondíciói annyiban tértek el az elsőtől, hogy a 94 C-os denaturálás 20”-ig, a 68 C-os annealing és elongáció 5’-ig tartott, a hot start és a végső elongációs idő megegyezett az első PCR-ban használt időtartamokkal. Az elektroforézis 1 %-os agarózon történt 125-140 V feszültségen. Ha nagyobb a gél, akkor a nagyobb feszültséget alkalmazzuk. Mólsúly markerként SL markert alkalmaztunk, mely 102-104 bp súlyú minták jelölésére alkalmas.

5.2.2.4.2. 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 (37):

Az első PCR primerei:

cTPM1: 5'-CGA GAA GTT GAG GGA GAA AGG 3'

ALK1: 5'-GCC AGC AAA GCA GTA GTT GGG GTT G-3'

Öt perces DNS denaturálás és AmpliTaq Gold DNS polimeráz aktiválás után (94 C-on) 30 ciklus következett: 45'' 94 C denaturálás, 45'' 62 C annealing és 45'' 72 C elongáció, a végén 8 perc további elongáció 72 C-on.

A második PCR során az első PCR termékéből 1 µl-t használtunk templátként. A primerek a következők voltak:

cTPM3: 5'-CTG GCA GAG TCC CGT TGC CGA G-3'

ALK2: 5'-GTC GAG GTG CGG AGC TTG CTC AGC 3'

A PCR kondíciók az előzővel megegyeztek. A PCR termékek hossza 300 bp.

5.2.3. Elektroforézis

A polyacrylamid gélelektroforézishez ún. heteroduplex analízist végeztünk (86), melynek során a PCR amplifikátumokból 20-20 µl-t Eppendorf csőbe mértünk, 5 percig denaturáltuk 94 C-on, majd renaturáltuk 60 percig 4 C-on (jégbe tettük). Ezután 3 µl 4 C-ra hűtött bromfenol-kék és 10-szeres töménységű xylen cyanolt adtunk hozzá, majd azonnal nem denaturáló polyacrylamid gélen indítottuk a futtatást.

Polyacrylamide gélt alkalmaztunk

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.

A 2%-os agaróz gélt úgy készítettük, hogy 6 g agarózt 300 ml TBE 1x oldatba tettük, majd jól összekevertük. Mikrohullámú sütőben 2x2 percig főztük 600 wattal. Kétszer 150 ml-t öntöttünk ki az elektroforetikus tartályba.

Marker 4 mólsúly markert alkalmaztunk, mely kék színű, minden DNS amplifikátumra 5-5 µl-t mértünk rá. Ez a festék a $0,47-8,79 \times 10^5$ dalton mólsúlyú anyagokat festi meg. Az elektroforézishez minden „lyukba” a már megfestett DNS amplifikátumból 20-20 µl-t rétegeztünk.

GIBCO BRL electrophoresis power supply áramforrásról 125 V feszültség mellett indult a futtatás függőleges irányban, amennyiben polyacrylamid gélelektroforézist alkalmaztunk.

Az agaróz elektroforézis vízszintes irányú, itt is 5 µl Marker 4-et mértünk az amplifikátumra, itt is 20-20 µl megfestett amplifikátumot mértünk az elektroforézis „lyukaeskáiba”. Az FR2a elektroforézisbe 18 µl-t, a TCR-β elektroforézishez 30 µl-t mértünk be. A DNS mérete és elektroforetikus futási tulajdonságok alapján változik a bemért amplifikátum mennyiség. Mindkét fajta elektroforézisnél a futtatási idő 4-4,5 óra volt. A géleket háromszor mostuk 20 percig desztillált vízben, majd a migrációs mintázatot UV fény alatt polaroid kamerával rögzítettük.

5.2.4. Multidrug rezisztencia gén vizsgálata

A malignus hematológiai betegségek kezelésekor az esetek döntő többségében kezdetben jó terápiás választ sikerül elérni. A remissziót követően azonban gyakran relapszus lép fel, ekkor a tumorsejtek ellenállókká válnak a citosztatikumokkal szemben. A rezisztens tumorsejtek már kezdetben jelen lehetnek és a kisselektálódott daganat sejtek klonális expanziója alakul ki. A másik lehetőség, hogy a tumorsejtekben egy spontán mutáció lép fel, mely szintén túlélési előnyt nyújt a sejt számára. Ezen folyamatok hátterében a multidrug rezisztencia (MDR) mechanizmus áll. A tumorsejtek gyakran kereszt rezisztenciát mutatnak az egymással szerkezeti hasonlóságot nem mutató citosztatikummal szemben. Ilyen szerek az anthracyclinek (doxorubicin, daunoblastin, idarubicin), epipodophyllotoxinok (etoposid, teniposid), a vinca-alkaloidák (vincristin, vinblastin), a taxanok (taxol, taxotere) és az amsacrin. Általában ezek a szerek kicsi, hydrophob molekulák. Az antimetabolitok (methotrexate, cytosin arabinosid), az alkiláló szerek (melphalan, chlorambucil, cyclophosphamid) és a platina készítmények ellen más gyógyszer rezisztencia mechanizmusok fejlődtek ki. Különböző enzimek szintje változik meg a gyógyszer lebontás fokozására: Glutathion-S-transzferáz, Glutathion peroxidáz, deoxycytidine kináz, topoisomeráz IIa.5, illetve egyéb fehérjék expressziója fokozódik: „multidrug resistance associated protein” (MRP), lung resistance protein (LRP). A legismertebb fehérje, mely részt vesz a MDR-ben a P-glycoprotein (P-gp). Ezt a 170 kDa molekulatömegű, 1280 aminosavból álló proteint az *mdr1* gén kódolja, mely a 7. kromoszómán foglal helyet (7q36). A *mdr3* gén szintén a P-gp-t kódolja és szintén a 7. kromoszómán található, mégis csak az *mdr1* által kódolt fehérje felelős a drogok membránon keresztüli kipumpálásában. A P-gp az „ATP-binding cassette” (ABC) transzporterek családjába tartozik. Két szerkezetileg homológ részből áll, a fehérje foszforilációja szükséges a drog efflux-hoz. A P-gp nem egy egyszerű pompa,

hanem a membránban aktívan (ATP dependens módon) nyomja ki a szubsztrátját, mely nagy számú amfipatikus, hydrophob anyag lehet. Az elmúlt években számos anyaggal próbálkoztak gátolni a gyógyszer kipumpálást. Ilyenek voltak bizonyos Ca-antagonisták, melyek közül a legtöbb tapasztalat a verapamillal született. A másik leginkább vizsgált MDR gátló anyag a cyclosporin A és annak analógjai. (Klinikánk is részt vett egy fázis II vizsgálatban, ahol a PSC 833 nevű készítmény hatásosságát vizsgáltuk akut leukémiás betegeknél). Ezen szerek kompetitíven gátolják a P-gp-t. Több módszert kidolgoztak a MDR vizsgálatára: in situ hybridisatio, PCR, RT-PCR, immuncitokémia, áramlási citometria különböző festékekkel (MRK 16, U1C1), rhodamin retenció.

A PTE ÁOK Központi Klinikai Kémiai Laboratóriumában végeztük a molekuláris genetikai vizsgálatokat. Az MDR-1 gén 26. exonjában, a 3435-ös pozícióban bekövetkező pontmutáció kimutatására LC-RPCR-t (light cycler real time polimeráz láncreakció) alkalmaztunk (87). Ez egy egy lépéses genotipizálás, ahol a PCR-t kombináljuk egy fluoreszcens próbával, mely a DNS olvadáspontját (melting point) analizálja. A betegekben kialakult „single nucleotid polymorphismust” (SNP) detektáltuk. A vad típusban a jelzett helyen (3435) cytosin van: agatCgtga, míg a mutáns változatban timin: agatTgtga. (88). A bázis kicserélődése ugyan nem hoz létre aminosav szekvencia változást, azonban a géntermék – P-glycoprotein – expressziójának a mértéke módosul. Azt feltételezik, hogy a változás az MDR-1 gén szabályozó „promoter/enhancer” régiójában következik be, vagy a mRNS érését koordináló régióban. Mindenesetre a C3536T polimorfizmus az MDR-1 expressziójában, aktivitásában megnyilvánul. A homozygota T/T alléllal rendelkező betegeknél kisebb az MDR kialakulásának kockázata, a homozygota C/C allélú betegeknél viszont a rizikó jelentősen fokozódik. A heterozygota esetekben (C/T) az MDR kialakulásának esélye a két érték közötti. Az eredeti közleményben a 188 egészséges önkéntes donor között 48,3 % volt a heterozygota, 23 % a homozygota mutáns (88). Hasonlóak az eredmények egy másik német intézetben végzett vizsgálat szerint: homozygota 3435C allél 29/126 (23 %), heterozygota 59/126 (46,8 %) és homozygota 3435T 38/126 (30,2 %). (87). Egy másik tanulmányban 461 önkéntes közül 53,9 % volt heterozygota, 17,5 %-ban homozygota C/C. (89)

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 vérből Maniatis módszer szerint kisózásos technikával 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. A módszer PCR alapon dolgozik, lényege az, hogy homozygota T minta esetén 55 C-on, homozygota C esetén 64 C-on, heterozygota T,C minta esetén 55 és 64 C-on történik fluoreszcens oligonucleotid hybridizációja a különböző allélekhez. A számítógépes program konvertálja a fluoreszcencia adatokat az olvadáspontok derivált eredményei alapján kirajzolva a tipikus görbéket a polimorfizmus szerint.

5.2.5. 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. Értékeltek a betegség során fellépő thrombemboliás eseményeket, azok súlyosságát. Annak ellenére, hogy a genetikai eltérések a normál populációval megegyező gyakorisággal volt észlelhető a thrombosis előfordulás kisebb volt. Ez annak köszönhető, hogy a kemoterápia során rutinszerűen alkalmaztunk kis molekula tömegű heparint profilaktikus dózisban. 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.

A betegektől vakuténeres csőbe levett EDTA-val alvadásgátolt vérből, illetve szűrőpapírra kicseppentett vérből kisózással technikával nyertünk DNS-t (90).

5.2.5.1. Factor V Leiden mutáció

A PCR technika során az alábbi primereket használtuk:

5'-GGG CTAATA GGA CTA CTT CTA ATC 3'

5'-TCT CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA 3'

PCR kondíciók: 5 perc 94 C-on, majd 30 ciklus 1 perc denaturáció 93 C, 30" annealing 61 C, 90" elongáció 72 C. A PCR-ral 161 bp hosszúságú szakaszt amplifikáltunk. Ezen DNS szakaszon 1 olyan szekvencia található, mely az Mnl1 restrikciós enzimmel emészthető. Amennyiben a vad típusú gén van jelen, akkor egy 43 bp és egy 118 bp hosszúságú szakasz jön létre. Leiden mutáció esetén, amikor az 506-os pozícióban van báziscsere, akkor nincs hasítás az Mnl1 enzim hatására, marad a 161 bp hosszúságú génszakasz. A két allélon

egymástól függetlenül végbe mehet mutáció. Ezek alapján a Factor V Leiden mutáció szempontjából heterozygota esetben létrejön 118 bp, 43 bp és 161 bp hosszúságú, homozygota Leiden mutáció esetén csak 161 bp hosszúságú génszakasz. Az elektroforézist 1 %-os agaróz gélen végeztük ethidium bromid festéssel, majd UV fény megvilágítás mellett polaroid fénykép készült.

5.2.5.2. Prothrombin G20210A mutáció

Prothrombin gén mutációt szintén PCR technikával vizsgáltuk a korábban extrahált DNS-ek felhasználásával. A PCR technika során az alábbi primereket használtuk:

5'-TAT AGA AAC AGT TGC CTG CCT GGC 3'

5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA 3'

PCR kondíciók: 10 perc 96 C, 10 perc 55 C, majd 30 ciklus 3 perc elongáció 72 C, 45'' denaturáció 97 C, 1 perc annealing 55 C, majd 10 perc végső elongáció.

A PCR vizsgálat során 345 bp hosszúságú amplifikátumot nyertünk. HINDIII nevű restrikciós enzimet használtunk. Ebben az esetben a normális allél nem emésztődött, míg mutáció esetén egy 322 bp és egy 23 bp nagyságú szakasz jön létre.

5.2.5.3. PIA2 allél mutáció

PLA2 gén mutációt szintén PCR technikával vizsgáltuk a korábban izolált DNS-eken. Az alábbi primereket használtuk:

5'-TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT 3'

5'-TCT GAT TGC TGG ACT TCT CTT 3'

Az amplifikátum 266 bp hosszúságú, emésztését MspI restrikciós enzimmal végeztük.

Háromféle eredményt kaptunk:

PIA1 allél: 221 bp és 45 bp génszakaszok

PIA1/A2 allél: 176 bp, 50bp és 45 bp fragmentumok

PIA2 allél: 221 bp, 176 bp, 50 bp és 45 bp hosszúságú termékek.

