

ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ

Γ' Μέρος Βασικής Εκπαίδευσης στην Κυτταρομετρία
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ
13-15 Σεπτεμβρίου 2013 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

Γιαννάκη Ευθαλία
Τμήμα κυτταρομετρίας, Εργαστήριο
Αιματολογίας, «Θεαγένειο»
Αντικαρκινικό Νοσοκομείο
Θεσσαλονίκης.



Τι είναι;

- Οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες αποτελούν ένα σύνολο νοσημάτων διαβαθμιζόμενης κλινικής σημαντικότητας, που συμπεριλαμβάνουν την ασυμπτωματική παρουσία μικρών κλωνικών πλασματοκυττάρων έως την αντικατάσταση του μυελού των οστών (ΜΟ) από κακοήθη πλασματοκύτταρα (ΚΤΚ).

ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ WHO 2008

Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS)

Πολλαπλό Μυέλωμα (ποικιλίες)

- Ασυμπτωματικό μυέλωμα (Smoldering)
- Μη εκκριτικό μυέλωμα
- Πλασματοκυτταρική λευχαιμία

Πλασματοκύττωμα

- Μονήρες οστικό
- Εξωμυελικό

Νοσήματα εναπόθεσης ανοσοσφαιρινών

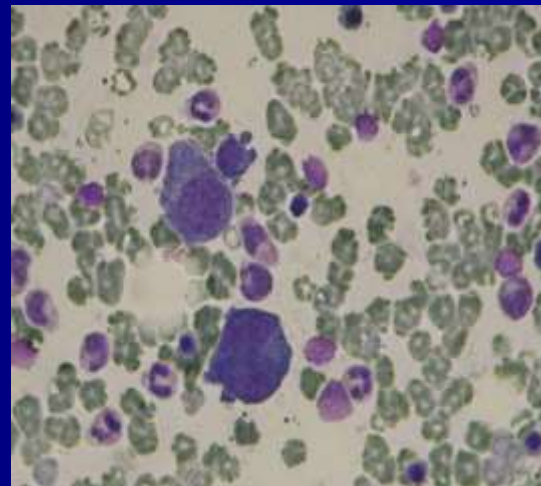
- Πρωτοπαθής αμυλοείδωση
- Συστημική νόσος εναπόθεσης ελαφριών & βαριών αλύσων

Οστεοσκληρωτικό μυέλωμα

ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΑΦΟΡΟΥΝ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΤΚ)



Φυσιολογικό ΤΚ



Νεοπλασματικά ΤΚ

Πίνακας 1. Σύγκριση των πιο συχνών ανοσοφαινοτύπων των φυσιολογικών και νεοπλασματικών ΤΚ

	Φυσιολογικά ΤΚ	Μυελωματικά ΠΚ
CD138	+++	+++ / ++
CD38	+++	+++ / ++
CD28	-	+ ή -
CD56	-	+++
CD19	+/-	-
CD27	++	+ ή -
CD45	+	- ή dim

Πίνακας 2. Συμπληρωματικός επιφανειακών αντιγόνων

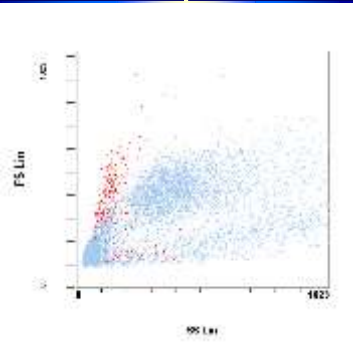
	Φυσιολογικά ΤΚ	Μυελωματικά ΤΚ
IGs surf & cyto	+ / ++ κ/λ: 2/1	++ / +++ κλωνικά
CD117	-	- ή ++
CD33	-	- ή +
CD52	-	- ή + / ++
CD81	+	- ή + / ++
CD200	+ dim	+ ή -
CD20	-	- ή +

