

IIIβ.

Τ - Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
(T-ALL)
και Υπολειμματική Νόσος
(MRD)

Μαριάννα Τζανουδάκη

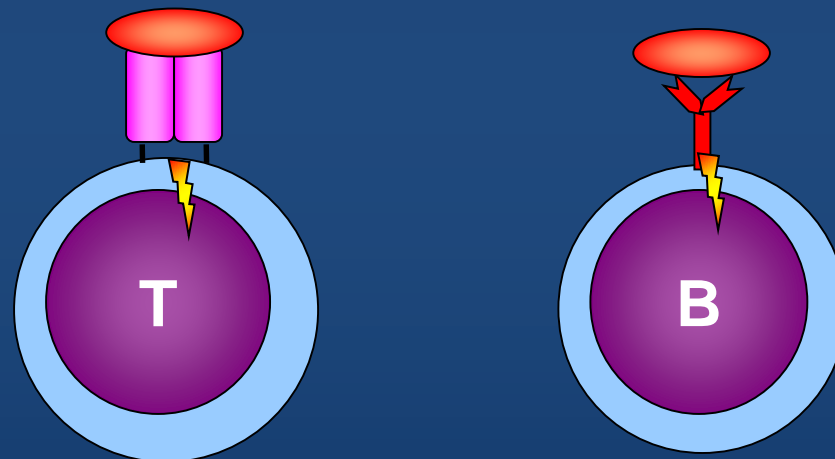
Τμήμα Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας
Γ.Ν. Παιδων «Η Αγία Σοφία»

Η ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων

Τ και Β Λεμφοκύτταρα

Κοινό χαρακτηριστικό:

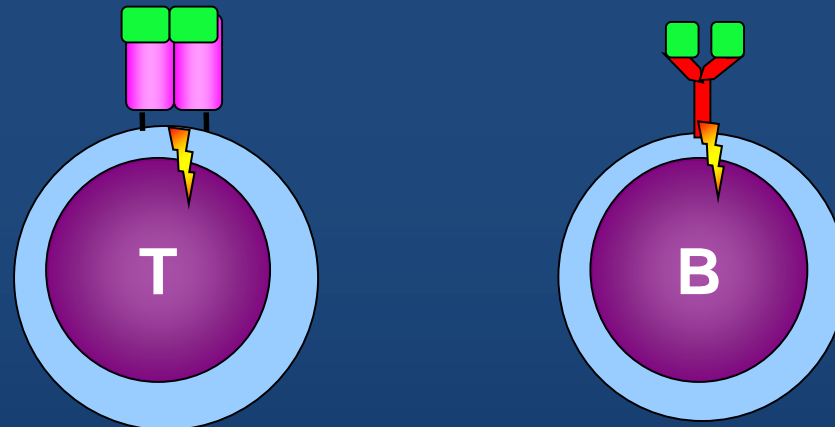
Ειδική αντιγονική υποδοχείς

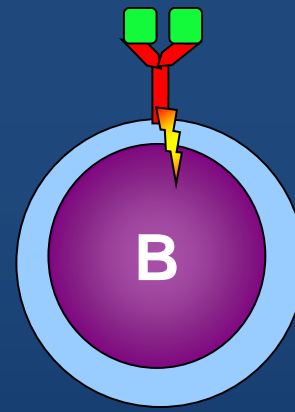
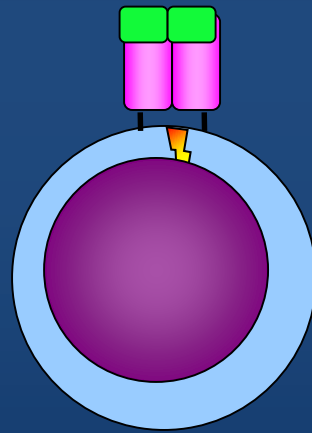


Τ και Β Λεμφοκύτταρα

Κοινό χαρακτηριστικό:

Ειδική αντιγονική υποδοχείς





V

D

J



V

D

J

1 2 3 4 5 6 7 8 9... 1 2 3 4 5 6 7 8 9... 1 2 3 4 5 6 7 8 9...



Ανασυνδυασμός DNA

Τυχαίος!!!

Βασικά βήματα της ωρίμανσης των Τ και Β λεμφοκυττάρων

Ag



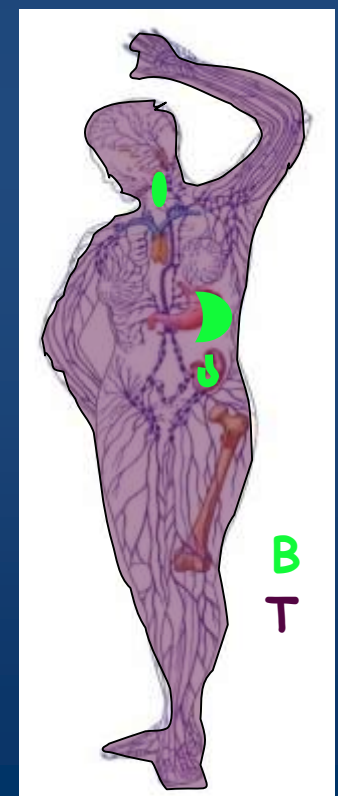
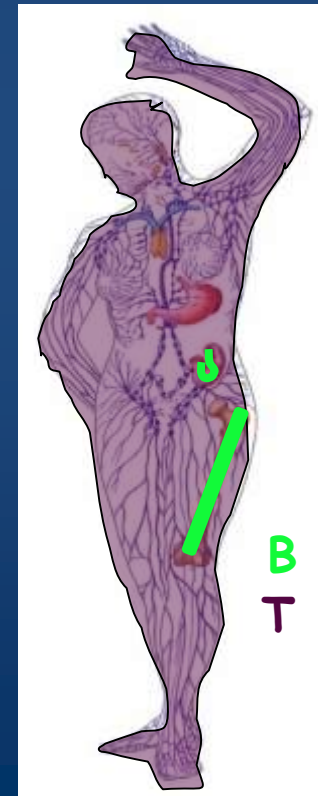
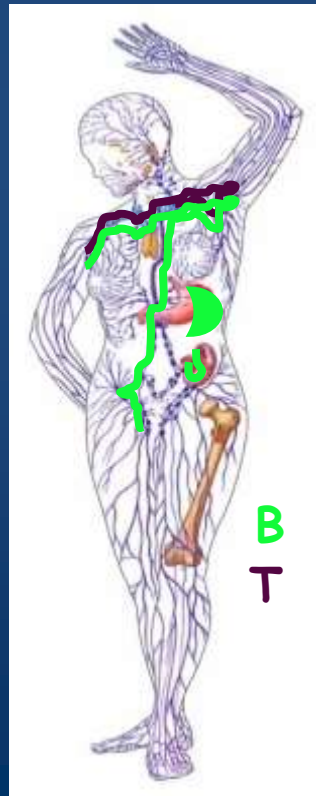
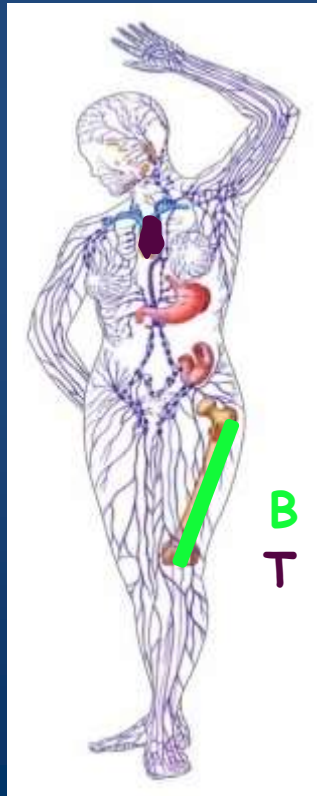
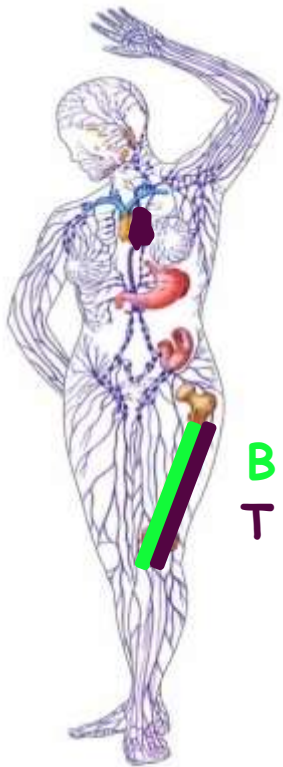
Δέσμευση
σειράς/
Ωρίμανση
Ανώριμα