5.2.5.4. MTHFR C677T mutáció

Methyl-tetrahydrofolsav reductáz (MTHFR) enzim mutációt a korábban kinyert DNS-ek felhasználásával PCR technikával vizsgáltuk. Primerek:

5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'

5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'

PCR koníciók: 5 perc 94 C, majd 35 ciklusban 1 perc denaturáció 93 C-on, 30” annealing 62 C-on, 1,5 perc elongáció 72 C-on. A végső elongáció is ezen a hőfokon történt 3 percig. Az amplifikátum 15 µl-t emésztettük 0,5 U HinfI restriktív enzimmel 3,5 órán keresztül 37 C-on. Normális esetben elmarad a hasítás és 198 bp hosszúságú termékünk marad, míg mutáció során egy 175 bp és egy 23 bp hosszúságú fragmenset nyerünk.

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.

5.3. Citogenetikai vizsgálatok

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

Mintavétel

A beteg oldalfekvő helyzetében 5 mg midazolammal történő intravénás bódítást követően a crista iliaca posterior superiorból dezinficiálás, a terület steril izolálása, Lidocainos érzéstelenítés után Baxter csontvelőbiopsziás tűvel történik a mintavétel. Általában szövettani mintavétellel egyidőben történik a citogenetikai anyagnyerés is. A csonthenger után ugyanazon szűrőcsatornából következik a citogenetikai mintavétel. Ehhez és az anyag szállításához Leibovitz L-15 médiumot vagy csontvelő transzfer oldatot használunk, változatlanul steril körülmények között (L-15 médium /Leibovitz/ Sigma L 5520, kiegészítve foetal calf szérummal (FCS), tartósítószer mentes heparinnal, penicillinnel-streptomycinnel és L-glutaminnal; vagy Bone marrow transfer solution, Sigma B 6426, ez utóbbihoz kiegészítők nem szükségesek). A csontvelő mennyisége kb. 2 ml, a médium vagy transzfer oldat mennyisége 4-5 ml.

Inkubálások

- a. A sejtszámtól függően 200-500 µl csontvelő szuszpenziót (5×10^6 sejt/cső és 4,8-4,6 ml RPMI 1640-t tenyésztő csövekbe mérünk. A sejttenyésztő médium szintén tartalmazza az L-15 médiumnál leírt kiegészítőket. (FCS stb.)
- b. A direkt módszernél 10 µl BrdU-val és 10 µl ethidium bromiddal/ml tenyésztési szuszpenzió arányban 90 perces inkubálás történik 37 C-on. (BrdU: Sigma B5002 törzsoldata 10 mg/ml desztillált víz, munkahígítása 32 µl törzsoldat 10 ml RPMI 1640 médiumban,

amelyből 10 µl-t mérünk a csontvelő kultúrákhoz mililiterenként. Ethidium bromid: Sigma E8751, törzsoldata 10 mg/10 ml RPMI 1640, felhasználáskor ebből is 10 µl/ml kultúra).

c. Mitózis felfüggesztése colchicinnel történik 60 percig 37 C-on. (törzsoldata 1 mg/10 ml desztillált vízben, munkahígítása ennek 20-szorosa, melyből 75 µl-t használunk 5 ml sejttenyészethez (Sigma C9754).

d. Centrifugálásos ülepítés (10 perc 1800-2000 rpm) után felülúszó eltávolítása, majd a sejtes üledék hypotonizálását végezzük KCl 0,075 M-os oldatával 37 C-on 30 percig. Újabb centrifugálással (1800-2000 RPMI) nyert ülepítményt Carnoy fixálóval mossuk 3-4-szer 10-10 percig. Az utolsó ülepítés után a Carnoy fixálóval egy kissé opálos szuszpenziót készítünk, melyet 20 percig -20 C-on pihentetünk. Carnoy fixáló: metanol és jégcet 3:1 arányú keveréke (Methanol: Carlo Elba gyártmány, 99,9 % HPLC grade, No 67-56-1, Ecetsav: Merck gyártmányú, 100 % puriss.)

Tárgylemezek készítése

Éter-methanol keverékével (7:3 és 1.1 arányban), valamint methanollal tisztított tárgylemezeket használunk, amiket előzőleg -20 C-ra hűtünk. A Carnoy fixálás szuszpenzióból 1-2 cseppnyit cseppentünk a lemezre, majd megszárítjuk, megfestjük.

Festés

Leishmann festést alkalmazunk, melynek során elsőként 2 órás 2xSSC pufferes 65 C-os inkubálás, öblítés, majd metanolban oldott Leishmann festékekkel 5 perces festés, csapvízes öblítés utáni szárítás következik. (Leishmann festék: Sigma 6254 – eosin-polychrome methylene blue)

Értékelés

A vizsgálatot akkor tekintjük értékelhetőnek, ha legalább 10 metafázis megfigyelhető.

5.4. Áramlási citometriai vizsgálatok

A PTE ÁOK Klinikai Kémiai Intézetében, illetve a PTE ÁOK Patológiai Intézetében végeztük a vizsgálatokat. Az áramlási citometriás (FCM) vizsgálatokat sejtszuszenziókon alkalmazunk. Segítségével a mikroszkópos vizsgálatnál nagyságrenddel több sejt vizsgálható automatizált módszerrel. A sejtek nagyságának és granularitásának különbözőségét fényszórási tulajdonságok alapján detektálja a készülék. 17 beteg perifériás vér és 9 csontvelő aspirátumból lymphocytá Ficoll szeparálással nyert szuszpenzióján immunfenotipizálást végeztünk FCM segítségével. Sejtfelszíni és intracelluláris antigének kimutatását fluoreszcens immunológiai jelöléssel végezzük. A legfontosabb felhasznált sejtfelszíni antigének: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD45, CD56.

5.5. 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, mivel a vizsgálati módszert 2000-ben közölte Pulford (53) és a betegek egy részénél a kezelés évekkorábban történt. 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 serumával 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.

6. 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, hajás 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

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

	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 1 45/139 2 28/139 3 22/139 4 20/139 5 1/139	16,5 32,4 20,1 15,8 14,4 0,7
Nyacs méret (cm)		4,6 (1-15)

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

Az első 40 magyar ALCL-es beteg klinikai adatairól a regiszter meghirdetése után 1 évvel már beszámoltunk (91)

Az anapláziás nagysejtes lymphoma regiszter 19 adatközlő centrumán kívül további 2 központ ígerte az információk elküldését. További kisebb centrumokban ezidáig nem kezeltek ALCL-es beteget.

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			

9. 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.

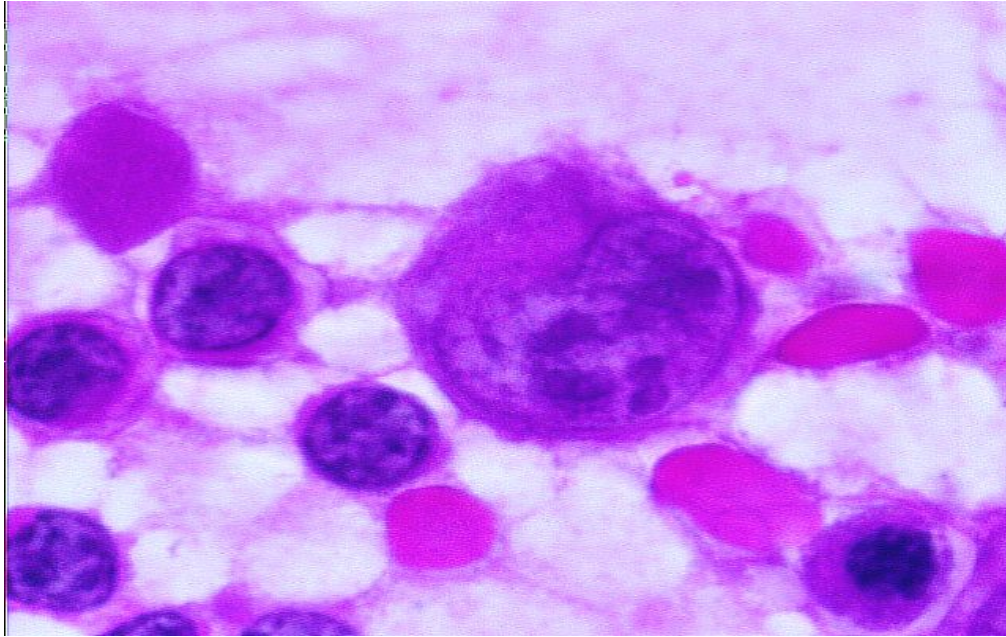
A fenotípus eredmények mellett – melyeket a sejtfelszíni vonalspecifikus markerek felhasználásával végeztünk (lásd a 4.1. fejezet) – a korábban közölt genotípus vizsgálatok (92) további kiegészítést nyújthatnak a folyamat sejteredetének kiderítésében. A 7.2.1. fejezetben láthatóak a részletek.

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 %).

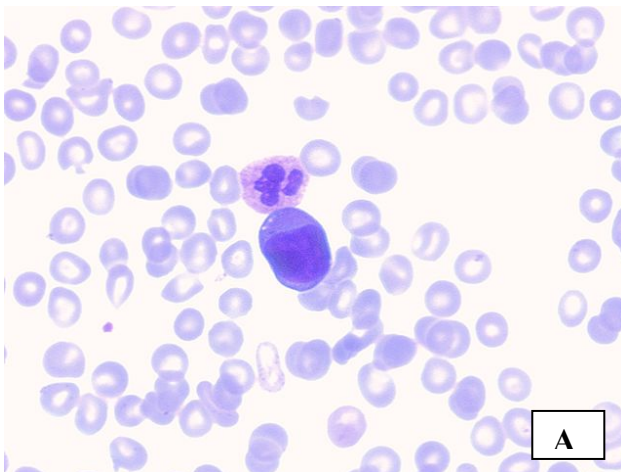
Az anapláziás nagysejtes lymphoma klinikai megjelenésében feltűnő a gyakori extranodális manifesztáció (93). A hazai beteganyagban az irodalmi adatokkal egyezően leggyakrabban érintett szervek a bőr, csontvelő, csont és a tüdő voltak (94), részleteket lásd a 10. táblázatban.

Bőr: 25	Csontvelő: 25	Csont: 14
Tüdő: 12	Gyomor: 5	Pleura, pericardium: 6
Lép: 5	Bél: 4	Máj: 3
Gingiva: 2	Epipharynx: 2	Meninx: 2 (4. ábra)
Agy: 1	Peritoneum: 1	Vese: 1
Vér (leukémia): 1 (5. ábra)	Emlő: 1	Izom: 1
Kettős extranodális: 23	Hármas extranodális: 6	Primer extranodális: 11

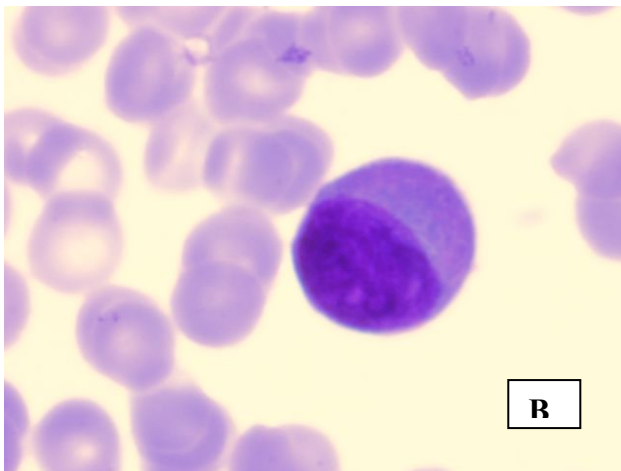
10. táblázat. Extranodális manifesztációk



4. ábra ALK pozitív lymphomás beteg meningeális relapszusa során észlelt nucleolusokat tartalmazó, nagy anapláziás blast sejt, May-Grünwald Giemsa festés 1000 x nagyítás.



A



B

5. ábra ALK negatív ALCL-es beteg ALCL-es leukémiás perifériás kenete. May-Grünwald Giemsa festés A. 400 x nagyítás, B. 1000 x nagyítás. A citoplazmában vakuolumok, a magban nucleolusok láthatóak.

7. Anapláziás nagysejtes lymphoma kezelés hazánkban

7.1. Kemoterápia

A magyar ALCL regiszter adatai szerint a betegek döntő többsége (94 %) kombinált kemoterápiában részesült, mindössze 2 betegnél történt a „watch and see” elv követése, 6 beteg priméren radioterápiát kapott, 2 betegnél a tumor sebészi eltávolítására került sor. Az esetek több, mint felében a „gold standardként” CHOP-alapú kezelést alkalmaztak. Ezek közül összesen 2 beteg kapott nagy dózisú CHOP kezelést, 51-en klasszikus CHOP-t, 12-en CHOP-Bleo-t, 7-en CNOP-t (ebben az esetben anthracyclinként mitoxantronet használtak), 5-en CHOEP-t (CHOP kiegészítve etoposiddal), 5-en egyéb, hasonló kezelést. 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

11. 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. Az esetek 24,3 %-ban – a parciális remisszióban lévő betegeknél – radioterápiára került sor a maradék tumor eltüntetését célozva. A fenti táblázatban látható – az elsődleges terápiában leggyakrabban alkalmazott – két kezelést (CHOP és ProMACE-CytaBOM) „second line”-ként is alkalmaznak (11 illetve 9,8 %). További 13 beteg egyéb kezeléseket kapott. A második választott kezelés hatására a

betegek 38,4 %-a került komplett remisszióba, 27,4 %-a parciális remisszióba, 32,3 %-nál progresszió volt megfigyelhető.