Paiva et al, Clin Cytom 2010

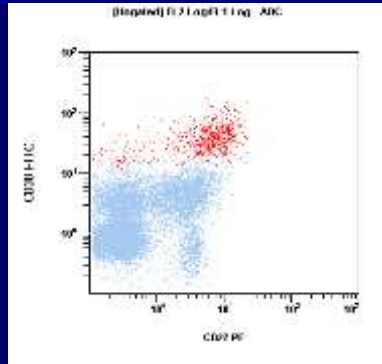
Paiva et al, Leukemia 2012

Kumar et al, Bets pract Res Clin Haem 2010

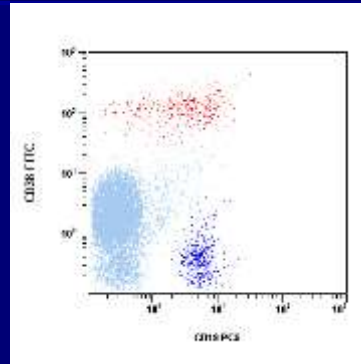
Φυσιολογικό Πλασματοκύτταρο



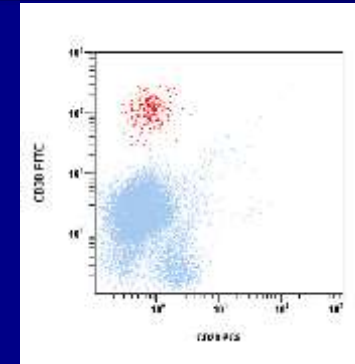
CD27 +



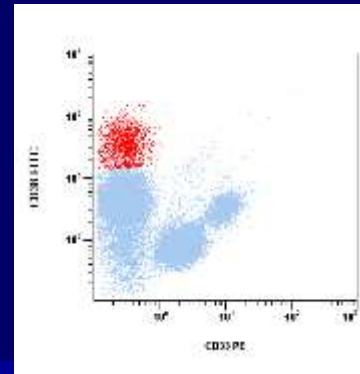
CD19 +



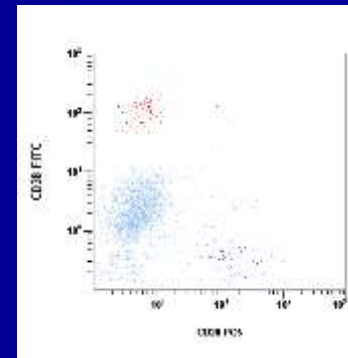
CD28 -



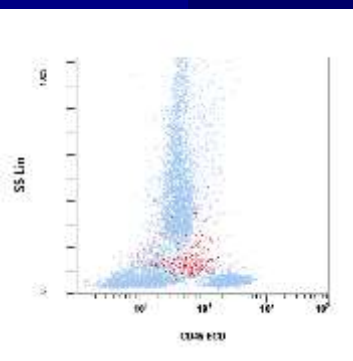
CD33 -



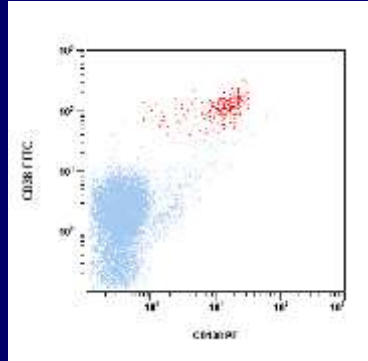
CD20 -



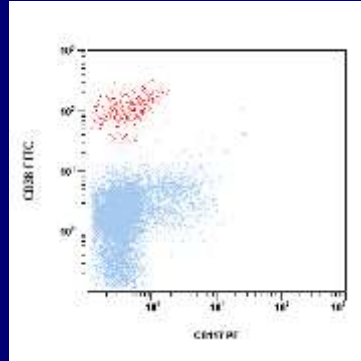
CD45 +



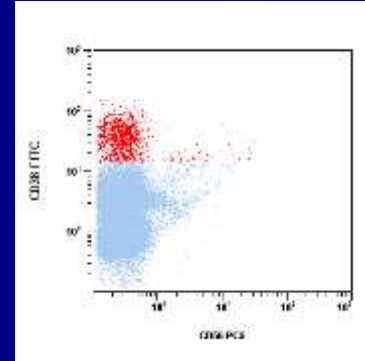
CD38 ++ /CD138 ++



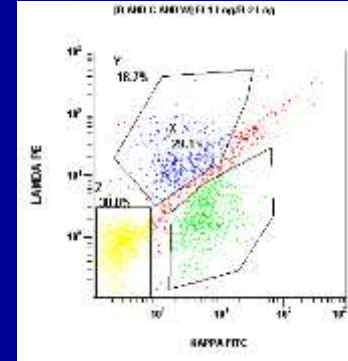
CD117 -



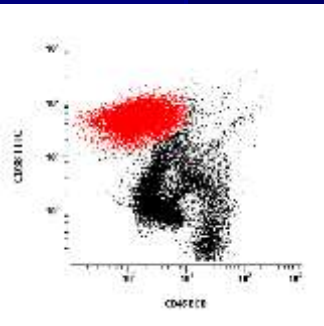
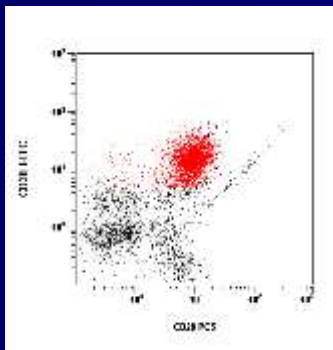
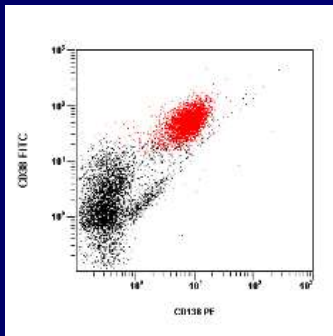
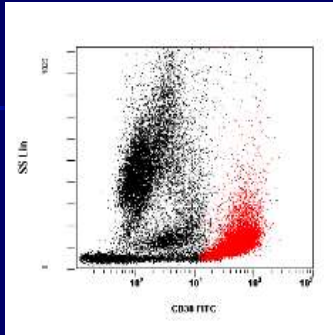
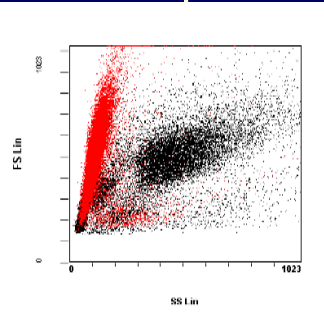
CD56 -



K/L 1-2/1

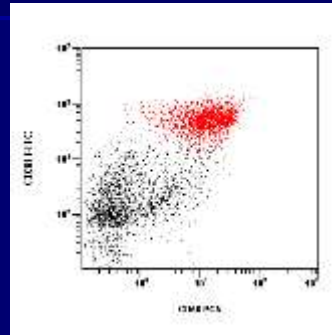


Μυελωματικό Πλασματοκύτταρο (ΜΠΚ)

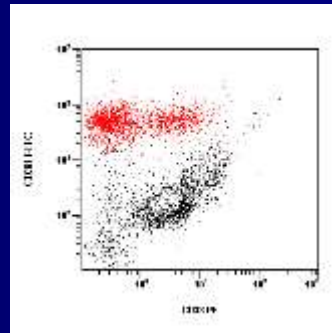


CD38 +/++

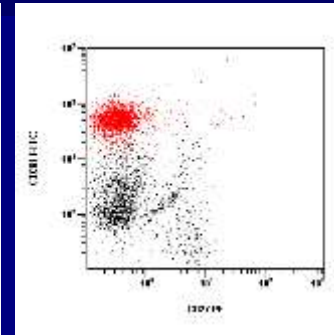
CD28 + (ή -)



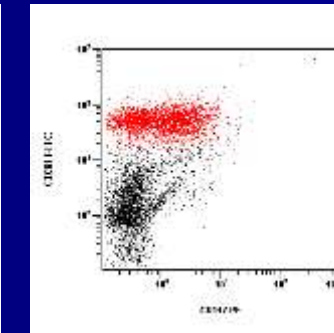
CD56 + (ή -)



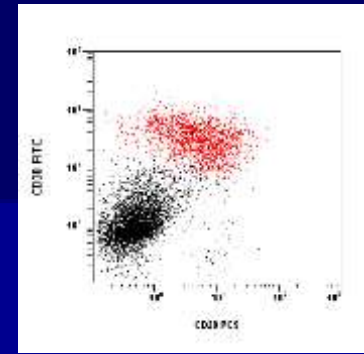
CD33 - (ή +)



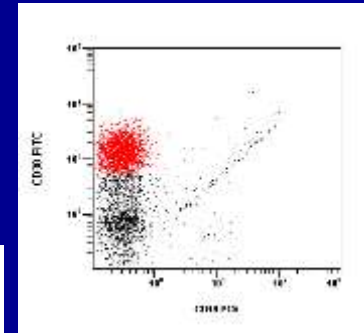
CD27 - (ή +)



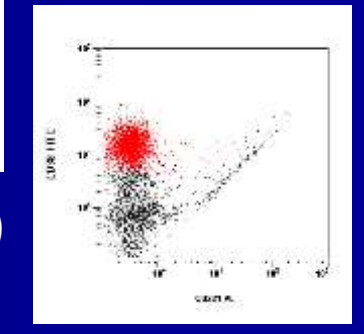
CD117 + (ή -)



CD20 + (ή -)



CD19 - (ή +)



CD22 - (ή +)