Εκπαίδευση
Επιλογή
Ώριμα
παρθένα

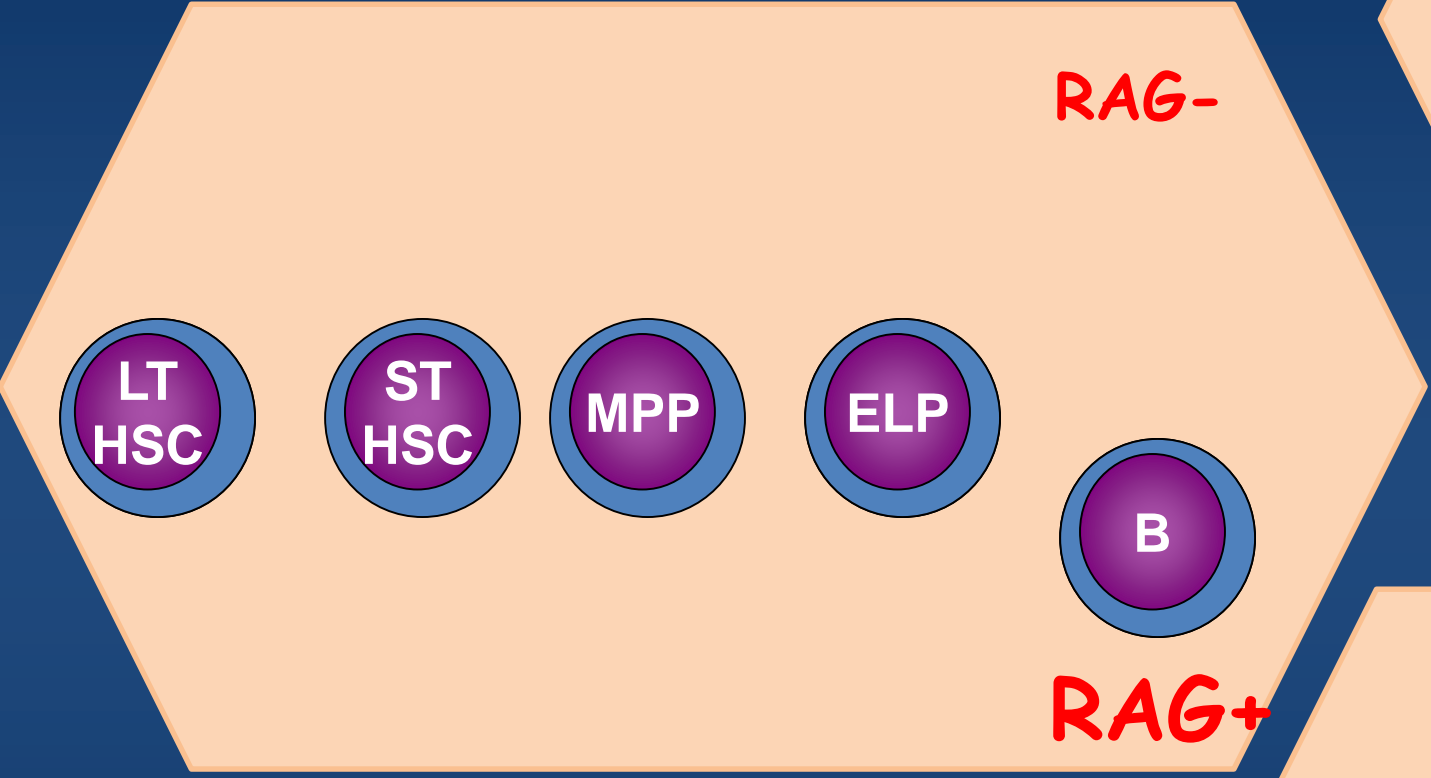
Αντιγόνο-
εξαρτώμενη
ωρίμανση

Δράση
Ανοσοδραστικά

Μνήμη
Μνημονικά







RAG-

LT
HSC

ST
HSC

MPP

ELP

B

RAG+

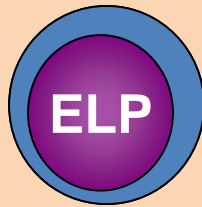
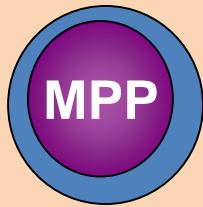
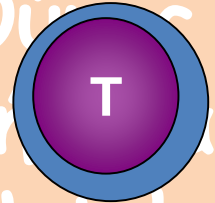
Θύμος
Σήματα
Notch

MO
IL-7

Τ Λεμφοκύτταρα

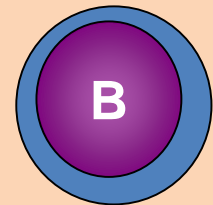
RAG-

Θύλακας
Σπληνική
Notch



RAG+

MO
IL-7



T, DC, myeloid

T, B, NK, DC, myeloid

Δεσμευμένο T

Notch

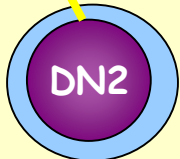
CD4^{lo}
CD117⁺⁺⁺
(Υποδοχέας
αυξητικού
παράγοντα)



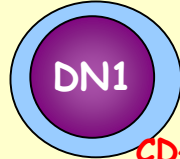
CD44⁻ CD25⁺
Αναδιάταξη
TCR γ β δ



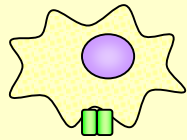
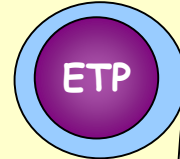
CD44⁻ CD25⁻



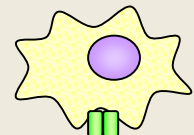
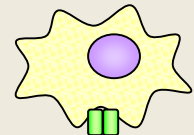
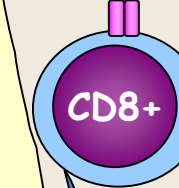
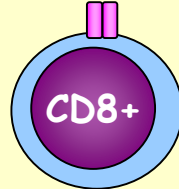
CD44⁺
(προσκόλληση)
CD25⁺
(ΔΡΑΣΗ IL-2)



CD44⁺
(προσκόλληση)
CD25⁻
(ΟΧΙ IL-2)



CD4⁺ CD8⁺
TCR⁺

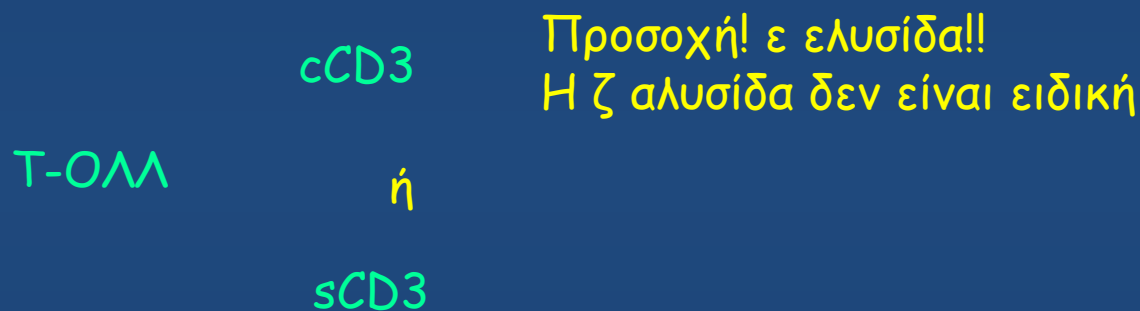


ΦΛΟΙΟΣ ΘΥΜΟΥ

ΜΥΕΛΟΣ ΘΥΜΟΥ

Μελέτη T- OΛΛ

Καθορισμός της T σειράς κατά WHO



cCD3 → ιδιαίτερα ειδικός και ευαίσθητος δείκτης.
Σε απουσία του αποκλείεται η T-OLM

Καθορισμός σταδίου ωρίμανσης του Τ-κυττάρου

Χρήσιμοι
δείκτες:

CD7, CD5, CD2, CD1, CD3, CD4, CD8,
CD56, CD34, TdT, TCR

pro T-ΟΛΛ
(EGIL T I)

CD7+ CD2-CD5- CD34+.....

pre T-ΟΛΛ
(EGIL T II)