7.2. Autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció ALCL-ben hazánkban

Magyarországon 5 hemopoetikus őssejt transzplantáló centrum van. Budapesten az Országos Gyógyintézeti Központban (korábbi neve Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet) és a László Kórházban működik transzplantációs munkacsoport, az utóbbi gyermek és felnőttkori betegekkel is foglalkozik, mindkét helyen autológ és allogén átültetés egyaránt folyik. Miskolcon a Gyermekegészségügyi Központ Onkohematológiai és Csontvelőtranszplantációs Osztályán végeznek gyermekkori esetekben allogén és autológ átültetést. Klinikánkon az első átültetést 1999. decemberben végeztük. Az első évben 14, a másodikban 18, majd 24 transzplantációt, 2003-ban 31 transzplantációt végezhetünk. Az ország legfiatalabb transzplantációs osztálya a Debreceni Tudományi Egyetem II. Belklinikán 2003. szeptemberben kezdte meg működését. Ez utóbbi 2 központ csak autológ átültetéssel foglalkozik.

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 12. 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	5,88	21/23	13/10
% (-)	14-53	20-57	68 %	81 %	29%	57 %	2-12	91 %	57 %

12. 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	Össejt- forrás Perif	Perif. CD34 x 10 ⁶ /kg
Szám	9 10	16	10 12	13 8	15 4	17 (*2)	5,12
% (-)	39 % 43 %	70 %	43 % 52 %	57 % 35 %	79 % 21 %	85 %	1,01- 13,8

13. táblázat. Autológ hemopoetikus össejtátültetési 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, *1: 2 betegnél perifériás össejt 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.

8. Eredmények értékelése

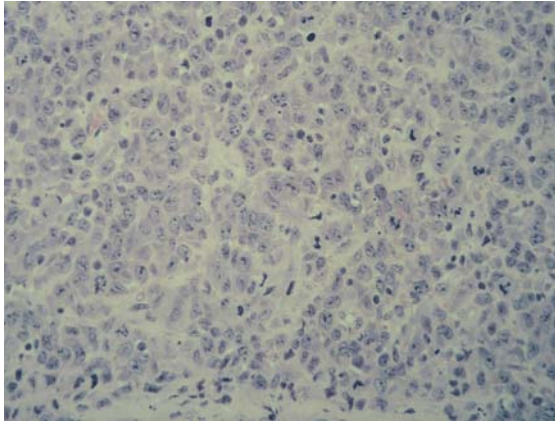
8.1. Immunhisztokémiai eredmények

A magyar ALCL regiszterben 179 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 (93, 94, 95) ennek az aránynak a dupláját említik a T/null lymphomások között. Valószínűleg a morfológiai, illetve immunhisztokémiai vizsgálatok bővítésével (pl. BNH9, CBF 78, EMA)

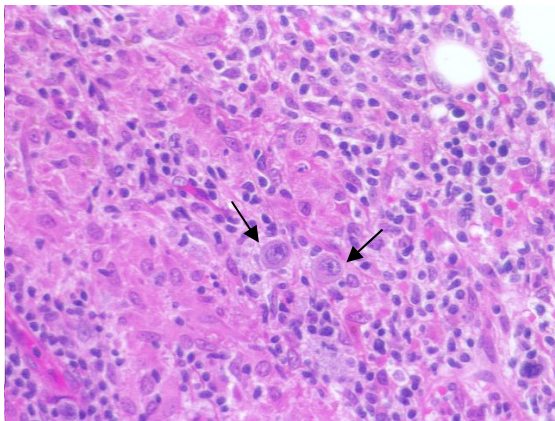
az ALCL-es esetek száma anyagunkban csökkenne. ALCL-nek diagnosztizált esetek egy része minden bizonnyal Hodgkin lymphoma ún. „tumorsejt gazdag” altípus, illetve perifériás T-sejtes lymphoma, mely entitásokban az ALK1 természetesen negatív. A 6. ábrán egy common type, az 7. ábrán egy lymphohistiocytas, a 8. ábrán egy kissejtes, a 9. ábrán egy eosinophil gazdag szövettani altípusba sorolt ALCL-es esetünk látható. CD30 immunhisztokémiai reakcióval jellegzetes sinusoidalis infiltrációt mutat be a 10. ábra.

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

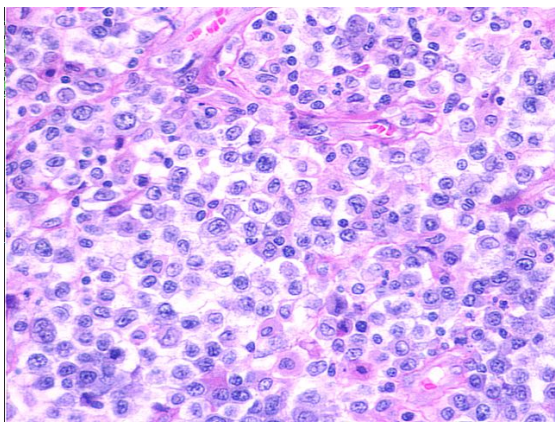
A Toulouse-ban megvizsgált 35 ALCL-es paraffinos blokkból készített metszeteken végzett ALK1 festés során pozitívnak ítélt 6 esetenél, valamint 1 t(2;5) transzlokáció pozitív fagyasztott anyagon kiegészítő immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Az egyik „paraffinos” metszet végül a megismételt ALK1 festés során negatívnak bizonyult. Az első vizsgálattal a háttér neutrofil peroxidáz reakciók adhatták az álpozitív reakciót. Egy esetben adódott a folyamat monocita marker pozitívnak (CD68), ugyanakkor morfológiailag egy másik eset is lymphohistiocytas képet mutatott. A citotoxikus markerek közül, melyek ALCL-ben történt vizsgálatairól hazai szerzők is beszámoltak (98) 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 (11. ábra), mely arra utalt, hogy t(2;5) transzlokációval, vagyis nucleophosmin-anapláziás lymphoma kináz gének fúziójával állunk szemben. Egyetlen esetben észleltünk kizárólag citoplazma festődést (12. ábra), 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 tudtunk molekuláris genetikai vizsgálatokat (PCR, Southern blot) elvégezni, pedig annak a lehetősége is megvolt, hogy egy teljesen új transzlokációt fedezünk fel.



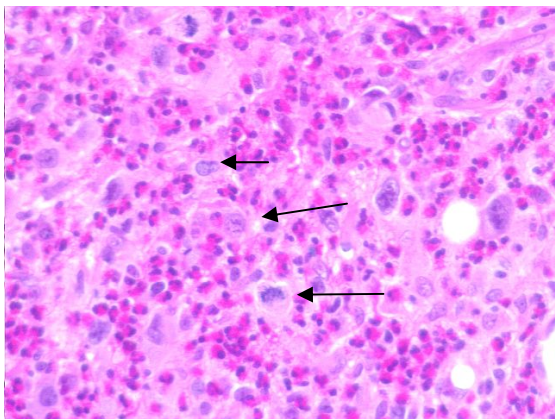
6. ábra Common type ALCL,
hematoxylin-eosin festés 32 x nagyítás.
Láthatóak a monomorf középnagy
anapláziás morfológiájú tumorsejtek.



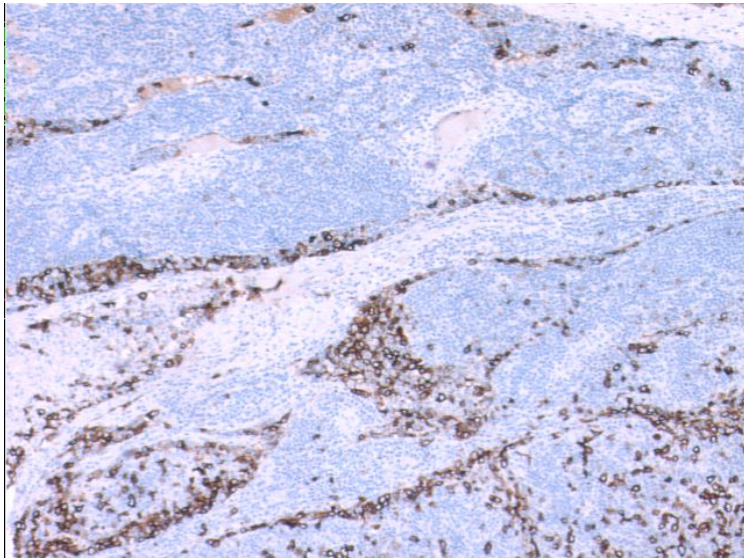
7. ábra Lymphohistiocytosis altípusú
ALCL. A világos területek a histiocyták.
Köztük láthatóak a tumorsejtek (nyilak).



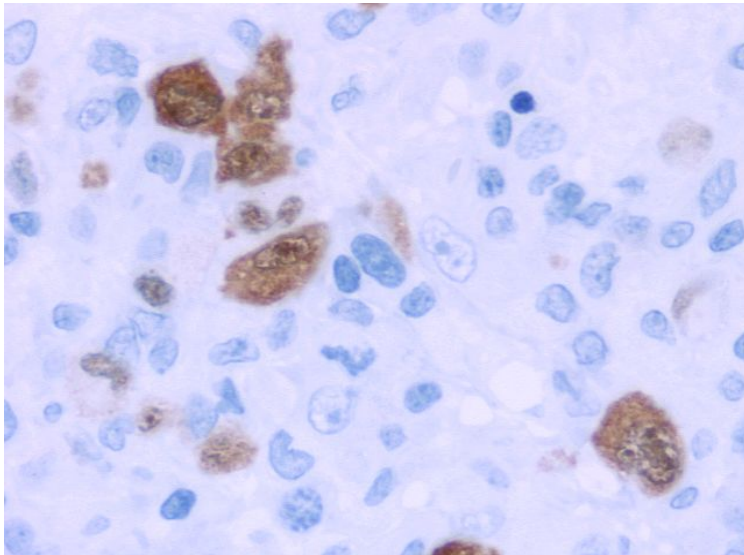
8. ábra ALCL kissejtes altípus.
A monomorph tumorsejtek az előző
ábrákban látottaknál kisebb méretűek.



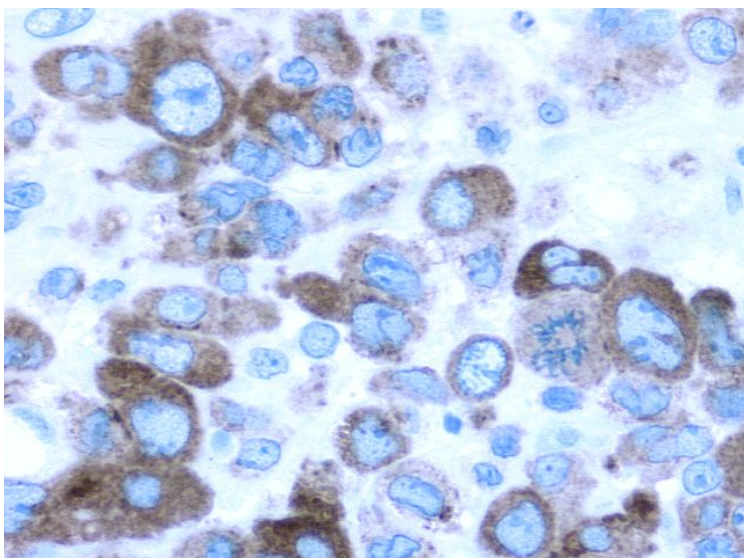
9. ábra ALCL eosinophil gazdag forma.
Rendkívül sok eosinophil sejt veszi körül
a tumorsejteket. (A tumorsejteket nyilak
jelzik) Az alsó kettő osztódó sejt.



10. ábra Jellegzetes sinusoidalis infiltráció. CD30 monoklonális antitest festés.



11. ábra ALK1 monoklonális antitest festés. Feltűnő, hogy intenzíven festődik mind a citoplazma, mind a mag, mind a nucleolus. Ebben az esetben t(2;5)(p23;q35) transzlokáció áll a háttérben. 400 x nagyítás.



12. ábra ALK1 monoklonális antitest festés. Feltűnő, hogy csak a citoplazma festődik intenzíven, a mag és a nucleolus nem pozitív. Ebben az esetben az ALK egyéb fúziós partnerei vesznek részt a transzlokációban. 400 x nagyítás.