Πλασμακυτταρικούς δείκτες

CD38⁺⁺⁺ 100%,
CD138⁺ 98%,
sIg⁺ 30%,
cIg⁺ 100%

Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο

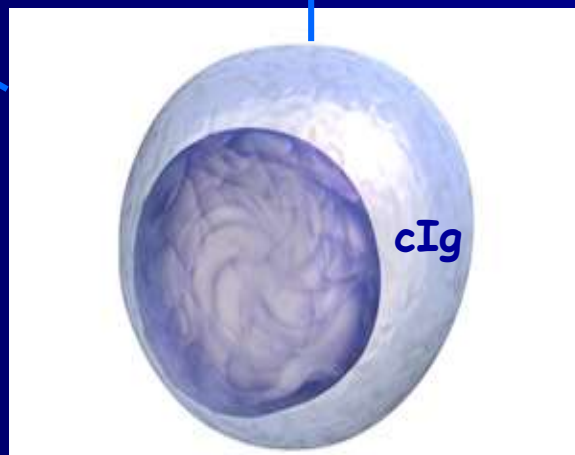
CD45⁺ 20-40%

Μόρια προσκόλλησης

CD56^{+/++} 60-70%,
β1/β2 integrins⁺ 98%

Β-Λεμφοκυτταρικούς δείκτες

CD19⁺ 3-8%,
CD20⁺ 2-25%,
CD22⁺ 20-30%,
CD10⁺ 6-20%,
HLA-DR^{het} 10%,
CD23⁺ 0%,
FMC7⁺ 0%.
CD200^{+/++} 80%
CD52⁺ 15-45%



ΠΜ Πλασματοκύτταρο

Δείκτες μυελικής σειράς

CD13⁺ 28%,
CD33^{+/++} 24%

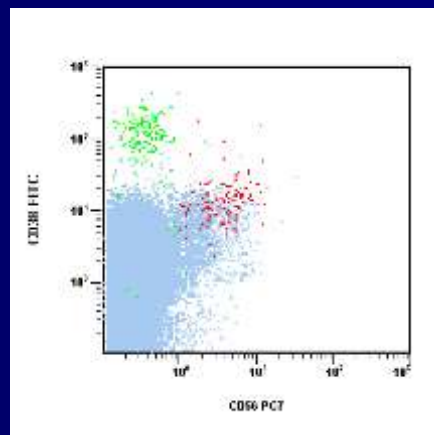
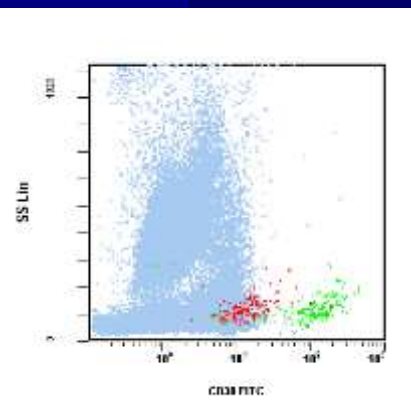
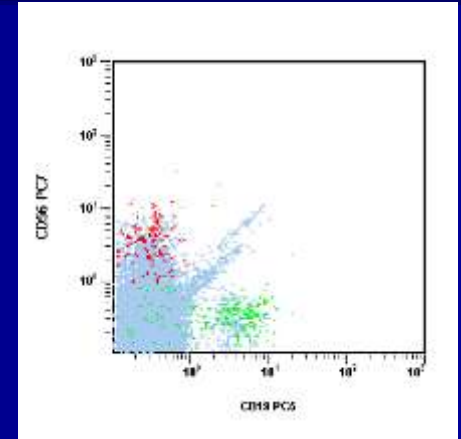
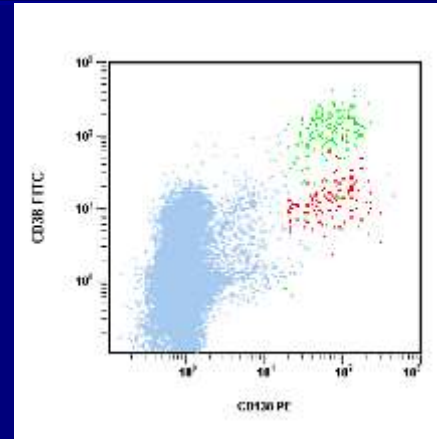
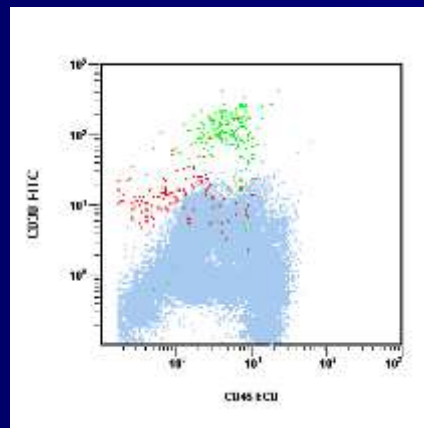
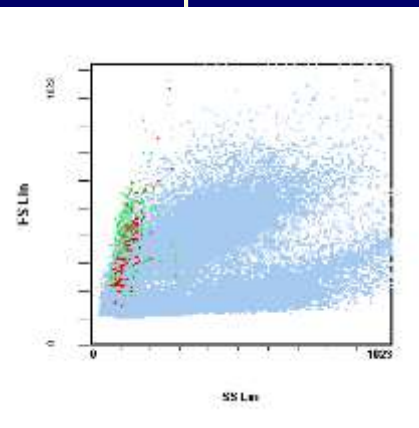
Συνδιεγερτικά μόρια

CD28^{+/++} 30-40%,
CD40⁺ 100%
CD81^{+/++} 45%

Βλαστικούς δείκτες

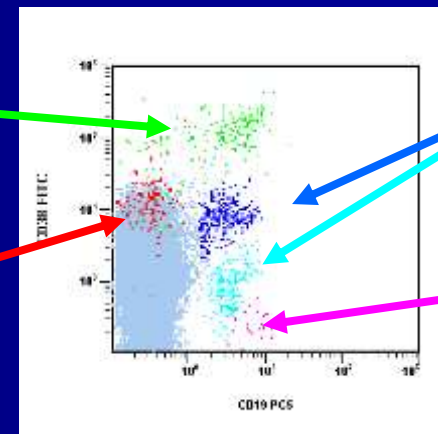
CD34⁺ 0%,
CD117⁺ 27%

MGUS (σύγχρονη παρουσία φυσιολογικών και μυελωματικών ΠΚ)



Φυσιολ ΠΚ

Μυελ ΠΚ

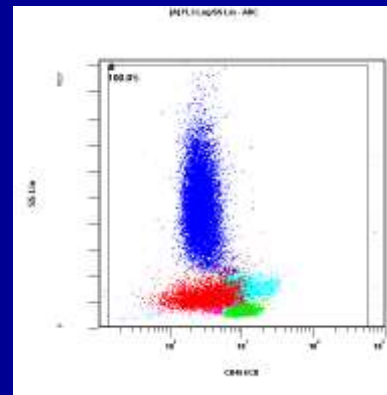
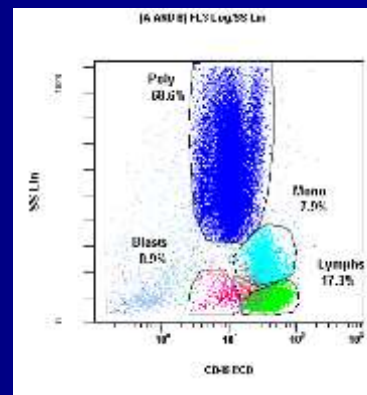
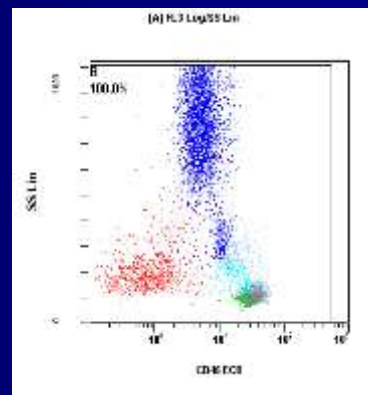
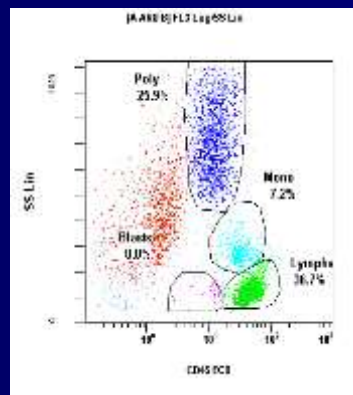
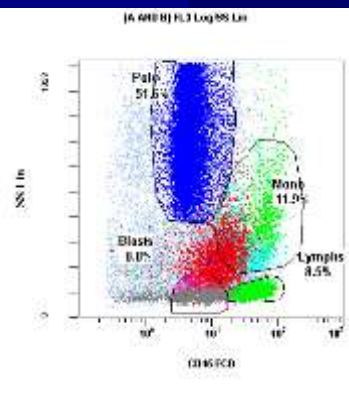
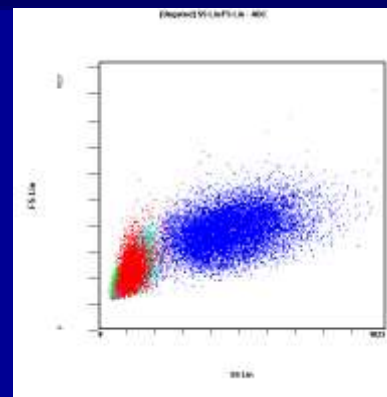
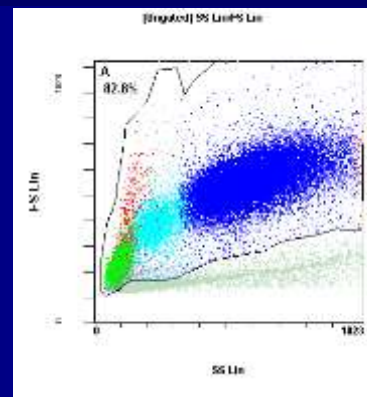
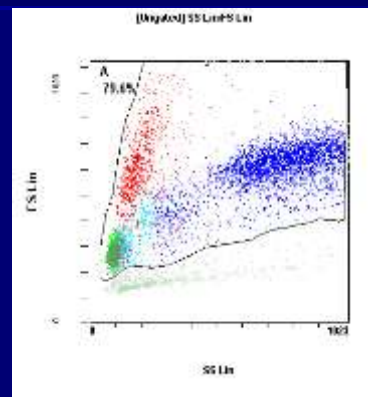
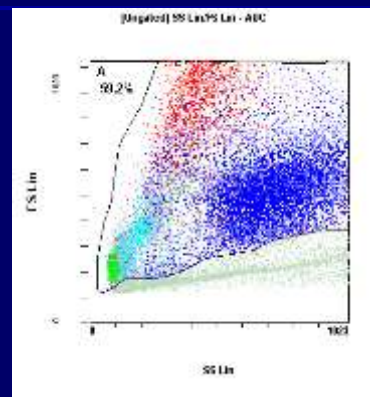
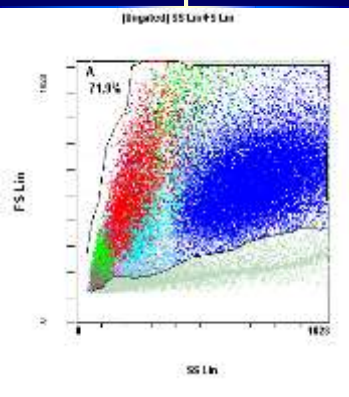