CD7+ CD2+ ή και CD5+ ή και CD8

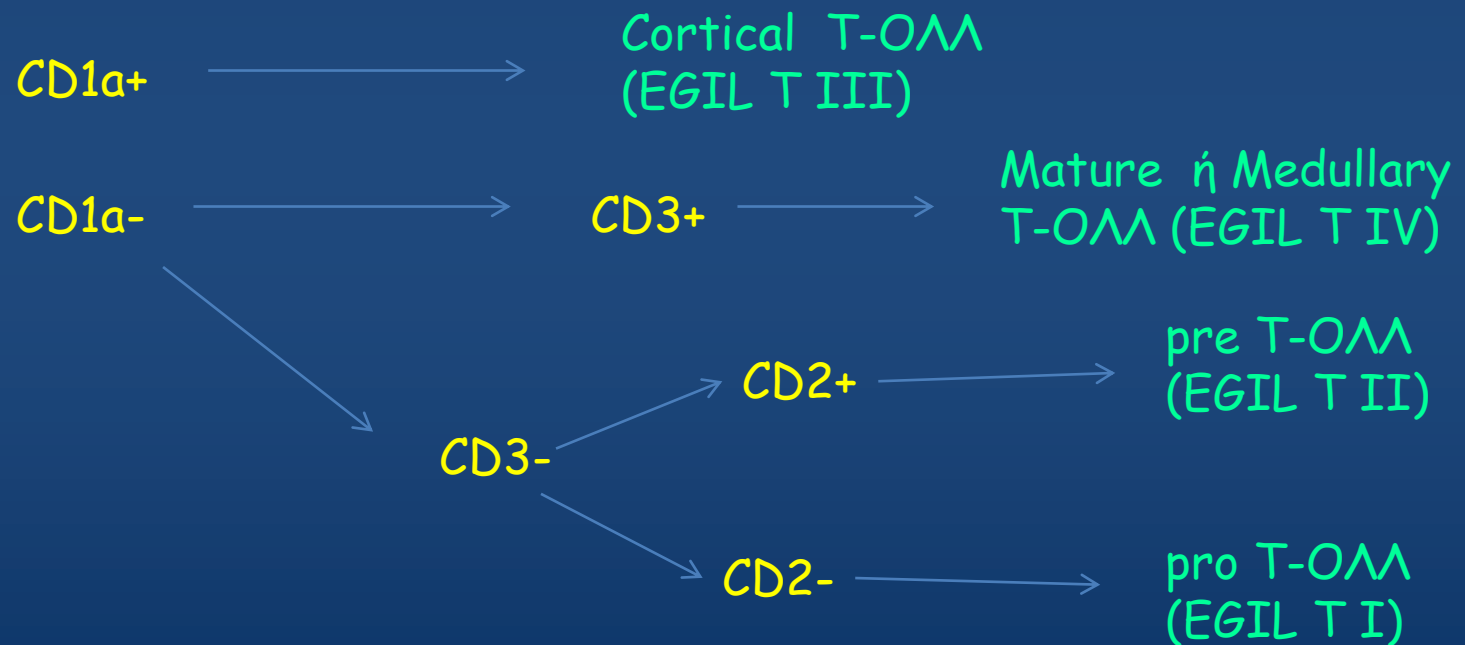
Cortical T-ΟΛΛ
(EGIL T III)

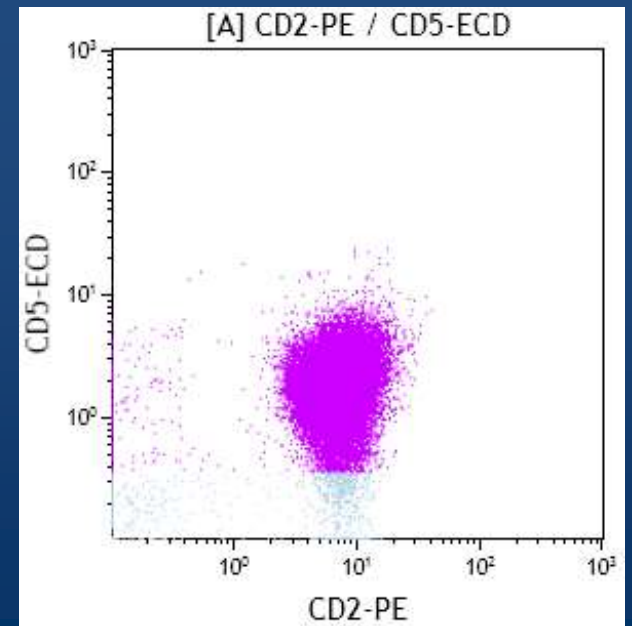
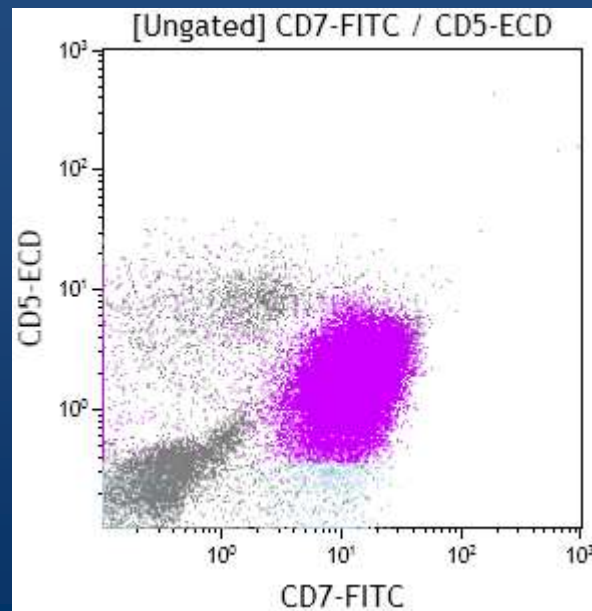
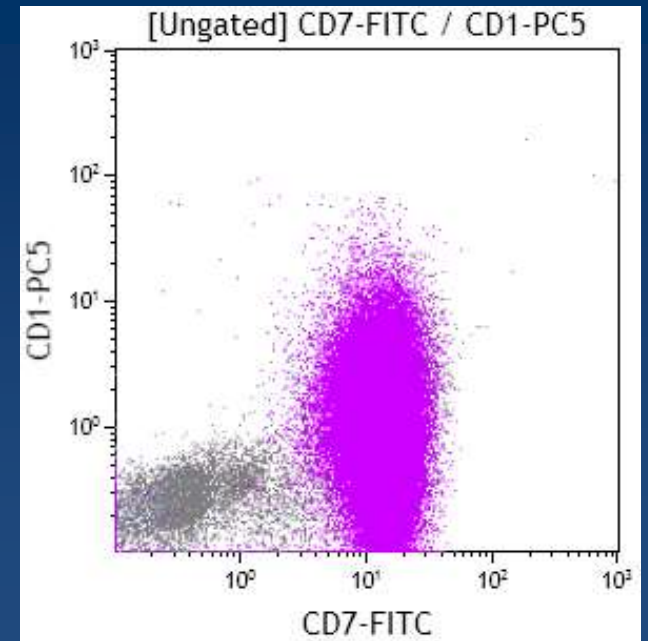
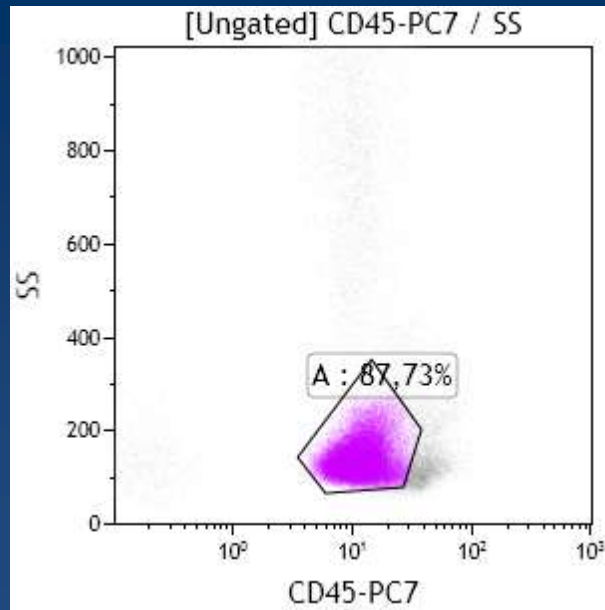
CD1a+