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

14. 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 találtunk.

8.2. 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. A molekuláris genetikai eredményekről az

Orvosi Hetilapban illetve a Pathology Oncology Research-ben számoltunk be (99,100). Részletek a 8.2.1. és 8.2.2. fejezetben olvashatók.

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

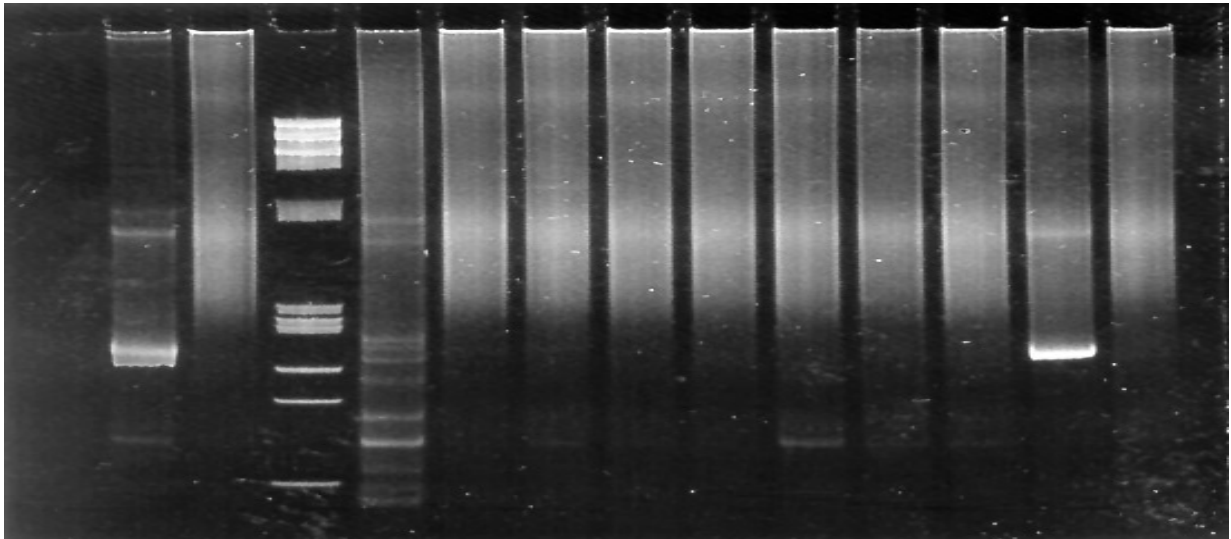
15. táblázat. Toulouse-ban genotípus vizsgáláson részt vett minták szövettani megoszlása

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.

8.2.1. Génátrendeződési vizsgálatok eredményei

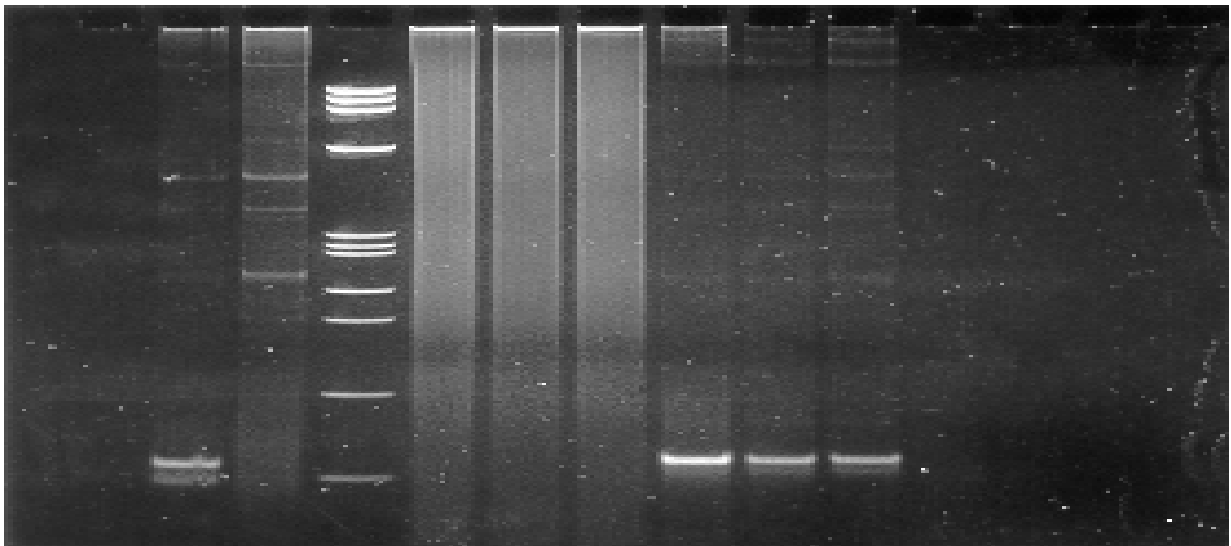
A 16 fagyasztott minta mindegyikén elvégeztük mindhárom immunglobulin nehéz lánc (IgH) génátrendeződési (FR1c/JH, FR2a/JH, FR3a/JH) és mindkét T-sejt receptor (TCR- β , TCR- γ) génátrendeződési PCR vizsgálatot. Még a génátrendeződési vizsgálatok előtt az ún. Housekeeping génekkel végeztük el a PCR vizsgálatot, minden esetben PCR vizsgálatra alkalmas, amplifikálható DNS-t sikerült extrahálnunk. Amennyiben a 3 IgH génátrendeződés közül legalább egynél pozitivitást észleltünk, akkor a folyamatot bizonyítottan B-sejtesnek tartottuk (13. ábra). Hasonlóan, a TCR vizsgálatok közül akár a TCR- β , akár a TCR- γ PCR pozitívnek adódott, az eset T-sejtes genotípusú (14. ábra).

Vak M P M4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



13. ábra IgH génátrendeződés PCR vizsgálata (FR2a/VLJH). A 9. sávban észlelhető pozitívítás. M: monoklonális, P: poliklonális, M4: mólsúlymarker.

Vak T+ P M4 1 2 3 4 5 6 7 8



14. ábra TCR-béta génátrendeződési PCR vizsgálata (Vbéta/Jbéta). A 4-6. sávok pozitívak (monoklonális génátrendeződést mutatnak), francia betegek mintái. T+: monoklonális TCR béta génátrendeződés pozitív, P: poliklonális, M4: mólsúlymarker.

Vizsgálat	FR1c/JH	FR2a/JH	FR3a/JH	TCR- γ (γ I vagy γ II)	TCR- β (V β /J β vagy D β /J β)
+/összes	5/16	5/16	2/16	5*/16	3/16 (csak D β /J β +))

16. 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- β génátrendeződés PCR-ok közül csak a D β /J β módszerrel észleltünk pozitivitást, a V β /J β -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- γ II-vel mutattunk ki) 2 beteg mintája volt pozitív mind a TCR- β , mind TCR- γ vizsgálatral (egyiknél csak a TCR- γ I volt pozitív a TCR- β mellett, míg a másikon mindkét TCR- γ pozitív volt). Öt esetben a pozitív TCR génátrendeződést háromszor megismételtük, mellyel konfirmáltuk az eredményeket.

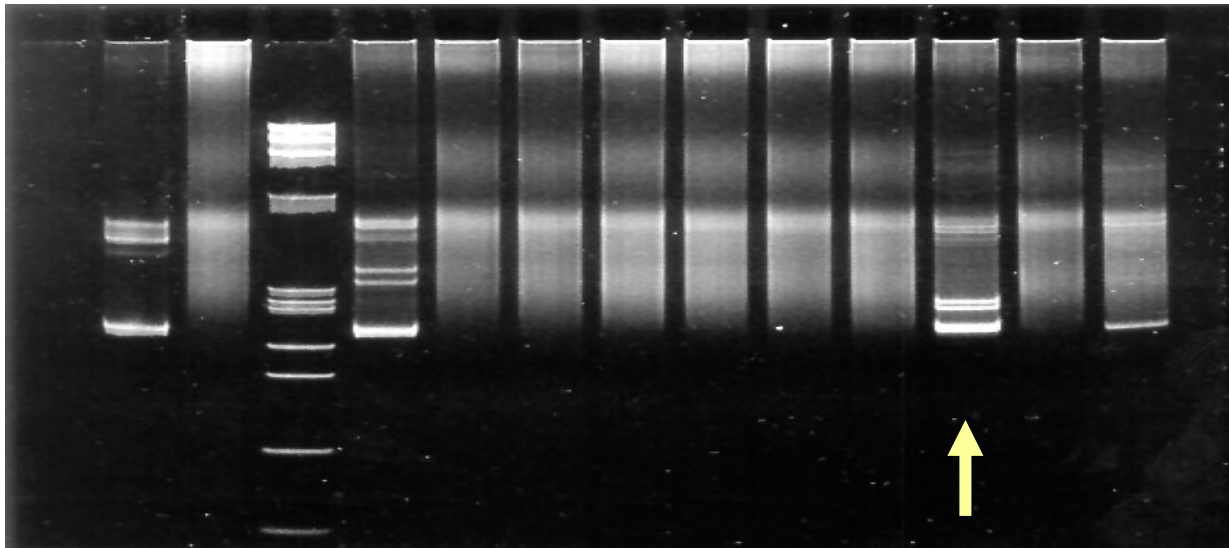
Genotípus	Null-sejtes	T-sejtes	B-sejtes	Hibrid (T és B)
esetszám	7	3	4	2
Pozitív PCR vizsgálat	Nincs génátrendeződés pozitívitas (mindkét t(2;5) transzlokáció pozitív eset null-sejtes genotípusú)	2 x TCR- γ I	1 x FR1c/JH és FR2a/JH és FR3a/JH	**1 x FR1c/JH és FR2a/JH és FR3a/JH és TCR- γ I és TCR- β (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 1x FR2a/JH	

17. 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.

A legérdekesebb 2 esetet külön, röviden összefoglalom: *CsL 54 éves beteg eredményei, akinél ALCL miatt autológ perifériás vérösszejt és csontvelő transzplantáció történt. Egy évvel az átültetés után nodális (inguinalis) relapszus lépett fel. Az akkor elvégzett újabb biopszia perifériás T-sejtes lymphomát (PTCL) igazolt. Retrospektíven megvizsgálva az eredeti nyirokcsomót kiderült, hogy egy PTCL-ből szekunder ALCL-ba transzformálódott esetként került a betegség felismerésre. A nagy malignitású ALCL-es klón a transzplantáció kipusztította, a relapszus során a kevésbé szenzitív, indolens viselkedést mutató PTCL kezdett lassan progrediálni. (101) A 15. ábrán a beteg mintájánál három band látható, mely a betegség klonális evolúcióját mutatja.

Vak M P M4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

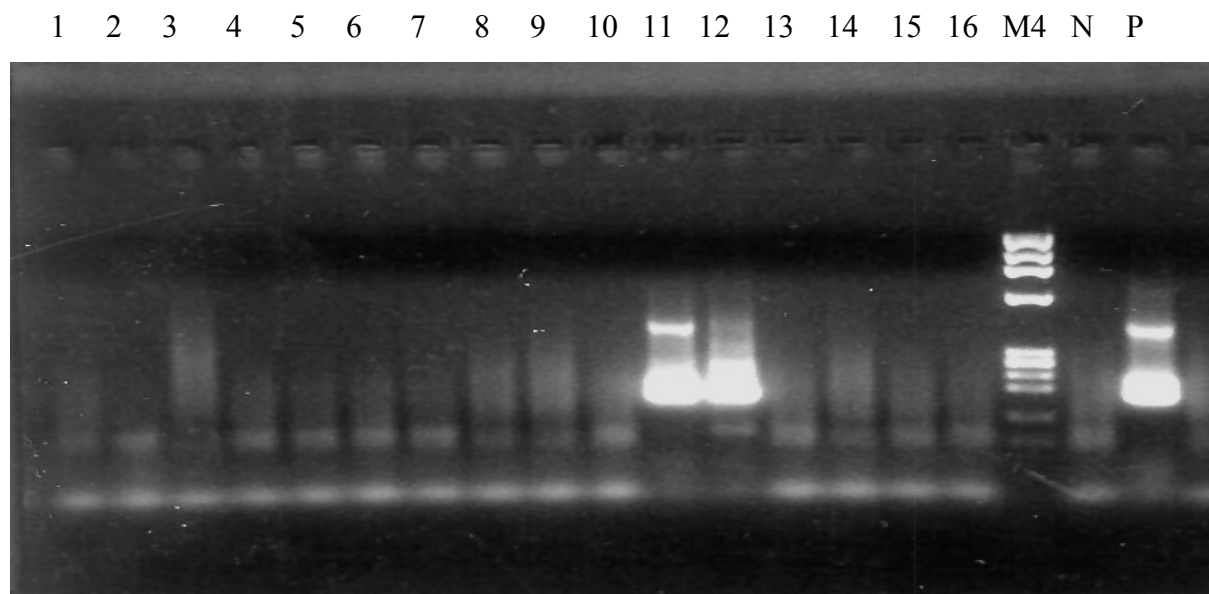


15. ábra TCR gamma 1 PCR során a 1. a 8. és a 10. sáv mutatott monoklonális TCR gamma génátrendeződést. Az 1. band-en a 2. és 3. ábrán látható primer bőr ALCL-es beteg bőrbopsziájából nyert DNS-en amplifikátuma látható, a 8. sávon látható a fent említett betegtől nyert DNS amplifikációja (PTCL ALCL-be történt transzformációja). A 10. sávon a *-al jelölt beteg Ficoll-lal szeparált csontvelő mintájából származó sejtekből extrahált DNS amplifikátuma látható.