Αιματογόνια

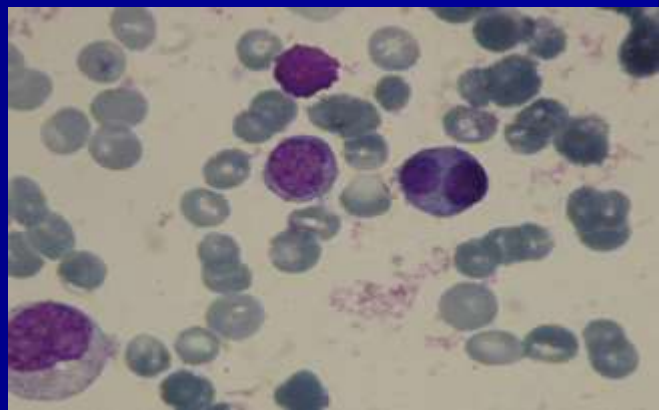
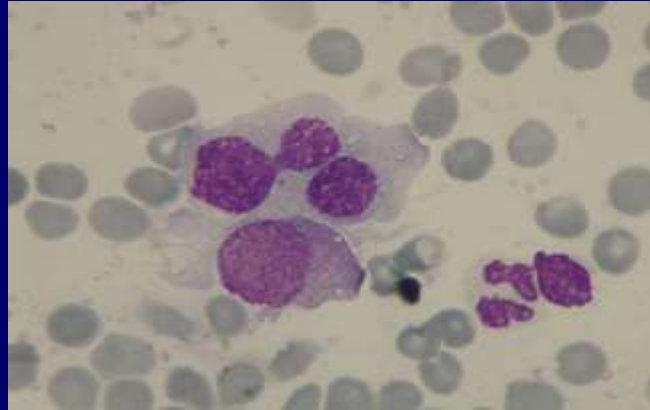
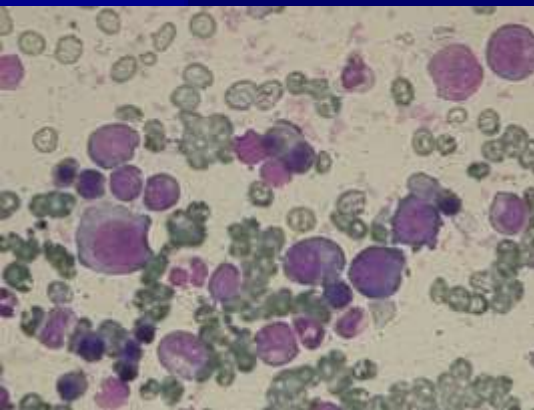
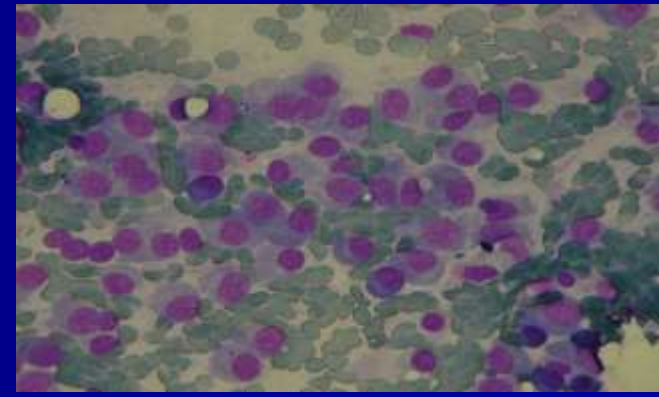
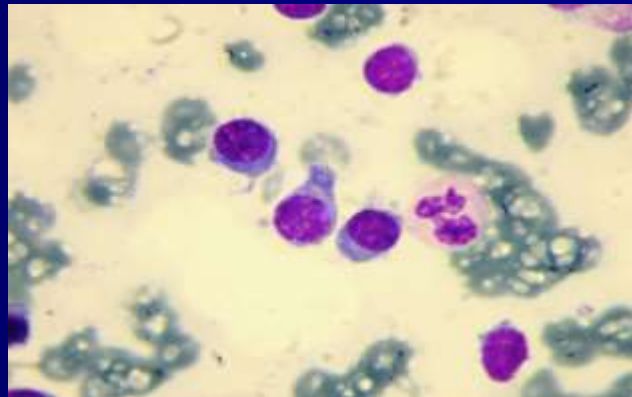
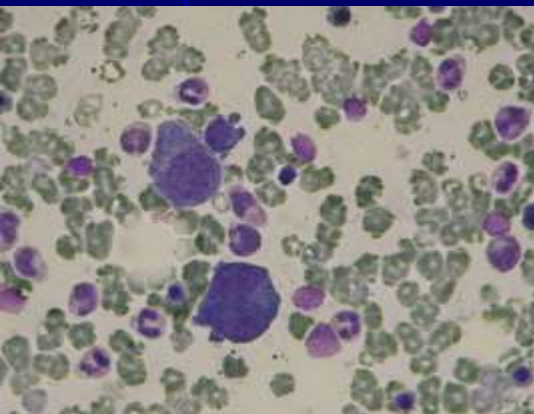
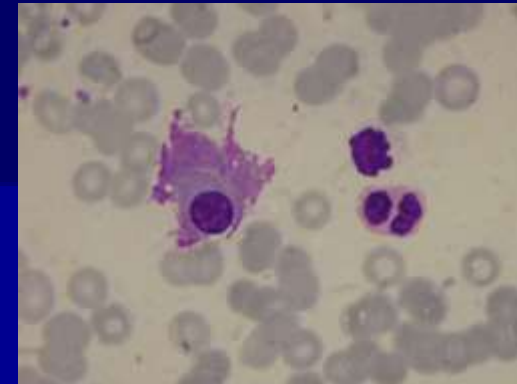
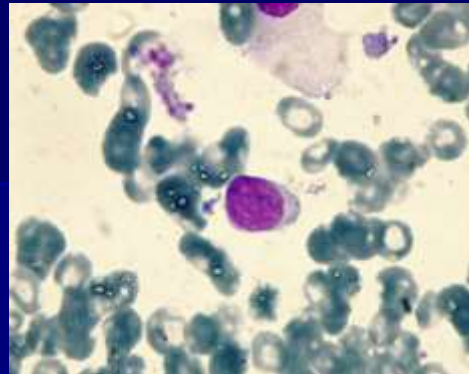
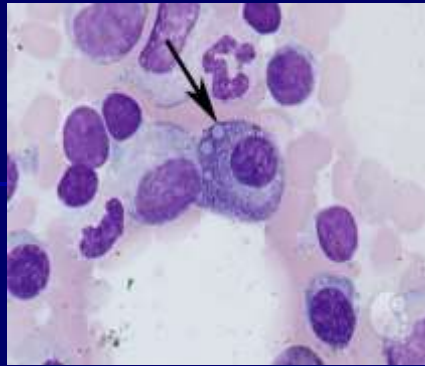
Β κύτταρα