Mature ή Medullary
T-ΟΛΛ (EGIL T IV)

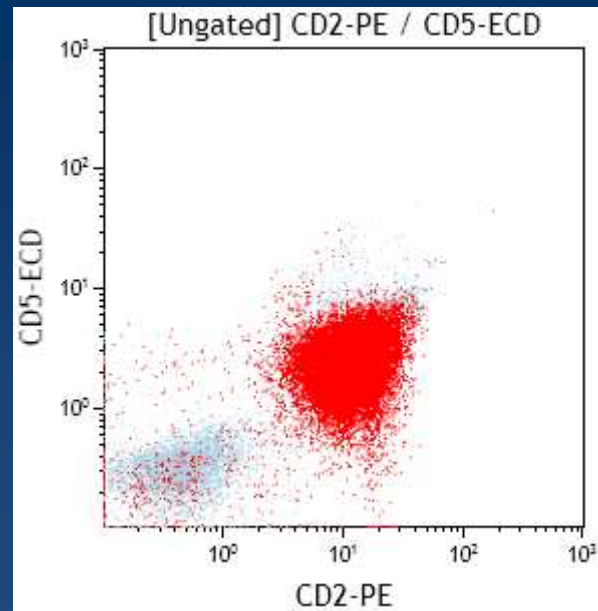
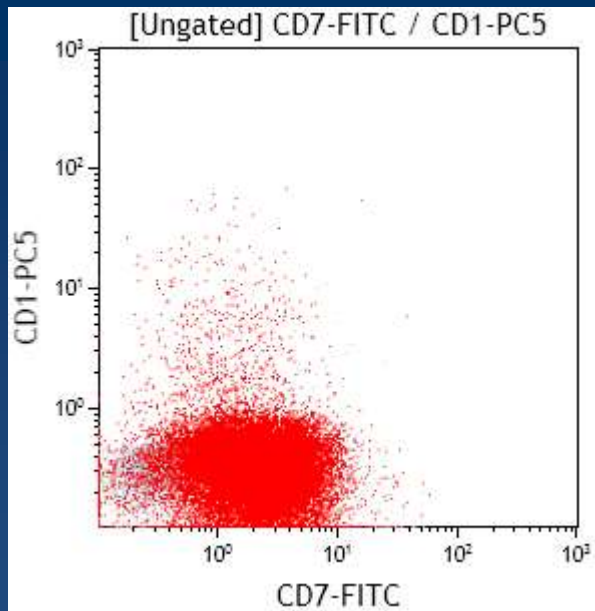
sCD3+ CD1a-

Βασικός Αλγόριθμος τυποποίησης της Τ-ΟΛΛ

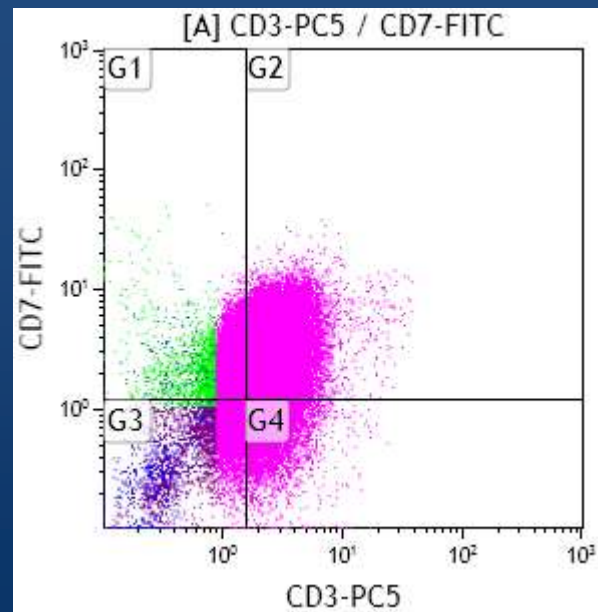
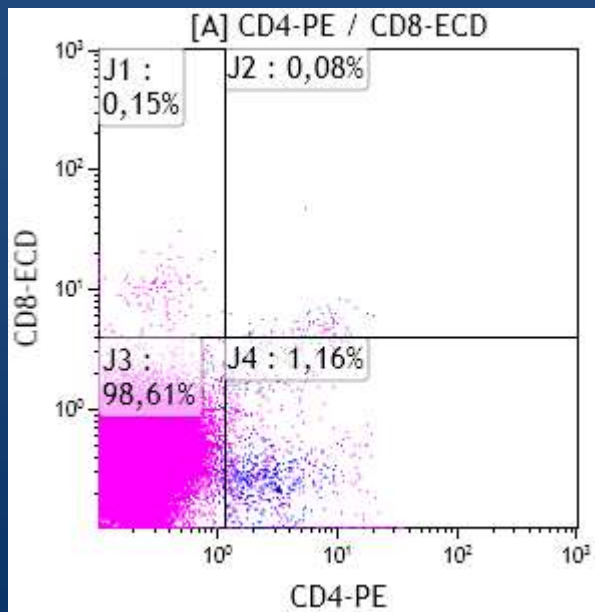




Cortical T-OMM
(EGIL T III)



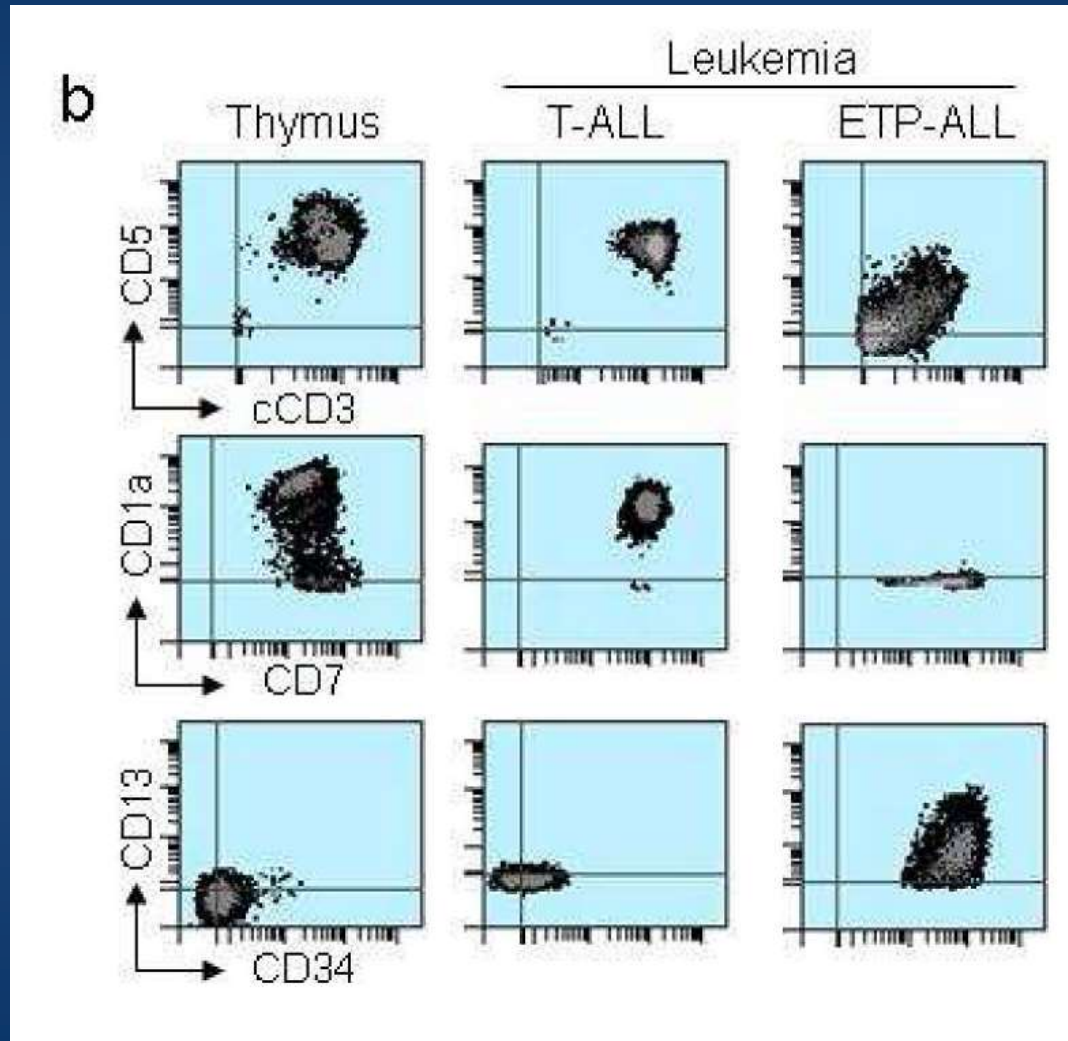
mature T-OAA
(EGIL T IV)



Προσδιορισμός προγνωστικών δεικτών

- CD56+ κακή πρόγνωση
- ETP κακή πρόγνωση

...και ETP
Early T cell precursors



Κριτήρια ETP-like:
CD1a-, CD8-, CD5<75%,
+ τουλάχιστον 1 από τα παρακάτω:
CD34, CD117, HLADR, CD13, CD33, CD11b, CD65

Μελέτη T- MRD

Πώς αναλύουμε την MRD;;

Γνώση συνδυασμών που δίνουν **ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΕΣ** πληροφορίες (LAIPs-Leukemia Associated ImmunoPhenotypes)

Γνώση διακυμάνσεων με τη θεραπεία
πχ **CD34, TdT, CD99, CD7** ασταθείς δείκτες!!