**HA 61 éves beteg, akinek primer csontvelői ALCL-je volt. A csontvelő aspirátumból a korábban részletezett Ficoll-os lymphocyta szeparálás során nyertük a sejteket. Mindhárom IgH és mindkét TCR (β és γ) génátrendeződést vizsgáló PCR pozitív volt, tehát kettős (hibrid) genotípusú volt a folyamat. Az eset külön érdekessége - amellet, hogy nyirokcsomó megnagyobbodást nem észleltünk - az, hogy a betegnek hármás paraproteinaemiája volt (kettős IgM, illetve IgG). (nem publikált eset, publikációra előkészítve)

8.2.2. Transzlokációs vizsgálatok eredményei

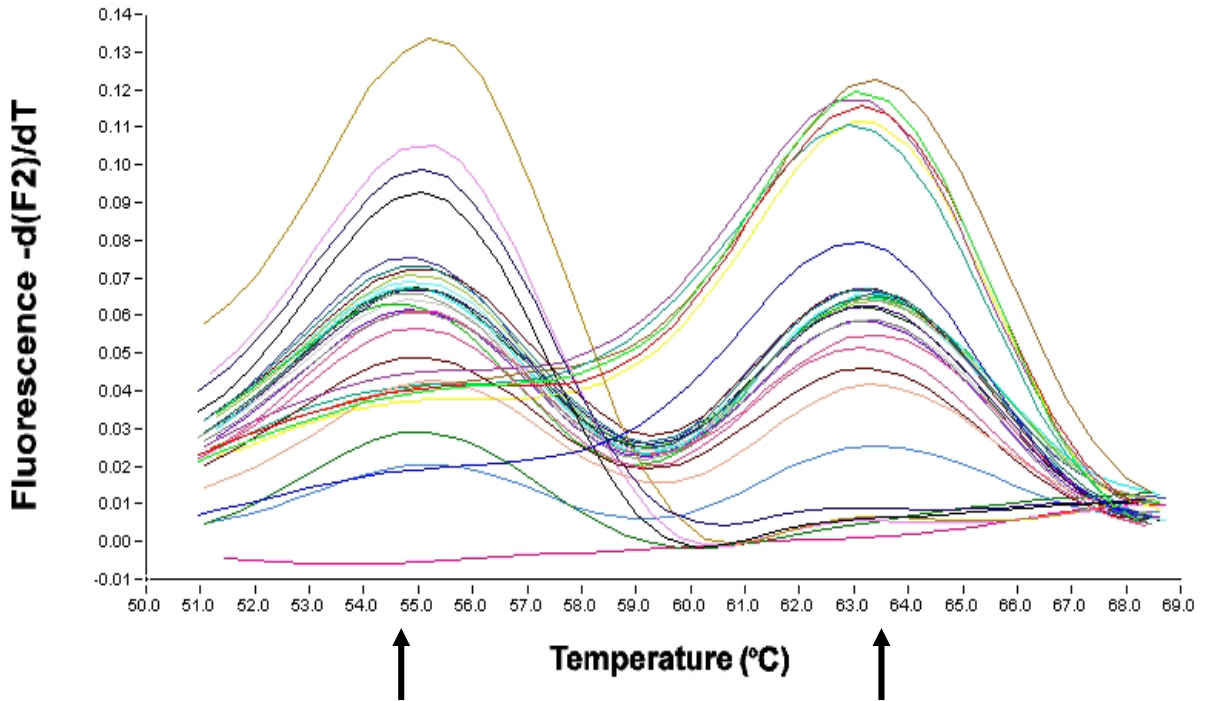
Elvégeztük az ALCL-ben előforduló két leggyakoribb (ALK pozitív esetek ~ 90 %-a) transzlokációra specifikus DNS alapú illetve RT-PCR vizsgálatokat. Mindkét módszerrel a t(2;5) transzlokációra nézve ugyanaz a 2 minta bizonyult pozitívnak (15690 és 15695), ezt mutatja a 16. ábra. A t(1;2) transzlokáció egyetlen mintán sem volt pozitív sem DNS alapú, sem RT-PCR módszerrel.



16. ábra RT-PCR vizsgálat t(2;5)(p23;q35) transzlokáció kimutatására. 1-10, illetve 13-16. sávok negatívak, 11-12. sávok mutatják a transzlokáció pozitívítást (NPM/ALK génfúzió jön létre). M4: mólsúlymarker, N: negatív kontroll, P: pozitív kontroll.

8.2.3. Multidrug rezisztencia vizsgálatok eredményei

Az 5.2.4. fejezetben részletezett light cycler real time PCR módszert alkalmazva speciális görbéket kapunk a számítógép vezérelt módszerrel (17. ábra)



17. ábra Multidrug rezisztencia génpolimorfizmus vizsgálata. Amennyiben egy csúcsú a görbe, akkor homozygota a beteg. Ha 55 C-nál (bal oldali nyíl) van a csúcs, akkor az MDR-ra kis rizikójú (T/T), ha 64 C-nál van a csúcs (jobb oldali nyíl), akkor homozygota nagy rizikójú (C/C). Heterozygota esetben kétszúcsú a görbe.

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)

18. 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 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

19. 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.

8.2.4. 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 %			

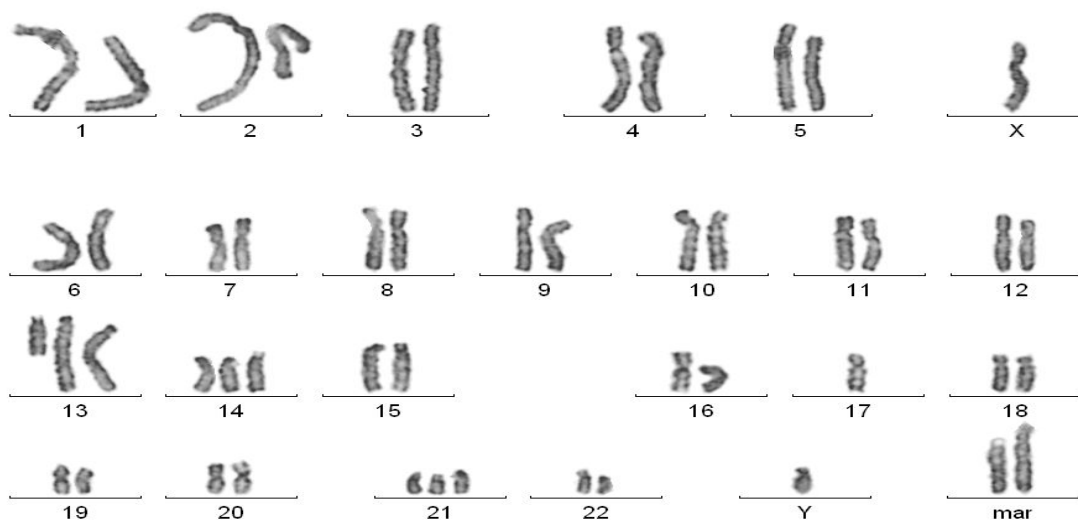
20. táblázat Thrombophilia genetikai eredmények ALCL-ben és B-sejtes lymphomákban.
HO: homozygota, HZ: heterozygota, NO: nincs mutáció

A thrombophilia genetikai eredmények közül a Leiden mutáció az ALCL-es betegek közül 5, B-sejtes lymphomások 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 thrombemboliában 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 lymphomásoknál homozygota mutáció nem volt, viszont az esetek felében heterozygota állapotot regisztráltunk. A plazma homocystein színtről nincs adatunk. A PLA2 mutáció hasonló gyakorisággal fordult elő a két betegcsoportban (homozygota csak az ALCL-esek között volt). Thrombemboliás 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. Az artériás embolizáció mindkét esetben ALCL-es beteget érintett, genetikai eltérés egyik betegnél volt észlelhető: MTHFR mutáció normális plazma homocystein szint mellett, így nem valószínű, hogy oki szerepe lett volna az embolia kialakulásában. Ez a beteg ebben a periódusban kis molekulatömegű heparin mellett thrombocytá aggregáció gátló kezelésben is részesült. A három mélyvénás thrombosis mind DLCL-es betegnél lépett fel, egyiküknek se volt sem Leiden mutációja, sem Prothrombin gén mutációja. Lokális ok állt a háttérben (stasis) és annak ellenére kialakult a thrombosis, hogy a betegek preventív dóziszú heparin kezelésben részesültek (nem frakcionált illetve kis molekula tömegű heparin). Összességében a kis betegszám mellett mindössze az ALCL-es betegeknél észlelt gyakoribb MTHFR gén homozygota mutáció volt szembetűnő.

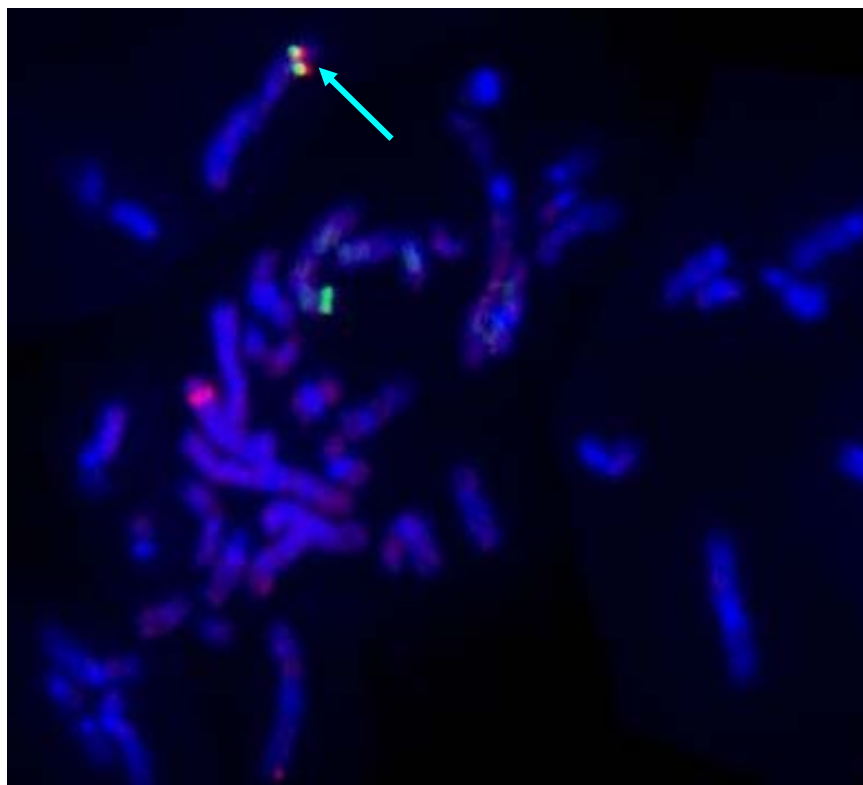
8.3. Citogenetikai eredmények

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- γ 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 (18. ábra). Az első betegnél időközben ALCL leukémia alakult ki (lásd 5. ábra perifériás vérkenet és 21. ábra flow citometriás ábra), 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 (19. és 20. ábra).