Προβληματισμός #1

Τα αΠΚ δεν έχουν πάντα ένα προβλέψιμο προφίλ σκέδασης FS/SS & 45/SS

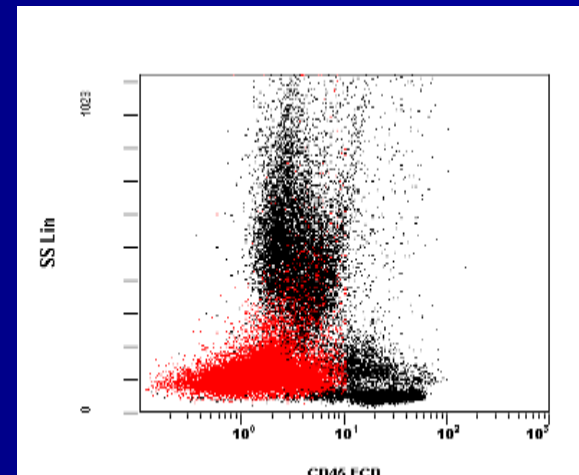
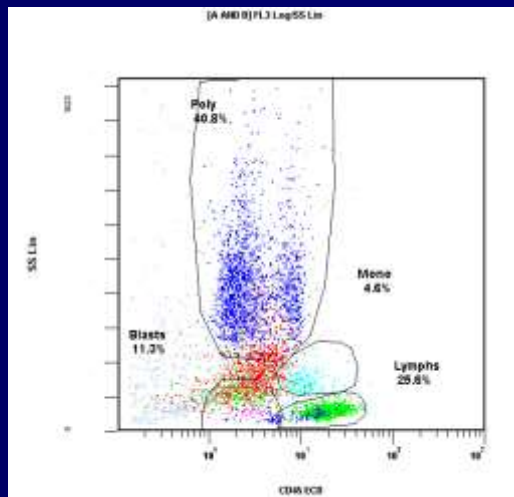
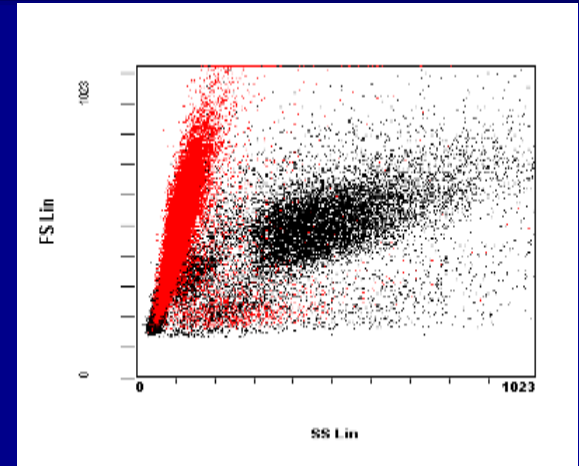
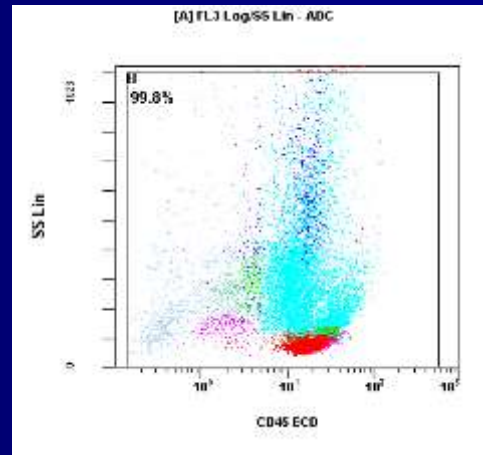
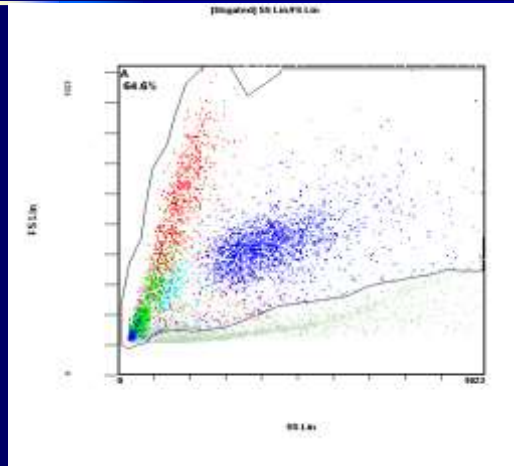


Ποικιλομορφία και μορφολογικά



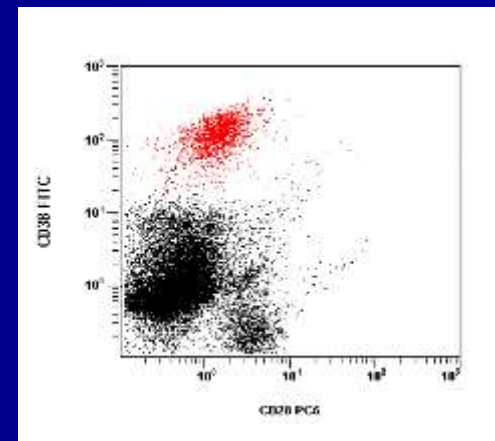
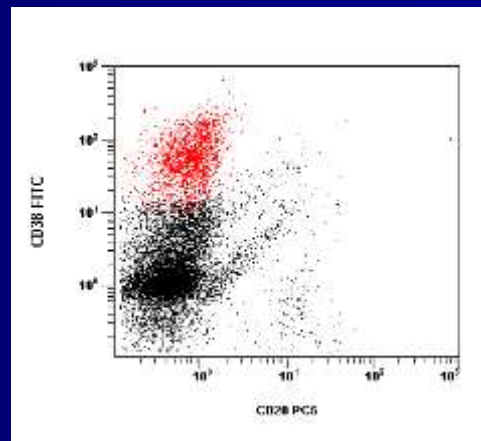
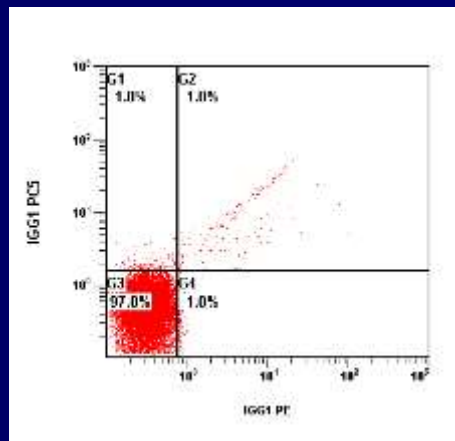
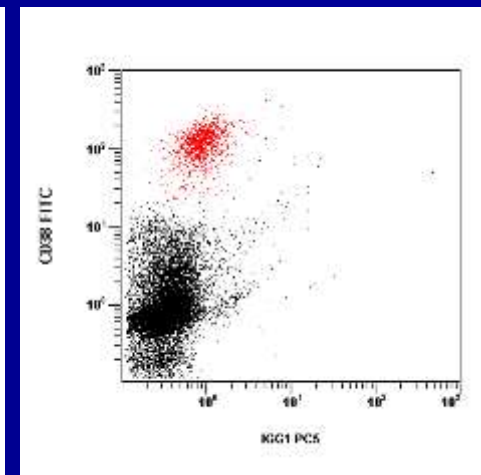
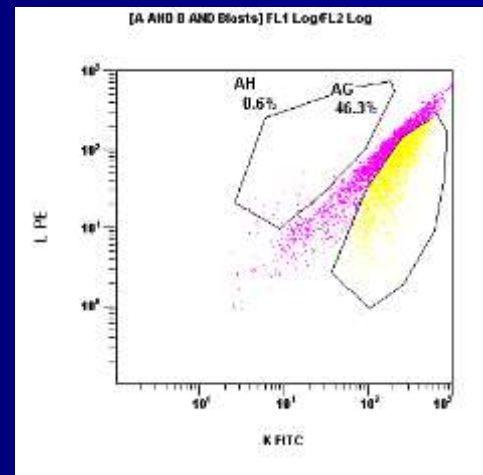
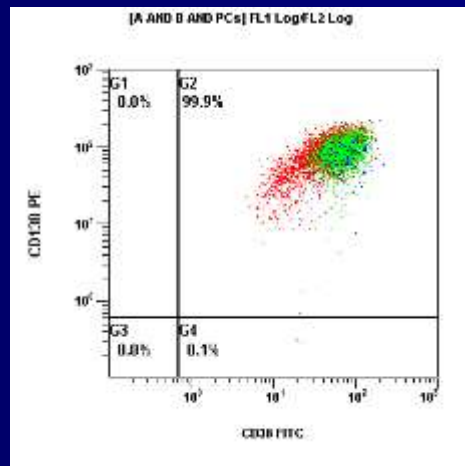
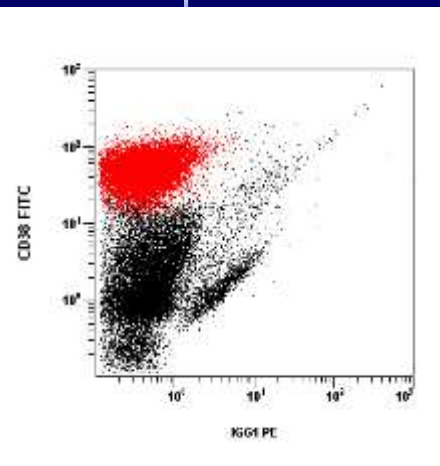
Προβληματισμός #2