Γνώση πληθυσμών που μπορεί να μοιάζουν με βλαστικό, ιδίως σε περιόδους έντονης ανάπτυξης

Ποσοτικοποίηση με βάση έναν σταθερό δείκτη σε όλα τα σωληνάρια (συνήθως CD7) → συνδυασμός με χρώση SYTO.

Ποιους Δείκτες:::

T-ΟΛΛ

CD99 ↑ =LAIP

CD38 ↑ =LAIP

CD5 ↓ =LAIP

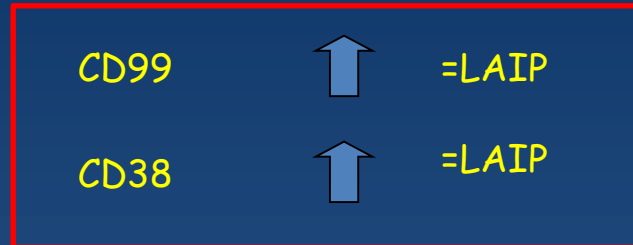
TdT ↑ =LAIP

cCD3 → Επιβεβαίωση T σειράς

CD7 → Αρχική επιλογή (gate)
κυττάρων

Εύρεση LAIPs...

T-ΟΛΛ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΠΡΟΣΕΧΕΙ ΚΑΝΕΙΣ



sCD3/cCD3 ← Υπάρχουν και φυσιολογικά
CD3/CD5 cCD3+ sCD3- (NK)
CD7+/CD5dim ← Προσοχή σε NK που είναι CD5-!!
CD45/CD5
CD45/CD99 ← Μπορεί και αιματογόνια CD99+!
CD7/CD99

CD5dim/CD99++

CD3/CD99

cCD3+/TdT+

CD45/sCD3

CD45/cCD3

TdT/CD99

CD4/CD8 ←

Απλά βλέπουμε πού πέφτει ο
πληθυσμός. Προσοχή CD4-CD8- μπορεί να
είναι φυσιολογικά TCRγδ+!!

Βασικός αλγόριθμος ανάλυσης MRD σε T-ΟΛΛ

sCD3-CD7+
TBLASTS, NK-CELLS
ΑΙΜΑΤΟΓΟΝΙΑ!!!

Gate σε CD7+ ή/και
cCD3+

↓
CD99 HI
TdT+
CD45 LO
CD7 HI
CD5 LO

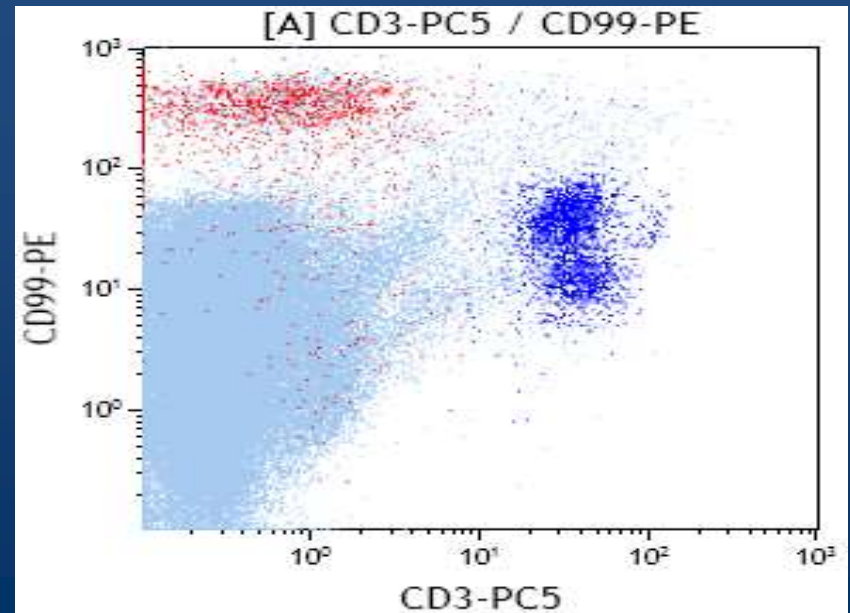
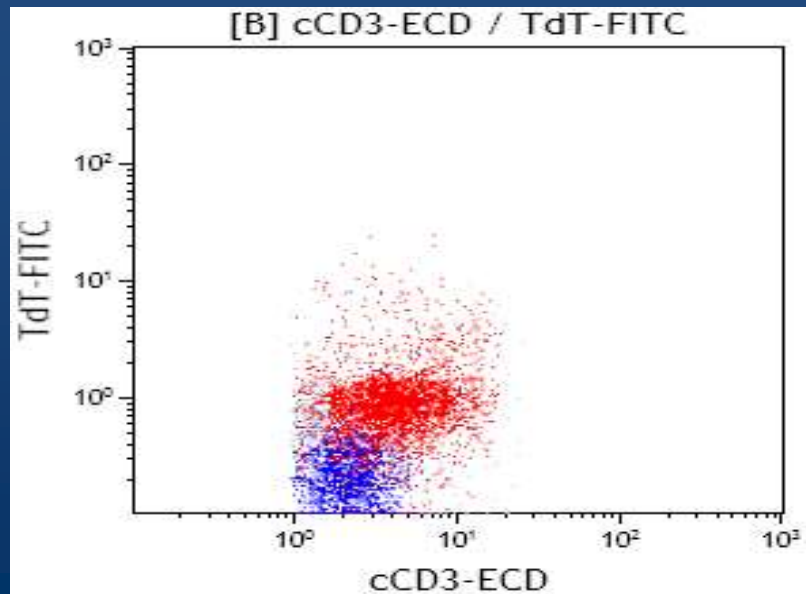
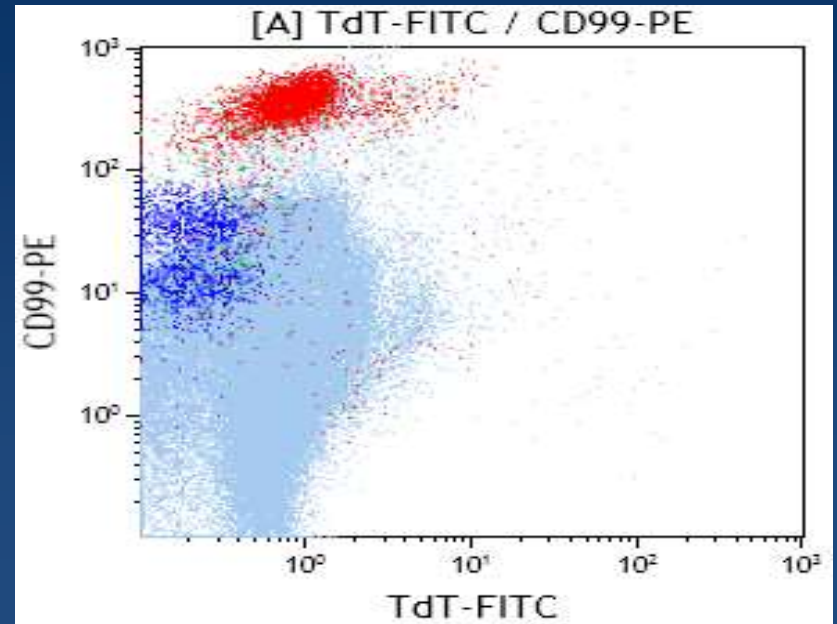
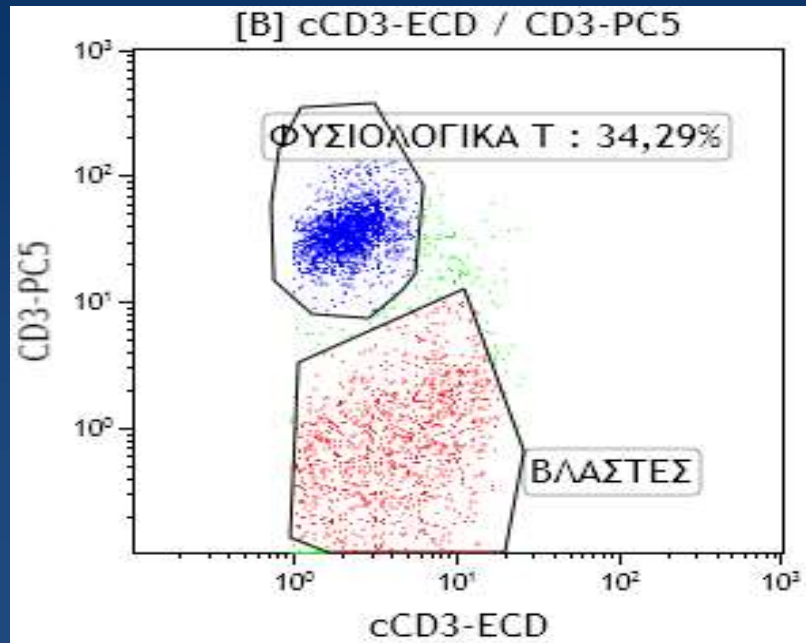
sCD3++CD7+ GATE
T-BLASTS T-CELLS