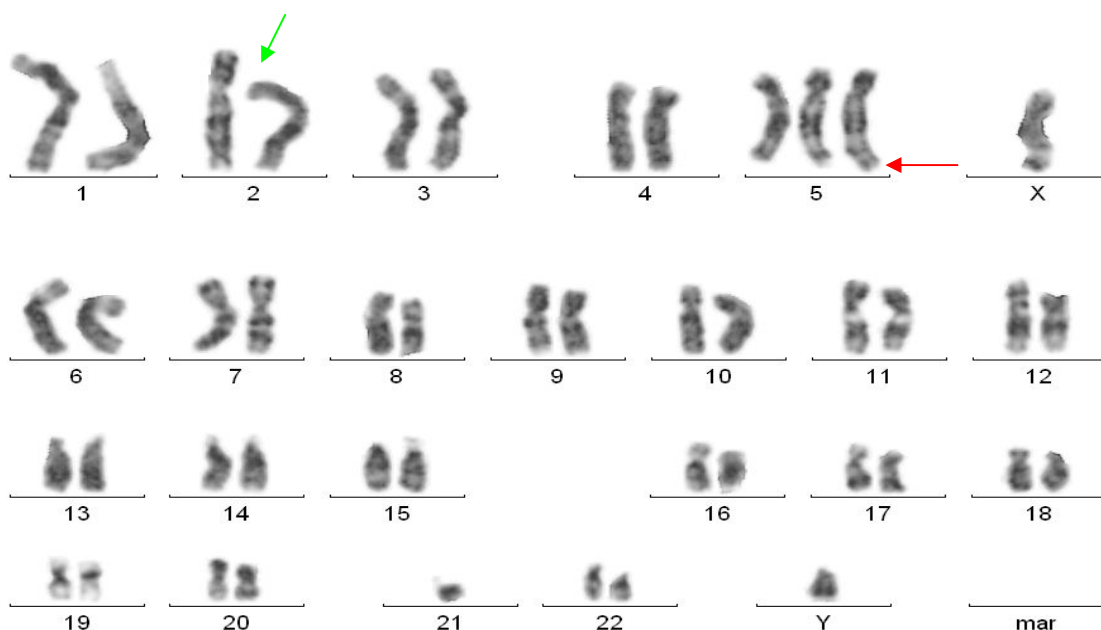


18. ábra ALK negatív ALCL-es beteg nyirokcsomóból származó karyotypus.

Látható a számbeli és strukturális komplex citogenetikai eltérés (a 2. kromoszóma egy daraja hiányzik, 13-as, 14-es és 21-es kromoszóma triszómia észlelhető, 2 nem azonosítható kromoszóma is jelen van)



19. ábra FISH vizsgálat t(2;5) transzlokáció kimutatására.
Zöld sáv: 2-es kromoszóma rövid karja.
Piros sáv: 5-ös kromoszóma hosszú karja.
Zöld-piros szín (nyíl): t(2;5) transzlokáció.



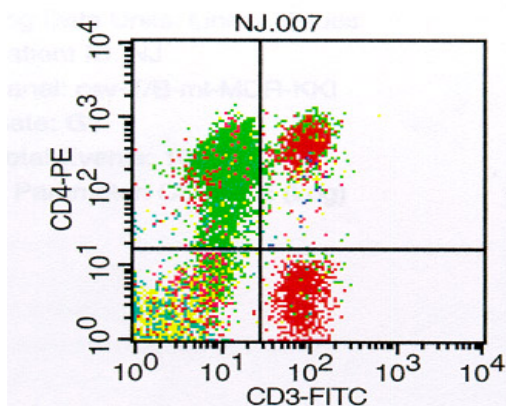
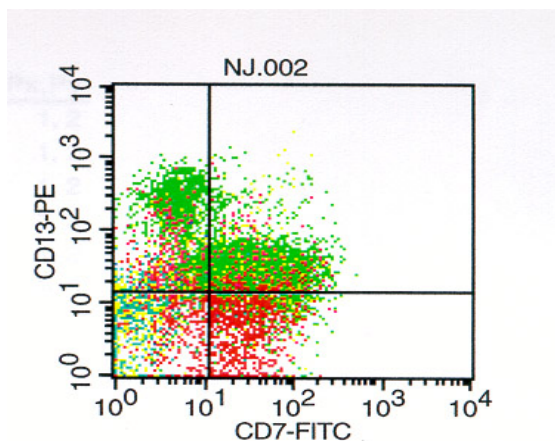
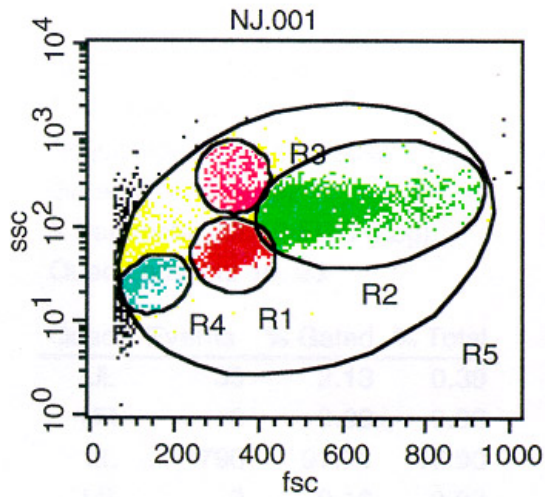
20. ábra Gyermekkori ALK pozitív ALCL-es eset. Komplex citogenetikai eltérés látható. 5-ös kromoszóma triszómia, 21-es monoszómia, a jellegzetes t(2;5) transzlokáció megfigyelhető, zöld nyíl: hiányzik a 2-es kromoszóma rövid karjának egy darabja, piros nyíl: 5-ös kromoszóma hosszú karjára transzlokálódott.

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 fluorescein próbával jelölték meg. Az 5-ös kromoszóma hosszú karján helyet foglaló – és a nucleophosmin gént is involváló – génszakaszt piros színű fluorescein próbával jelölték meg. Amennyiben a t(2;5)(p23;q35) transzlokáció létrejön, akkor egymásra vetül a két szín. Ez látszik a 19. ábrán.

8.4. Áramlási citometriai eredmények

Áramlási citometriai módszerrel megvizsgáltuk 9 ALCL-es beteg csontvelő aspirátumát. 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 peripheriás vér Ficoll-szeparálását. A későbbiekben ezen mintákon az angol kutató partnerünknél 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 (21. ábra)



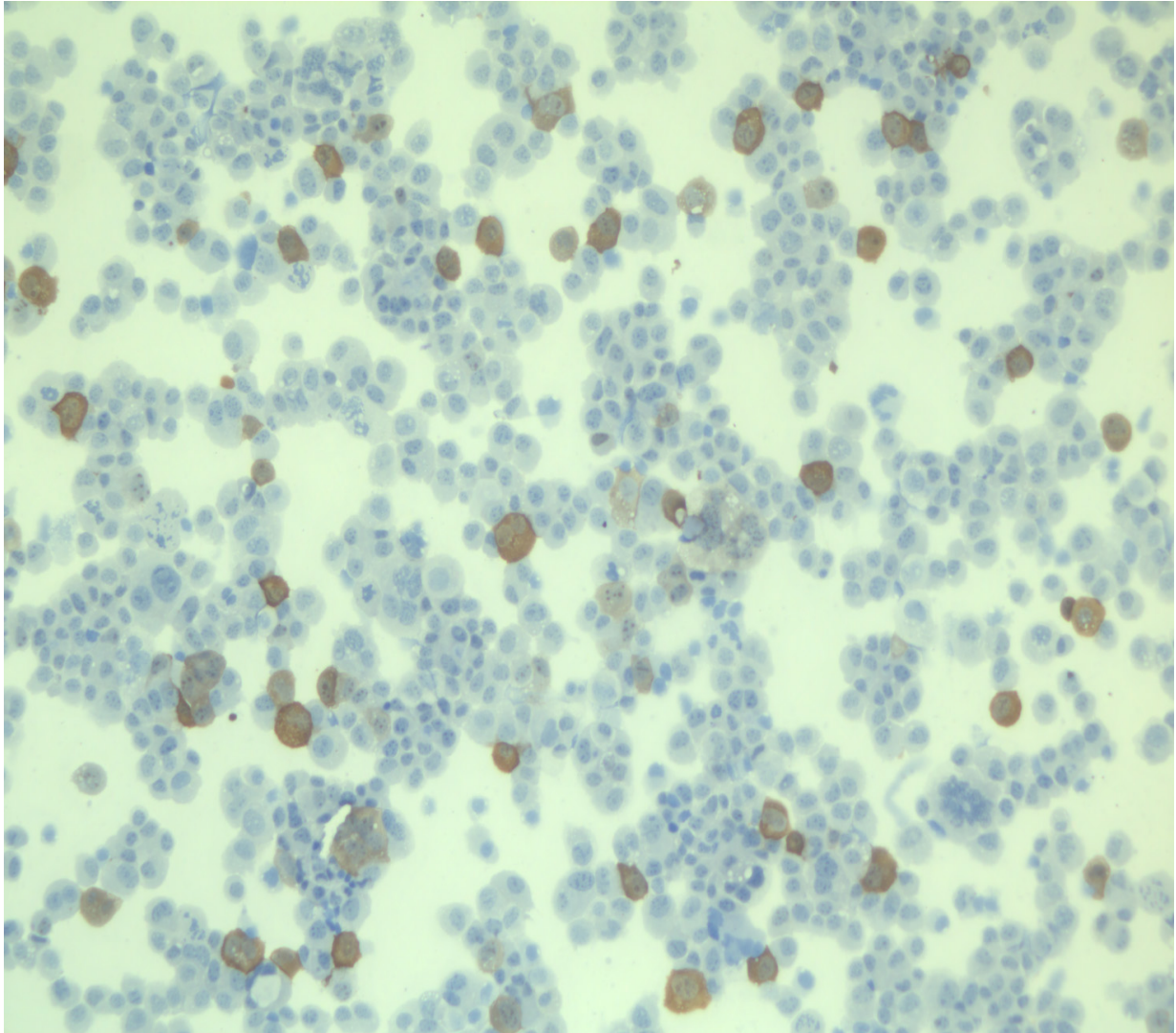
21. ábra Áramlási citometriai vizsgálat.

NJ anapláziás nagysejtes lymphomás betegnél a betegség terminális fázisában leukémia alakult ki. 15-20 G/l-es fehérvérsejtszám mellett a kenetben 20 %-os lymphoblastos populáció volt észlelhető. (lásd 6. ábra). Ebben a periódusban jelentős normociter anémia (htc:24,1 %, hgb: 83,4 g/l) és trombocitopénia (TCT: 12,8 G/l) volt észlelhető.

Az áramlási citometriai vizsgálat szerint a nagy méretű, sejtek T-markerekkel mutattak pozitívást (CD7, CD4). Aberráns expresszió volt észlelhető: az éretlen sejtek 45 %-os CD7/CD13 koexpressziót mutattak. A CD4 sejtek aránya 57 % volt. További aberráns éretlenségi marker volt a 70 %-os HLA-DR pozitívítás. Az őssejtmarkerként ismert CD34 mindössze 0,68 %-ban volt pozitív. A B-sejtek aránya minimális volt: CD19: 2%, CD20: 2,5 %. A kappa-lambda könnyűlánc eloszlás poliklonális volt. A calcein teszt igen gyenge funkcionális multidrug rezisztenciát mutatott.

8.5. NPM-ALK és ALK ellenes antitest immunprecipitációs eredményei

A 5.5. fejezetben leírt 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 (22. ábra). Részletes adatokat a 21. táblázat mutatja.



22. ábra Anti-NPM-ALK antitest immunprecipitációs vizsgálat.

No	Név	kor	Dg	Minta	Status	Anti-NPMALK	Anti-ALK	ALK1
1	HA	61	T-ALCL	Ch után	PR	NEG	NEG	NEG
2	BL	36	T-ALCL	PBSCT után	CR	NEG	POZ	POZ
3	BF	27	0-ALCL	Ch után	Prog	NEG	NEG	NEG
4	BT	32	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	NEG
5	CJ	30	0-ALCL	PBSCT után	CR	NEG	NEG	NEG
6	KJ	72	0-ALCL	Ch után	PR	NEG	NEG	NEG
7	TL	38	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	POZ
8	NE	30	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	POZ
9	KI	27	0-ALCL	Ch után	CR	POZ	POZ	POZ
10	BZ	29	T-ALCL	Ch előtt, alatt	Prog	NEG	NEG	NEG
11	GP	28	T-ALCL	Ch előtt	PR	NEG*	NEG*	NEG
12	NJ	48	T-ALCL	Ch előtt	PR	NEG	NEG	NEG
13	TA	26	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	POZ
14	GE	28	T-ALCL	Ch alatt	PR	NEG	NEG	NEG
15	BE	59	T-ALCL	Rad előtt	CR	NEG	NEG	NEG
16	RJ	59	0-ALCL	Ch után	PR	NEG	NEG	NEG
17	BÁ	21	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	POZ	POZ
18	HJ	67	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	POZ
19	TJ	55	T-ALCL	Ch előtt	prog	NEG	NEG	NEG
20	BJ	60	T-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	NEG
21	KZ	46	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	NEG
22	IS	29	B-ALCL	Ch alatt	prog	NEG	NEG	NEG
23	FJ	45	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	POZ
24	NE	72	0-ALCL	Ch alatt	CR	NEG	NEG	NEG
25	TZ	24	T-ALCL	Ch alatt	CR	NEG	NEG	NV
26	BZ	21	0-ALCL	Ch után	CR	NEG	NEG	POZ
27	MI	59	0-ALCL	Rad előtt	CR	NEG	NEG	NEG

21. táblázat NPM-ALK és ALK ellenes antitest vizsgálat eredményei. NPM: nucleophosmin, ALK: anapláziás lymphoma kináz, NEG: negatív, Poz: pozitív, CR: komplett remisszió, PR: parciális remisszió, Prog: progresszió, Ch: kemoterápia, rad: radiotrápia, NV: nem vizsgálva, PBSCT: perifériás vér őssejt transzplantáció, *:az első vizsgálat szerint pozitív volt az anti-ALK illetve az anti-NPM-ALK reakció, de az ismételt vizsgálat negatívnak bizonyult.