Τα αΠΚ τείνουν να προσκολλούνται σε άλλα κύτταρα



Προβληματισμός #3

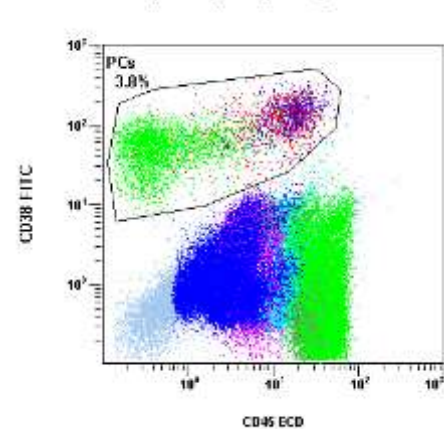
Τα αΠΚ συχνά αυτοφθορίζουν έντονα



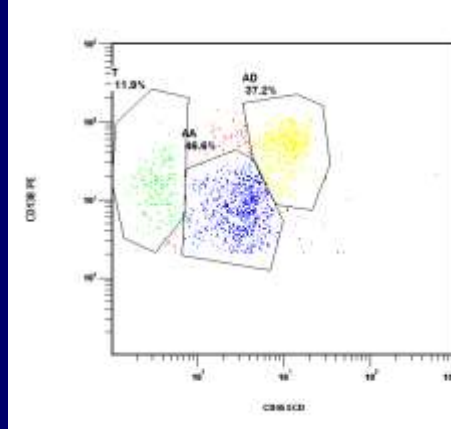
Προβληματισμός #4

Τα αΠΚ συχνά δεν αποτελούν ένα ομοιόμορφο πληθυσμό

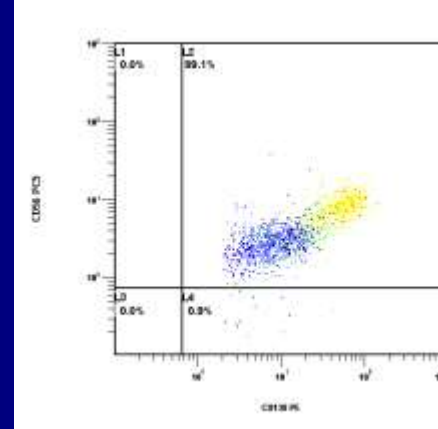
[A AND B] FL3 LogFL3 Log



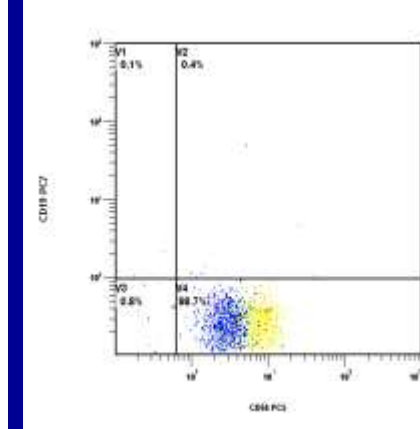
[A AND B AND PCa] FL3 LogFL3 Log



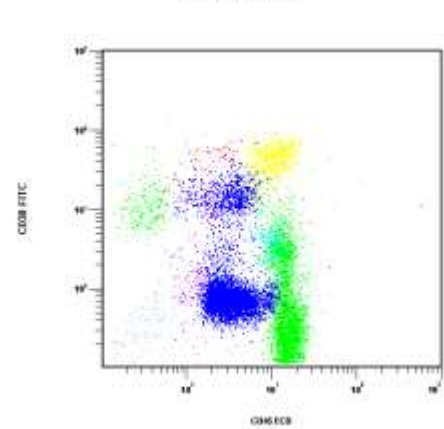
[A AND B AND PCa] FL3 LogFL3 Log



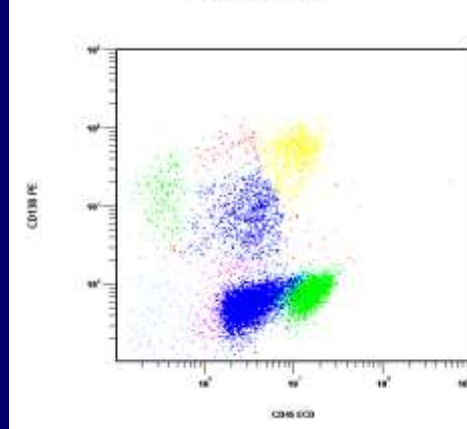
[A AND B AND PCa] FL3 LogFL3 Log



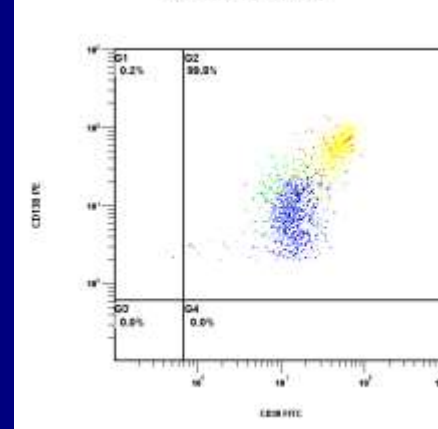