Gate σε sCD3+

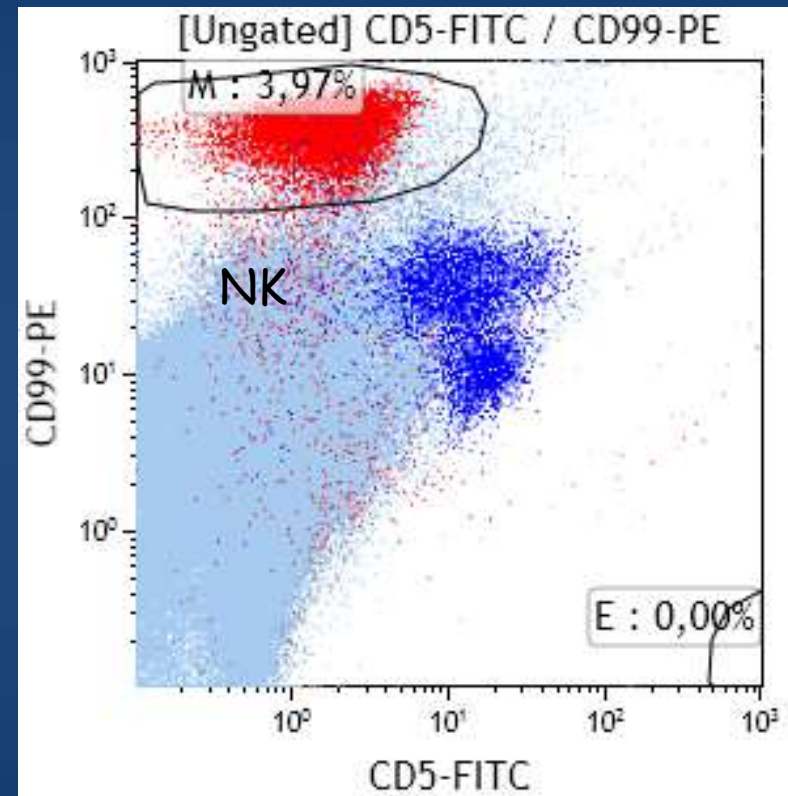
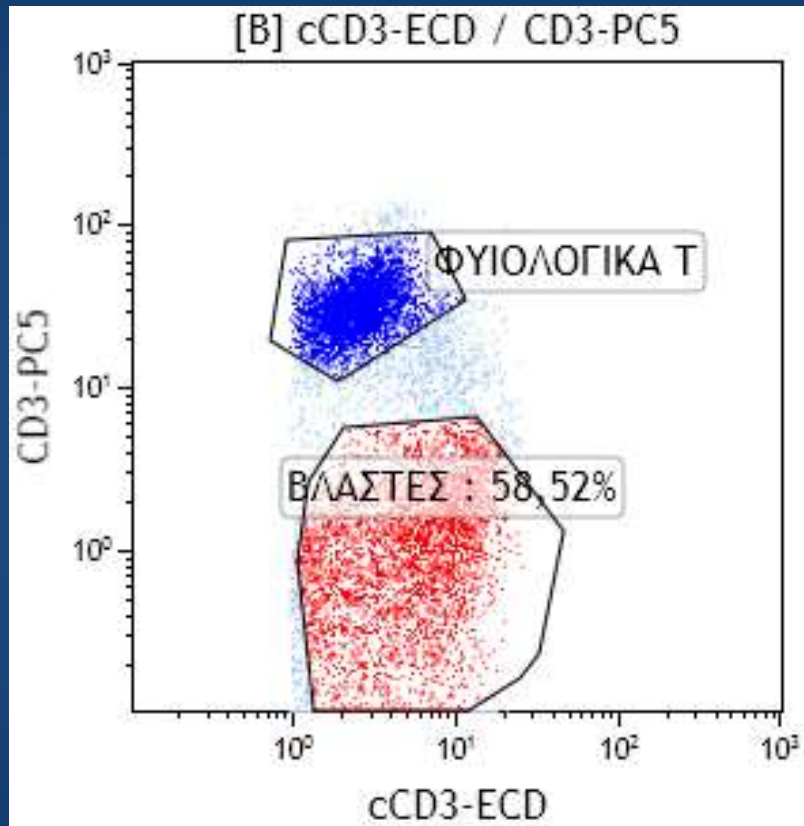
↓
sCD3 ανομοιογενές
CD99 hi
TdT+
CD45 lo
CD7 hi/lo

ΚΑΙ ΒΛΕΠΟΥΜΕ ΠΩΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΕΡΕΤΑΙ Ο
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΣΕ
CD4/CD8 (DN, DP, LO)

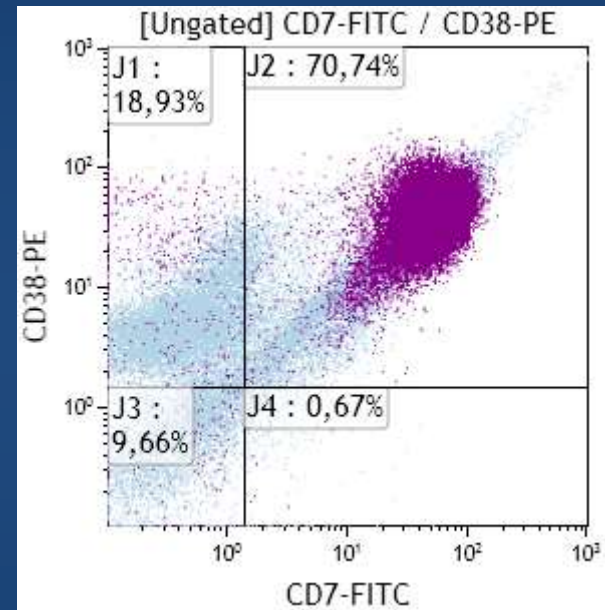
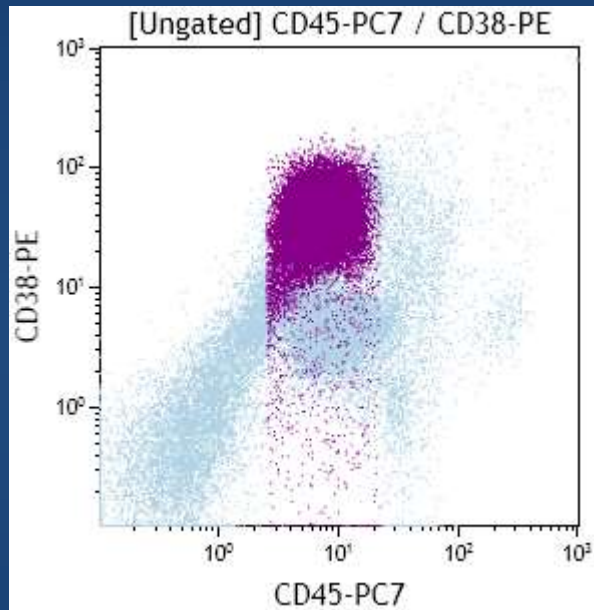
Υπερέκφραση CD99, TdT+