A 27 ALCL-es eset közül 26-nál megtörtént korábban a tumoros nyirokcsomó blokkon az anti-p80, vagy ALK1 immunhisztokémiai vizsgálat. Tíz esetben találtunk pozitivitást (9 betegnél ALK1, 1 ízben p80 volt pozitív). Ezen esetek közül egynél volt pozitív mind az NPM-ALK, mind az ALK immunprecipitációs vizsgálat (22. ábra), 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 szérumbelvétele évekkal a kemoterápiát követően került sor, az egyik páciens M. Crohn kóros betegsége miatt hosszasan szteroid kezelésben részesült, mely része lehet a keringő antitest eliminálásának. Meglepő lelet volt egy DLCL-es esetben észlelt anti-ALK antitest pozitivitás – igaz a reakció gyenge pozitivitást mutatott. A diagnosztikus procedúra során a CD20 pozitív B-sejtes nagy malignitású lymphománál ALK1 festést a rutin immunhisztokémia során természetesen nem alkalmaztak a patológusok. Azon ritka DLCL-es esetek közé tartozhat, melyben a teljes hosszúságú ALK fehérje expresszálódik. Klinikai viselkedésében is eltért az eset a típusos DLCL-es megjelenéstől. Nagy vesetumort utánzó extranodálisan terjedő, uretert teljesen beszűrő, „amputáló” terime volt észlelhető malignus mellüregi folyadék képződéssel, ugyanakkor jól reagált kemoterápiára. Az első ciklus után el lehetett távolítani a percutan nephrostomát.

9. 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 irányába. 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 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.
3. **T-sejt receptor béta és gamma, illetve immunglobulin nehéz lánc génátrendeződési vizsgálatot** végeztünk el (Toulouse-ban 16, Pécsen mintegy 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-lymphocytá 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 179 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. Részletesen az 6. fejezetben láthatóak az eredmények.

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** raritást, **extrém ritka megjelenést észleltünk**:

- a. Tripla M grádienssel járó primer csontvelői T/B hybrid-sejtes ALCL (13. ábra).
- b. Komplet remisszióban észlelt meningeális ALK pozitív ALCL manifesztáció (4. ábra).
- c. Komplex citogenetikai eltéréssel járó ALK negatív ALCL leukémia (5., 18. és 21. ábra).
- d. Extrém eosinophiliával járó ALK negatív ALCL (9. ábra).
- e. Szekunder ALCL autológ csontvelő transzplantációját követő perifériás T-sejtes lymphoma relapszus (15. ábra).
- f. Extrém nagy kiterjedésű primer bőr ALCL (3. ábra).

A jövőben a magyar hematológiai, patológiai és csontvelő transzplantáló centrumokkal változatlanul szoros, jó együttműködést kívánunk folytatni. 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 (102) 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.

10. Köszönetnyilvánítás:

Köszönöm **Losonczy Hajna** professzornőnek, klinikánk hematológiai munkacsoportja vezetőjének, hogy mindvégig támogatta a malignus hematológia iránti érdeklődésemet, értékes szakmai tanácsokat adott, segítette a magyar anapláziás nagysejtes lymphoma regiszter szervezését.

Köszönöm **Georges Delsol** professzornak és **Talal Al Saati** laborvezető PhD kutatónak a toulouse-i molekuláris genetikai és immunhisztokémiai kutatások irányítását, hogy mellettük elsajátíthattam a legfontosabb módszerek alapjait, nagylelkűen rendelkezéseimre bocsátottak számos költséges metodikát. A későbbiekben is folyamatos munkakapcsolatra tettem ígéretet.

Köszönöm **Karen Pulford** laborvezető és **Kamel Ait-Tahar** oxfordi PhD kutatóknak az immunprecipitációs vizsgálatokban végzett munkájukat és további kooperációs project létrehozása érdekében kifejtett erőfeszítéseiket.

Köszönöm **Mózsik Gyula** professzornak, klinikánk igazgatójának munkám elkészítése során a folyamatos stimulációt, külföldi útjaim támogatását.

Köszönöm minden kedves **hematológus kollégának** önzetlen segítségét, akik a magyar regiszterhez az ALCL-es betegek adatait elküldték, különösen **klinikánk munkacsoportja tagjainak** barátságát köszönöm.

Köszönöm **Kelényi Gábor** és **Pajor László** professzoroknak - egyetemünk Pathológiai Intézete igazgatóinak -, **Csanaky György** főorvosnak – a Szombathelyi Markusovszky Kórház Pathológiai Osztály vezetőjének –, illetve az ország számos kórbonctani osztály hematopatológusának, hogy rendelkezéseimre bocsátottak ALCL-es szövettani mintákat, diagnosztikus segítséget nyújtottak.

Köszönöm klinikánk hematológiai laboratóriuma asszisztensnőinek, **Vető Ádámnénak**, **dr. Temesi Lászlónénak**, **Meng Beátának**, **Hauck Csabánénak**, **Krucsó Hajnalkának** és **Szalontay Csillának**, valamint a toulouse-i asszisztenseknek **Daniel Roda-**nak és **Reine Claude Zenou-**nak a kitűnő technikai segítséget.

Köszönöm a PTE Központi Klinikai Laboratóriumban **Dr. Magyarlaci Tamás** docens és **Papp Zoltánné** asszisztensnőnek segítségét a multidrug rezisztencia és az áramlási citometriai vizsgálatokért.

Köszönöm **Dr. Méhes Gábor** adjunktusnak és **Kalász Verának** a citogenetikai vizsgálatok elvégzését, **dr. Kereskai László** tanársegédnek a szövettani ábrák fotózásáért.

Végül, de nem utolsó sorban hálás szívvel köszönöm **családom** (feleségem és két kislányom) folyamatos lelkes támogatását, megértő türelmét.

Külön köszönöm édesanyámnak, édesapámnak és bátyámnak, hogy orvosi pálya irányába orientáltak. A dolgozatot édesapámnak, néhai **Szomor Árpádnak** ajánlom, aki malignus hematológiai betegségét oly méltóságteljesen viselte, mely meghatározó emlék marad számomra.

11. Irodalom:

1. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL. Cancer in five continents. IACR Scientific Publications, No 120, Vol VI. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1992:862-870.
2. Olsen JH. Epidemiology. In: Laurent Degos, David C Linch and Bob Löwenberg Martin (Eds). Textbook of Malignant Haematology, Dunitz Ltd, London 1999; 1-22.
3. Weisenburger DD: Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic. *Ann Oncol* 1994;5:19-24.
4. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Swarting R, Lennert K. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985;66:848-858.
5. Lennert K, Mohri N, Stein H, (eds) Malignant lymphoma other than Hodgkin's disease. Berlin: Springer-Verlag 1978.
6. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De-Wolf Peters C, Falini B, Gatter Kc, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer R, Warnke RA. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
7. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification on neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Ann Oncol* 1999;10:1419-1432.
8. Stein H, Foss HD, Dürkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B. CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. *Blood* 2000;96:3681-3695.

9. Chan JK, Buchanan R, Fletcher CD. Sarcomatoid variant of anaplastic large-cell Ki-1 lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1990;14:983-988.
10. Mann KP, Hall B, Kamino H, Borowitz MJ, Ratech H. Neutrophil-rich Ki-1 positive anaplastic large cell malignant lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1995;19: 407-416.
11. Falini B, Liso A, Pasqualucci L, Flenghi L, Ascani S, Pileri S, Bucciarelli E. CD30+ anaplastic large-cell lymphoma, null-type, with signet-ring appearance. *Histopathology* 1997;30:90-92.
12. Piccaluga PP, Ascani S, Fraternali Orcioni G, Piccioli M, Pileri A, Jr Falini B, Pileri S. ALK expression as a marker of malignancy. Application to a case of anaplastic large cell lymphoma with huge granulomatous reaction. *Haematologica* 2000;85:978-981.
13. McCluggage WG, Walsh MY, Bharucha H. Anaplastic large cell malignant lymphoma with extensive eosinophilic or neutrophilic infiltration. *Histopathology* 1998;32:110-115.
14. Cheuk W, Hill RW, Bacchi C, Dias MA, Chan JK. Hypocellular anaplastic large cell lymphoma mimicking inflammatory lesions of lymph nodes. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1537-1543.
15. Chittal SM, Delsol G. The interface of Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Surveys* 1997;30:87-105.
16. Chittal S, Al Saati T, Delsol G. Epithelial membrane antigen in hematolymphoid neoplasms. *Appl Immunohistochem* 1997;5:203-215.
17. Delsol G, Blancher A, Al Saati T, Ralfkiaer E, Lauritzen A, Bruigeres L, Brousset P, Rigal-Huguet F, Mazerolles C, Robert A, Chittal SM. Antibody BNH9 detects red blood cell-related antigens on anaplastic large cell (CD30+) lymphomas. *Br J Cancer* 1991;64:321-326.
18. Al Saati T, Tkaczuk J, Krissansen G. A novel antigen detected by the CFB78 antibody further distinguishes anaplastic large cell lymphoma from Hodgkin's disease. *Blood* 1995;86:2741-2746.

19. Agarwal S, Ramanathan U, Naresh KN. Epstein-Barr virus association and ALK gene expression in anaplastic large-cell lymphoma. *Hum Pathol* 2002;33:143-145.
20. Shiota M, Fujimoto J, Takenaga M, Satoh H, Ichinohasama R, Abe M, Nakano M, Yamamoto T, Mori S. Diagnosis of t(2;5)(p23;q35)-associated Ki-1 lymphoma with immunohistochemistry. *Blood* 1994;84:3648-3652.
21. Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, Abe M, Akagi T, Takeshita M, Mori N, Fujimoto J, Miyauchi J, Mikata A, Nanba K, Takami T, Yamabe H, Takano Y, Izumo T, Nagatani T, Mohri N, Nasu K, Satoh H, Katano H, Fujimoto J, Yamamoto T, Mori S. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80^{NPM/ALK}: a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 1995;86:1954-1960.
22. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stround D, Delsol G, Mason DY. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997;89:1394-1404.
23. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, Samarut J, Coiffier B, Germain D, Mason DY. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma (Ki-1 lymphoma). *Br J Haematol* 1989;71:31-36.
24. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-1284.
25. Gupta R, Knight CL, Bain BJ. Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2002;117:489-508.
26. Cordell JL, Pulford KAF, Bigerna B, Roncador G, Banham A, Colombo E, Pelicci PG, Mason DY, Falini B. Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood* 1999;93:632-642.

27. Ladanyi M. The NPM/ALK gene fusion in the pathogenesis of anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Survey* 1997;30:59-75.
28. Bischoff D, Pulford K, Mason DY, Morris SW. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin' lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997;17:2312-2325.
29. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol* 1998;18:6951-6961.
30. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Morrione A, Majewski M, Xue L, Morris SW, Wasik MA, Skorski T. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Research* 2001;61:2194-2199.
31. Greenland C, Touriol C, Chevillard G, Morris SW, Bai RY, Duyster J, Delsol G, Allouche M. Expression of the oncogenic NPM-ALK chimeric protein in human lymphoid T-cells inhibits drug-induced, but not Fas-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:7386-7397.
32. Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Zhang Q, Raghunath PN, Xue L, Morris SW, Wasik M, Skorski T. Role of STAT5 in NPM/ALK-mediated malignant transformation of lymphoid cells. *Blood* 1999;94:700a.
33. Hübinger G, Scheffrahn I, Muller E, Bai R, Duyster J, Morris SW, Schrezenmeier H, Bergmann L. The tyrosine kinase NPM-ALK associated with anaplastic large cell lymphoma, binds the intracellular domain of the surface receptor CD30 but is not activated by CD30 stimulation. *Exp Hematol* 1999;27:1796-1805.
34. Kuefer MU, Look AT, Pulford K, Behm FG, Pattengale PK, Mason DY, Morris SW. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood* 1997;90:2901-2910.