[A AND B] FL3 LogFL3 Log



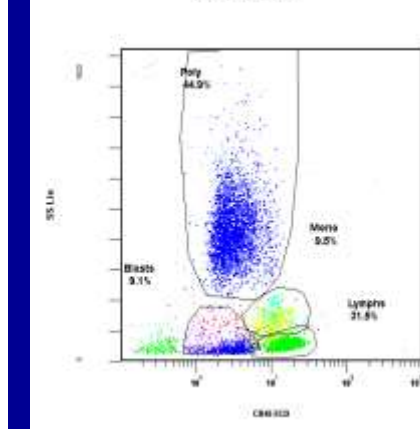
[A AND B] FL3 LogFL3 Log



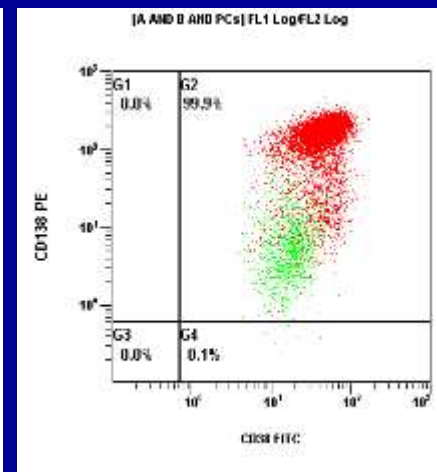
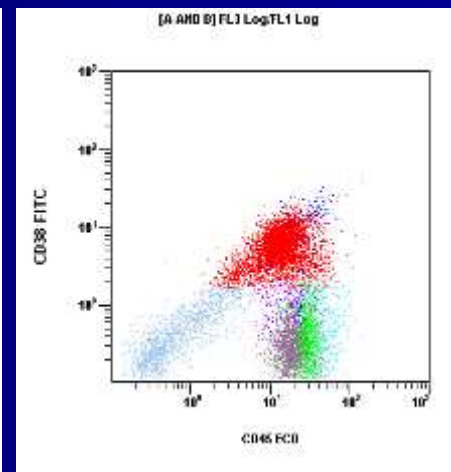
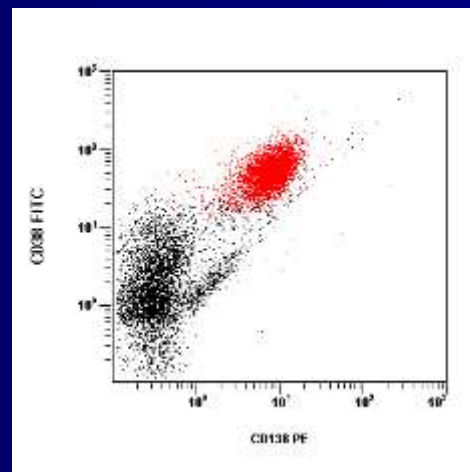
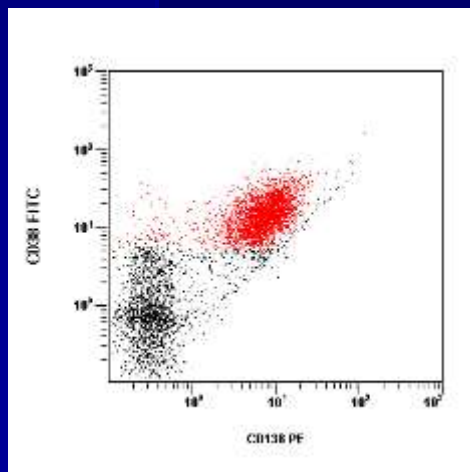
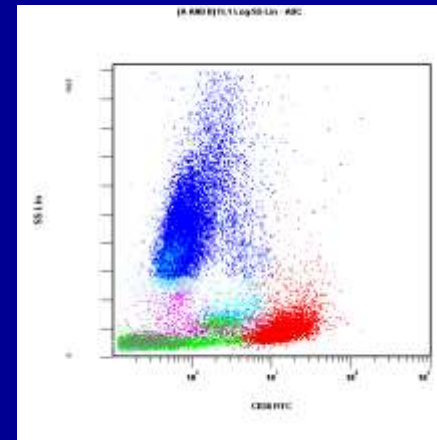
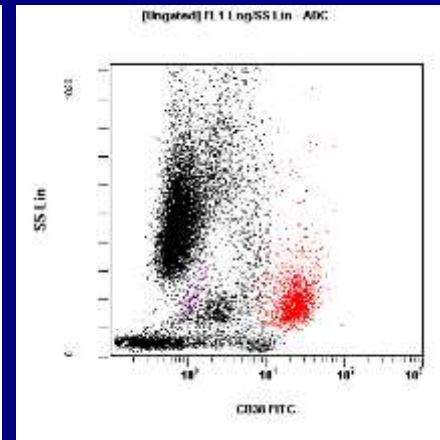
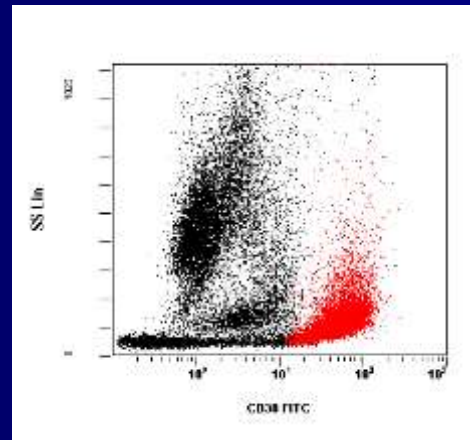
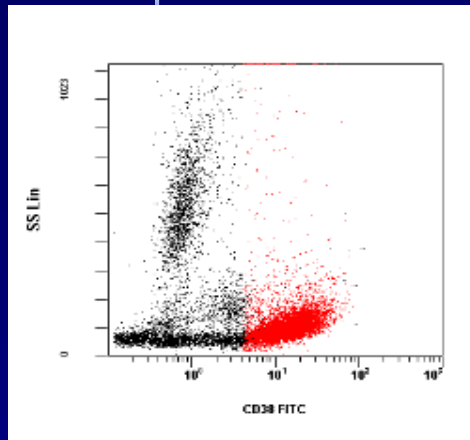
[A AND B AND PCa] FL3 LogFL3 Log



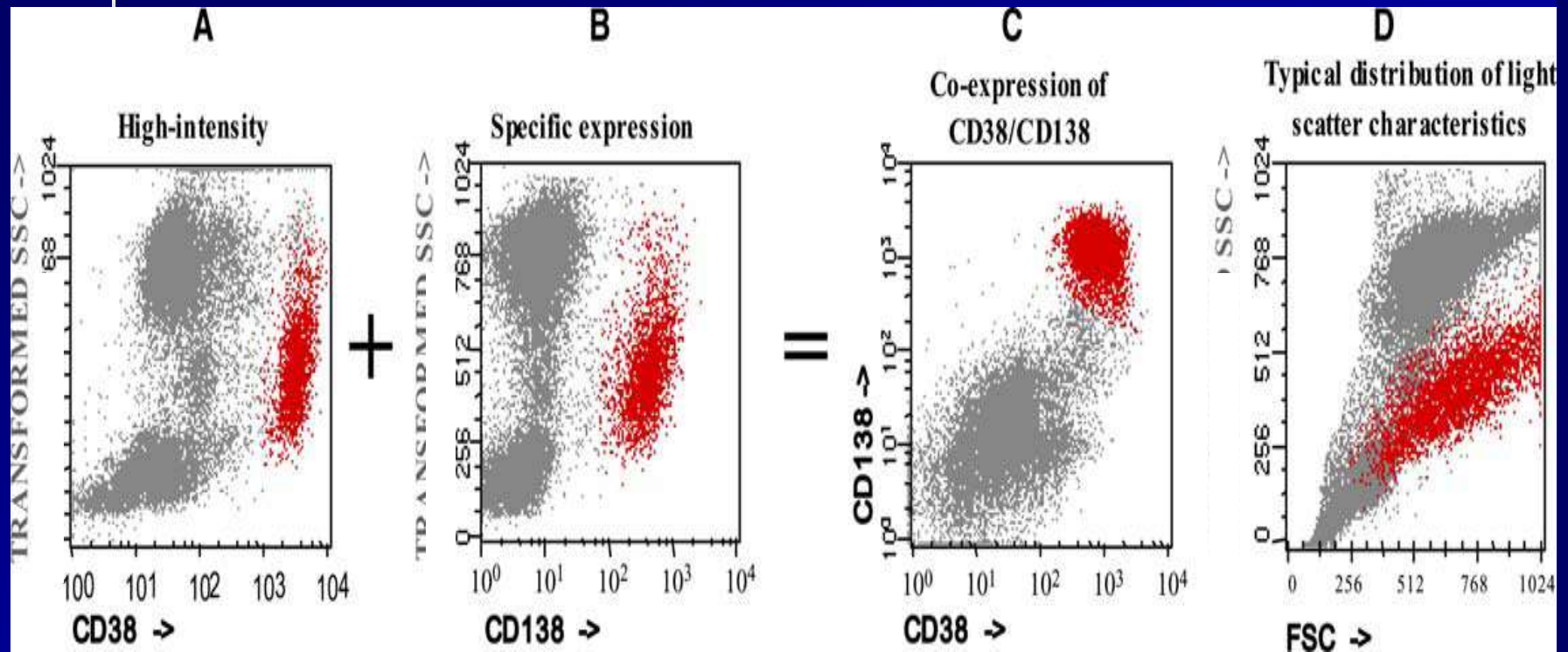
[A AND B] FL3 LogFL3 Log



CD38 & CD138 έκφραση



Στρατηγική επιλογής ΠΚ (Gaiting)