CD5dimCD99++



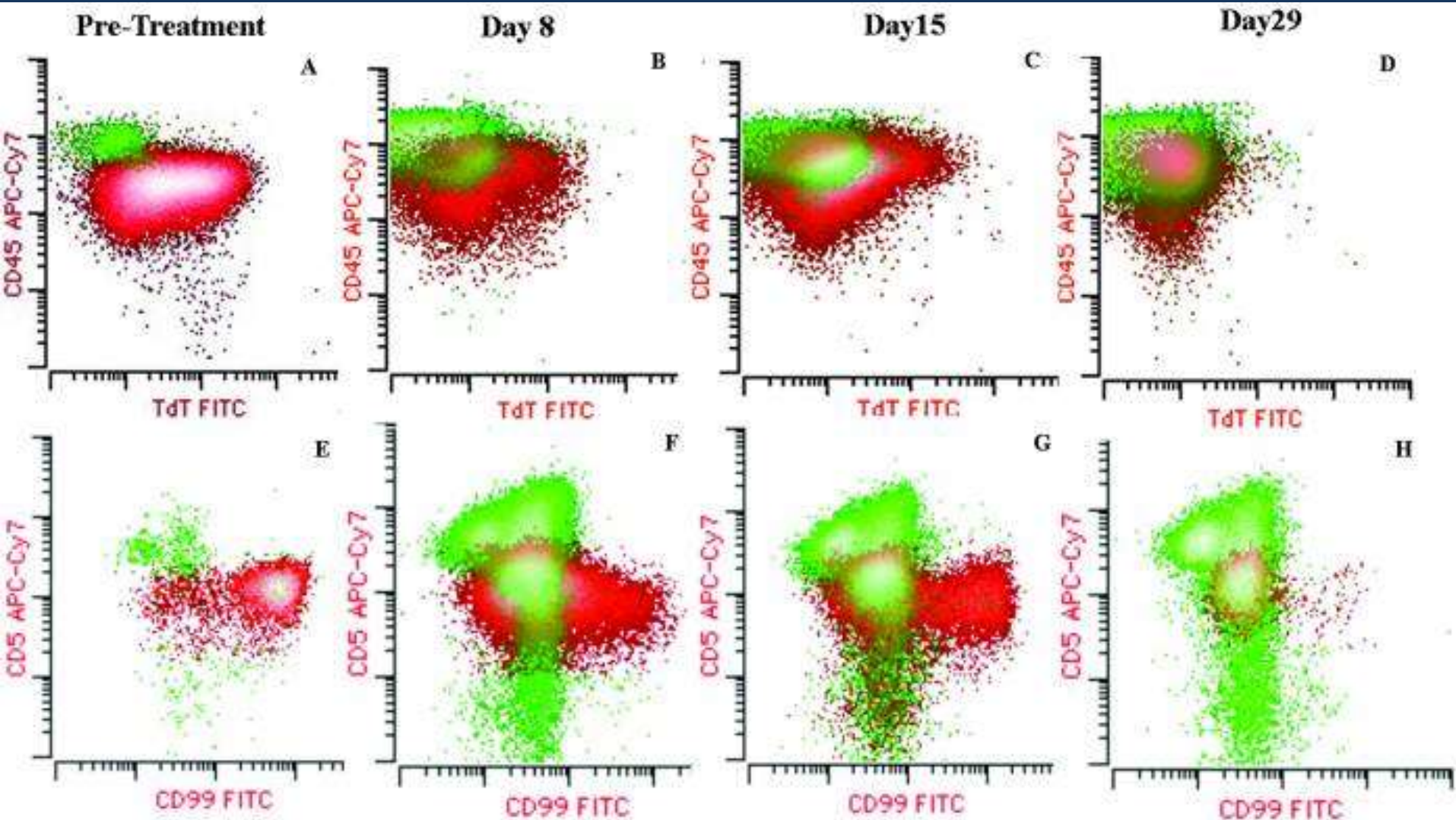
Υπερέκφραση CD38



Δείκτες αωρότητας ΑΣΤΑΘΕΙΣ!

TdT CD99 ,μπορεί να μειωθεί η έκφρασή ους!
CD34 ΔΕΝ χρησιμοποιείται λόγω αστάθειας και λόγω
σπανιότητας στις T-ΟΛΛ

Η διακύμανση των δεικτών με τη χορήγηση θεραπείας



Πληθυσμοί που μπορεί να μπερδέψουν!

ΠΡΟΣΟΧΗ!

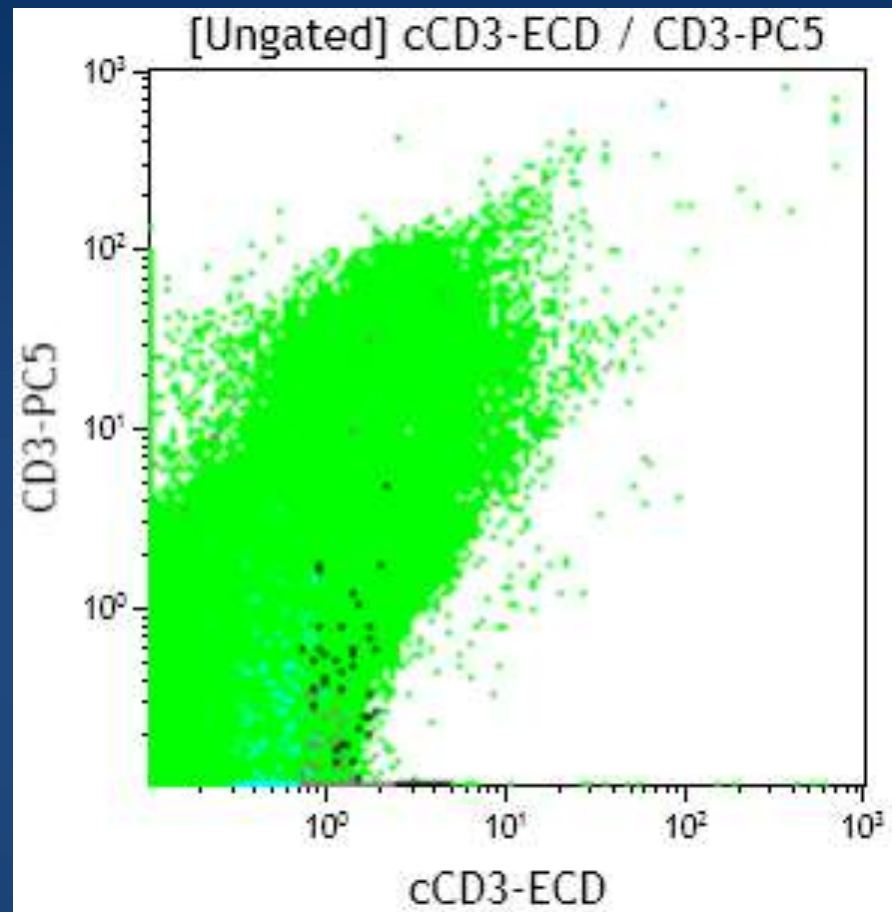
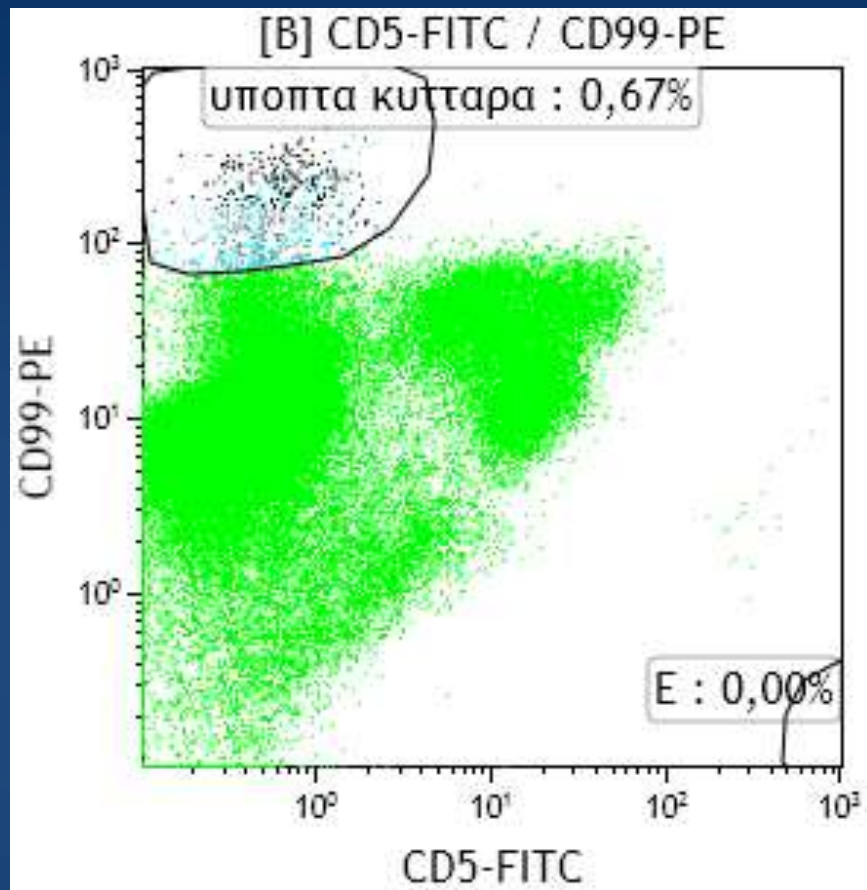
CD7+ CD5- ΜΠΟΡΕΙ ΚΑΙ cCD3+dim, ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ Τ
ΣΕΙΡΑ: είναι NK!