35. Ladanyi M. Aberrant ALK tyrosine kinase signaling. Different cellular lineages, common oncogenic mechanism (comment). *AJP*. 2000;157:341-345.
36. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugieres L, Terrier-Lacombe MJ, Haralambieva E, Pulford K, Pileri S, Morris SW, Mason DY, Delsol G. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998;91:2076-2084.
37. Lamant L, Dastugue N, Pulford K, Delsol G, Mariame. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood* 1999;93:3088-3095.
38. Lawrance B, Perez Atayde A, Hibbard MK, Rubin BP, Dal Cin P, Pinkus JL, Pinkus GS, Xiao S, Yi ES, Fletcher CD, Fletcher JA. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *AJP*. 2000;157:377-384.
39. Hernandez L, Pinyol M, Hernandez S, Bea S, Pulford K, Rosenwald A, Lamant L, Falini B, Ott G, Mason DY, Campo E. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocation. *Blood* 1999;94:3265-3268.
40. Hernandez L, Bea S, Bellosillo B, Pinyol M, Falini B, Carbone A, Ott G, Rosenwald A, Fernandez A, Pulford K, Mason D, Morris SW, Santos E, Campo E. Diversity of genomic breakpoint in TFG-ALK translocation in anaplastic large cell lymphomas: identification of a new TFG-ALK(XL) chimeric gene with transforming activity. *Am J Pathol* 2002;160:1487-1494.
41. Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, Mason DY, Delsol G. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptid like). *Blood* 2000;95:3204-3207.
42. Colleoni GWB, Bridge JA, Gariocochea B, Liu J, Filippa DA, Ladanyi M. ATIC-ALK: a novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv(2)(p23q35). *Am J Pathol* 2000;156:781-789.

43. Ma Z, Cools J, Marynen P, Cui X, Siebert R, Gesk S, Schlegelberger B, Peeters B, De-Wolf-Peters C, Wlodarska I, Morris SW. Inv(2)(p23q35) in anaplastic large cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis. *Blood* 2000;95:2144-2149.
44. Trinei M, Lanfrancone L, Campo E, Pulford K, Mason DY, Pelicci PG, Falini B. A new variant anaplastic lymphoma kinase (ALK)–fusion protein (ATIC-ALK) in a case ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Research*. 2000;60:793-798.
45. Meech SJ, McGavran L, Odom LF, Liang X, Meltesen L, Gump J, Wei Q, Carlsen S, Hunger SP. Unusual childhood extramedullary hematologic malignancy with natural killer cell properties that contains tropomyosin 4-anaplastic lymphoma kinase gene fusion. *Blood* 2001;98:1209-1216.
46. Tort F, Pinyol M, Pulford K, Roncador G, Hernandez L, Nayach I, Kluin-Nelemans HC, Kluin P, Touriol C, Delsol G, Mason DY, Campo E. Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest* 2001;81:419-426.
47. Cools J, Wlodarska I, Somers R, Mentens N, Pedoutour F, Maes B, De Wolf-Peters C, Pauwels P, Hagemeijer A, Marynen P. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes, Chromosomes Cancers* 2002;34:354-362.
48. Lamant L, Gascoyne RD, Duplantier MM, Armstrong F, Raghav A, Chhanabhal M, Rajcan-Separovic E, Raghav J, delsol G, Espinos E. Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. *Genes, Chromosomes Cancers* 2003;37:427-432.
49. Lamant L, Pulford K, Bischof D, Morris SW, Mason DY, Delsol G, Mariame B. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am J Pathol* 2000;156:1711-1721.

50. Delsol G, Lamant L, Mariame B, Pulford K, Dastugue N, Brousset P, Rigal-Huguet F, Al Saati T, Cerretti DP, Morris SW, Mason DY. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2;5 translocation. *Blood* 1997;89:1483-1490.
51. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, Chhanabhai M, Skinnider BF, Greiner TC, Morris SW, Connors JM, Vose JM, Viswanatha DS, Coldman A, Weisenburger DD. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 1999;93:3913-3921.
52. Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 2000;96:4319-4327.
53. Pulford K, Falini B, Banham AH, Codrington D, Robertson H, Hatton C, Mason DY. Immun response to the ALK oncogenic tyrosine kinase in patients with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2000;96:1605-1607.
54. Pulford K, Robertson H, Banham AH, Hatton CSR, Mason DY. Immunochemical studies of antigenic lymphoma-associated proteins. *Br J hematol.* 2002;116:135-141.
55. Villalva C, Trempat P, Greenland C, Thomas C, Girard JP, Moebius F, Delsol G, Brousset P. Isolation of differentially expressed genes in NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Br J Hematol.* 2002;118:791-798.
56. Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, Pulford K, Pileri SA, Delsol G, Carbone A, Paulli M, Magrini U, Menestrina F, Giardini R, Pilotti S, Mezzelani A, Ugolini B, Billi M, Pucciarini A, Pacini R, Pelicci PG, Flenghi L. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol* 1998;153:875-886.
57. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peters CD, Verhoef G, Manestrina F, Tedeschini G, Paulli M, Lazzarino M, Giardini R, Aiello A, Foss HD, Araujo I,

Fizzotti M, Pelicci PG, Flenghi L, Martelli MF, Santucci A. ALK⁺ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 1999;93:2697-2706.

58. ten Berge RL, Dukers DF, Oudejans JL, Pulford K, Ossenkoppele GJ, de Jong D, Miseré JFMM, Meijer CJLM. Adverse effects of cytotoxic T lymphocytes on the clinical outcome of nodal anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 1994;93:2688-2696.

59. Cataldo KA, Jalal SM, Law ME, Ansell Sm, Inwards DJ, Fine M, Arber DA, Pulford KA, Strickler JG. Detection of t(2;5) in anaplastic large cell lymphoma. Comparison of immunohistochemical studies, FISH, and RT-PCR in paraffin embedded tissue. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1386-1392.

60. Greer JP, Flexner JM, Kallianpur AR, Goodman SA, Stein RS, Whitlock JM, Wolff SN, Kinney MC. Ki-1+ anaplastic large lymphoma (ALCL): correlation of clinical features p80^{NPM/ALK} expression and histology. *Blood* 1996;88:224a

61. Herling M, Pugh W, Morris SW, Falini B, Cabanillas F, Sarris AH. T(2;5) and failure free survival (FFS) of doxorubicin-treated anaplastic large cell lymphoma (ALCL). *Br J Haematol* 1998;102:123.

62. Greer JP, Kinney MC, Loughran TPJr. T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. *Hematology* 2001. American Society of Hematology Education Program Book. Schechter GP, Broudy VC, Williams ME (eds) 2001: 259-281.

63. Saffer H, Wahed A, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Clusterin expression in malignant lymphomas: a survey of 266 cases. *Mod Pathol*. 2002;15:1221-1226.

64. Lae ME, Ahmed I, Macon WR. Clusterin is widely expressed in systemic anaplastic large cell lymphoma but fails to differentiate primary from secondary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:773-779.

65. Longo G, Federico C, Sacchi S, Callea V, Lombardo M, Federico M, Stelitano C, Angrilli F, Vallisa D, Gobbi PG, Ilariucci F, Frassoldati A, Petrini M, Silingardi V. Clinical characteristics, treatment outcome and survival of 36 patients with primary anaplastic large

cell lymphoma. Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL). *Haematologica* 1999;84:425-430.

66. Longo G, Federico M, Pieresca C, Avanzini P, Iannito E, Di Prisco AU, Baldini L, Brugiattelli M, Clo' V, Bevini M, Silingardi V. Anaplastic large cell lymphoma (CD30+/Ki-1+). Analysis of 35 cases followed at GISL centres. *Eur J Cancer* 1995;31A:1763-1767.

67. Shulman LN, Frisard N, Antin JH, Wheeler C, Pinkus G, Magauran N, Mauch P, Nobles E, Mashal R, Canellos G, Tung N, Kadin M. Primary Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical characteristics and therapeutic outcome. *J Clin Oncol* 1993;11:937-942.

68. Greer JP, Kinney MC, Collins RD, Salhany KE, Wolff SN, Hainsworth JD, Flexner JM, Stein RS. Clinical features of 31 patients with Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1991;9:539-547.

69. Fanin R, Silvestri F, Geromin A, Cerno M, Infanti L, Zaja F, Barillari G, Savignano C, Rinaldi C, Damiani D, Buffoli A, Biffoni F, Baccarani. Primary systemic CD30 (Ki-1)-positive anaplastic large cell lymphoma of the adult: Sequential intensive treatment with the F-MACHOP regimen (\pm radiotherapy) and autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:1243-1248.

70. Deconinck E, Lamy T, Foussard C, Gaillard F, Delwail V, Colombat P, Casassus P, Lemevel A, Brion A and Milpied N for the Group Ouest-Est D'Etude des Leucemies et Autres Maladies du Sang (GOELAMS). Autologous stem cell transplantation for anaplastic large-cell lymphomas: results of a prospective trial. *Br J Haematol* 2000;109:736-742.

71. Tilly H, Gaulard P, Lepage E, Dumontet C, Diebold J, Plantier I, Berger F, Symann M, Pertella T, Lederlin P, Briere J. Primary anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical presentation, immunophenotype, and outcome. *Blood* 1997;90:3727-3734.

72. Zinzani PL, Bendandi M, Martelli M, Falini B, Sabbatini E, Amadori S, Gherlinzoni F, Martelli MF, Mandelli F, Tura S, Pileri SA. Anaplastic large-cell lymphoma: prognostic evaluation of 90 adult patients. *J Clin Oncol* 1996;14:955-962.

73. Brugieres L, Le Deley MC, Pacquement H, Meguerian-Bedoyan Z, Terrier-Lacombe J, Robert A, Pondarre C, Leverger G, Devalck C, Rodary G, Delsol G, Hartmann O. CD30+ anaplastic large cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of French Society of Pediatric Oncology. *Blood* 1998;92:3591-3598.
74. Falini B, Pulford K, Pucciarini A, Carbone A, Wolf-Peters CD, Cordell J, Fizzotti M, Santucci A, Pellicci PG, Pileri S, Campo E, Ott G, Delsol G, Mason DY. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood* 1999;94:3509-3515.
75. Armitage JO, Weisenburger DD for the Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. New approach to classifying Non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol* 1998;16:2780-2795.
76. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J and Urbano-Ispizua A for the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Hemopoetic stem cell transplantation in Europe 1998. *The Hamatology Journal* 2000;1:333-350.
77. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Horisberger B, Urbano-Ispizua for the Accreditation Committee of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Economics, health cares system and utilization of haemopoietic stem cell transplants in Europe. *Br J Haematol* 2002;117:451-468.
78. Fanin R, Ruiz de Elvira MC, Sperotto A, Bacarani M, Goldstone A. Autologous stem cell transplantation for T and null cell CD30-positive anaplastic large cell lymphoma: analysis of 64 adult and pediatric cases reported to the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplantation* 1999;23:437-442.
79. Blystad AK, Enblad G, Kvaloy S, Berglund A, Delabie J, Holte H, Carlson K, Kvalheim G, Bengtsson M, Hagberg H. High-dose therapy with autologous stem cell transplantation in patients with peripheral T cell lymphomas. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:711-716.
80. Trainor KJ, Brisco MJ, Wann JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991;78:192-196.

81. Ramasamy I, Brisco M, Morley AA. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992;45:770-775.
82. Aubin J, Davi F, Nguyen-Salomon F, Leboeuf D, Debert C, Taher M. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 1995;9:471-479.
83. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarovski JHS, Matutes E, Wiedemann LM. The rapid detection of clonal T-cell proliferation in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 1991;138:821-828.
84. Theriault C, Galoin S, Valmary S, Selves J, Lamant L, Roda D, Rigal-Huguet F, Brousset P, Delsol G, Al Saati T. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders of a study of 525 cases. *Mod Pathol* 2000;13:1269-1279.
85. Lamant L, Meggetto F, Al Saati T, Brugieres L, Paillerets BB, Dastugue N, Bernheim A, Rubie H, Terrier-Lacombe J, Robert A, Brousset P, Rigal F, Schlaifer D, Shiota M, Mori S, Delsol G. High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood* 1996;87:284-291.
86. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997;11:2192-2195.
87. Nauck M, Stein U, von Karger S, Marz W, Wieland H. Rapid detection of the C3435T polymorphism of multidrug resistance gene 1 using fluorogenic hybridization probes. *Clin Chemistry* 2000;46:1995-1997.
88. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human

multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:3473-3478.

89. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:169-174.

90. 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 Belorv Arc* 1999;52:67-72.

91. 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.

92. Nagy M, Fehér K, László T, Szomor Á, Losonczy H, Kelényi G, Matolcsy A. A T-sejt receptor γ -génátrendeződés vizsgálata lymphoproliferatív kórképekben polimeráz láncreakció segítségével. *Orv Hetil* 1999;140:2441-2444.

93. Skinnider BF, Connors JM, Sutcliffe SB, Gascoyne RD. Anaplastic large cell lymphoma: a clinicopathologic analysis. *Hematol Oncol* 1999;17:137-148.

94. 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.

95. Morris SW, Xue L, Ma Z, Kinney MC. ALK+ CD30+ lymphomas: a distinct molecular genetic subtype on non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2001;113:275-295.

96. Duyster J, Bai RY, Morris SW. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* 2001;20:5623-5637.

97. Falini B. Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *Br J Haematol* 2001;114:741-760.
98. Krenacs L, Wellmann A, Sorbara L, Himmelmann AW, Bagdi E, Jaffe ES, Raffeld M. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood* 1997;89:980-989.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Jager et al. Detection of a cytotoxic T cell (CTL) response using the ELISPOT assay. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97;4760-4769.