cCD3+sCD3- μπορεί να είναι NK!!

Να υπάρχει σωληνάριο για αποκλεισμό των NK!!

CD7+dim CD5- CD99+ CD45lo μπορεί να είναι προγονικά της Β-σειράς!
CD7 μπορεί να θετικοποιηθεί και σε μονοκύτταρα!!!

Να υπάρχει σωληνάριο με χρώση για cCD3



Μπορεί να μην είναι ΒΛΑΣΤΕΣ

Ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος

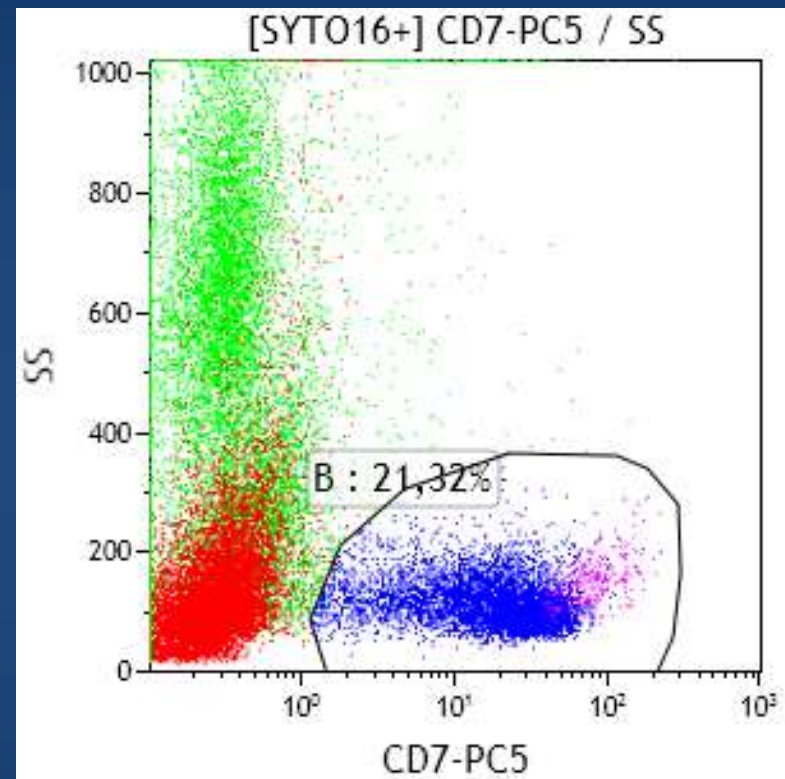
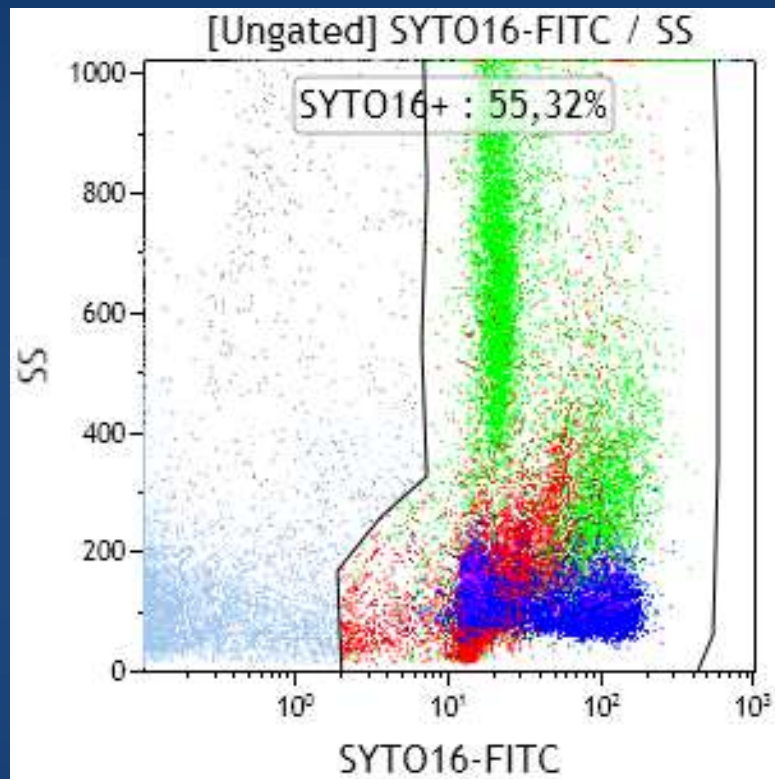
Έκφραση ως % επί των ζώντων εμπυρήνων (SYTO-16+ ή SYTO-41+)

Συνήθως συνδυασμός του CD7 και του CD45 με το SYTO-16

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Σε σωληνάρια με κυτταροπλασματικές χρώσεις μπορεί % διαφορετικό του πραγματικού.

Λαμβάνουμε υπόψη μόνο το % από τα σωληνάρια με επιφανειακές χρώσεις και με σαφή διαχωρισμό των βλαστών.
ΌΧΙ μέσος όρος!

Ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος



Αναγωγή του υπολογισθέντος ποσοστού των βλαστών επί των CD7 στο ποσοστό των CD7 επί των SYTO-16

Τεχνικά στοιχεία

	EUROFLOW	I-BFM ALL FLOW MRD
Είδος δείγματος	MNCs ή ολικό αίμα	MNCs ή ολικό αίμα
Σύνολο μετρούμενων γεγονότων	10*6	10*6
Αριθμός χρωμάτων	8	≥4
Ορισμός θετικής MRD	≥100 events	≥30 events
Ορισμός αρνητικής MRD	<20 events	<10 events
Ευαισθησία	10*-4	10*-4

Χρήση syto16 ή syto41 (χρώση εμπυρήνων).
Ποσοστό επί των syto+

Ποσοτική μέτρηση καλύτερη σε σωληνάκι
επιφανειακής χρώσης

Σωληνάριο 1	Syto-16	CD7-PE	CD45PERcP	CD3APC
Σωληνάριο 2	CD99-FITC	CD7-PE	CD5-PC5	CD3
Σωληνάριο 3	TdT-FITC	CD7-PE	cCD3-PerCP	CD3-APC
Σωληνάριο 4	CD4-FITC	CD8-PE	CD45-PerCP	CD3-APC

Panel 4 χρωμάτων προτεινόμενο από ALL-IC flow group

	FITC	PE	ECD	PerCP	PC7	APC	Alexa 700	APC-Cy7	VIOLETT
Σωλ.1	TdT	CD99	CD3	CD45	CD5	CD7	cCD3		SYTO41
Σωλ.2	CD4	CD99	CD3	CD45	CD5	CD7	CD38	CD8	SYTO41

Panel 9 χρωμάτων προτεινόμενο από ALL-IC flow group

Ευχαριστώ !!