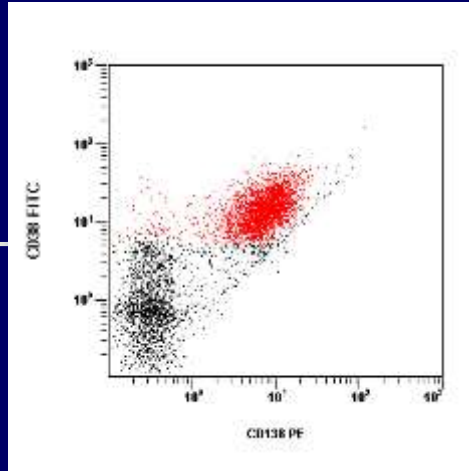
San Miguel JF et al Eur. J. Cancer 2006

Σύγκριση στρατηγικών οριοθέτησης για την αναγνώριση των ΠΚ σε 107 δείγματα ΠΜ

Gating Strategy	# (%) of Positive Results
CD38	90 (84.1)
CD138	82 (76.6)
CD38 and CD45	97 (90.7)
CD138 and CD45	85 (79.4)
CD38 and CD138	105 (98.1)
CD38, CD138, and CD45	107 (100.0)

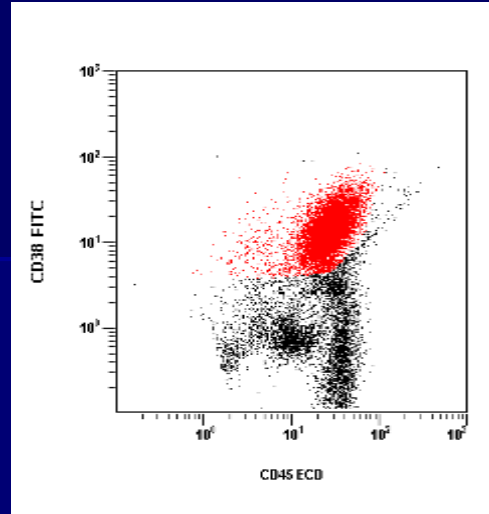
ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΚ ΜΕ 3 mAbs

CD38



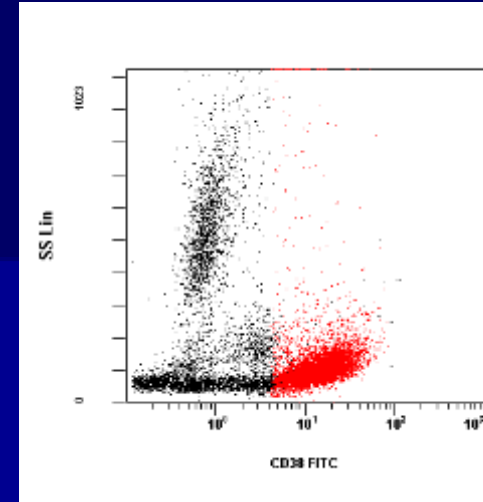
CD138

CD38



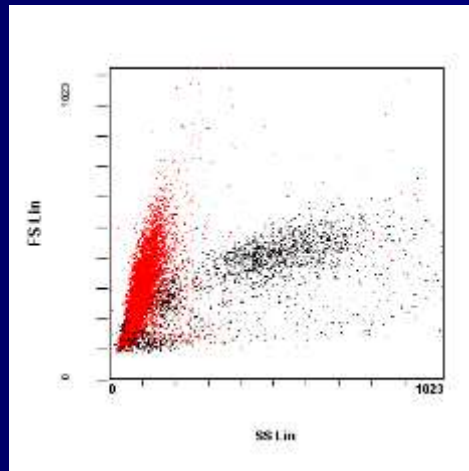
CD45

SSC



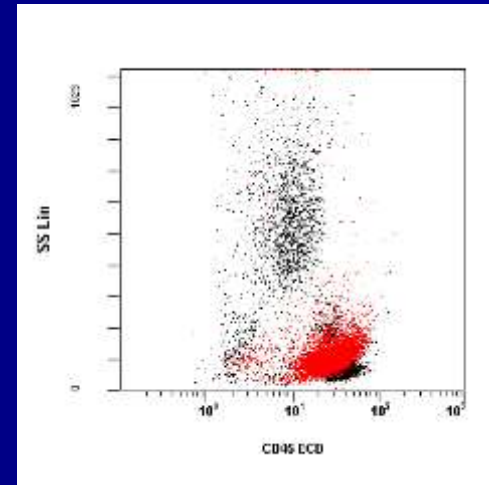
CD38

Fsc



SSC

SSC



CD45

Προβληματισμός #5

Τα αΠΚ συχνά υποεκτιμούνται ποσοτικά με την ανάλυση κυτταρομετρίας

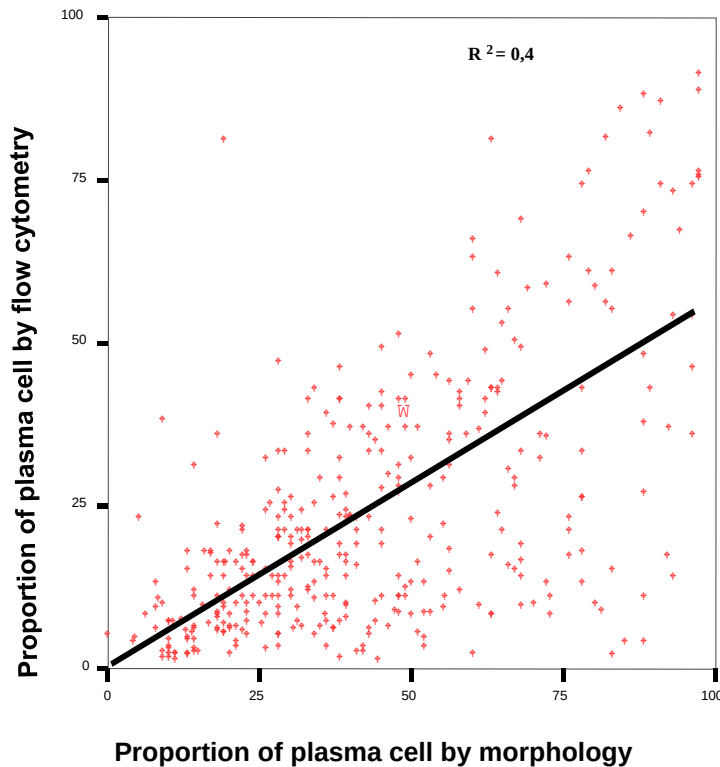
- 30%-60% υποεκτίμηση ποσοστού ΠΚ με ΚΡ σε σύγκριση με μορφολογία

Smock et al, Arch Pathol Lab Med 2007,
Nadav et al, Br J Haem 2006,
Paiva et al Haematol 2009

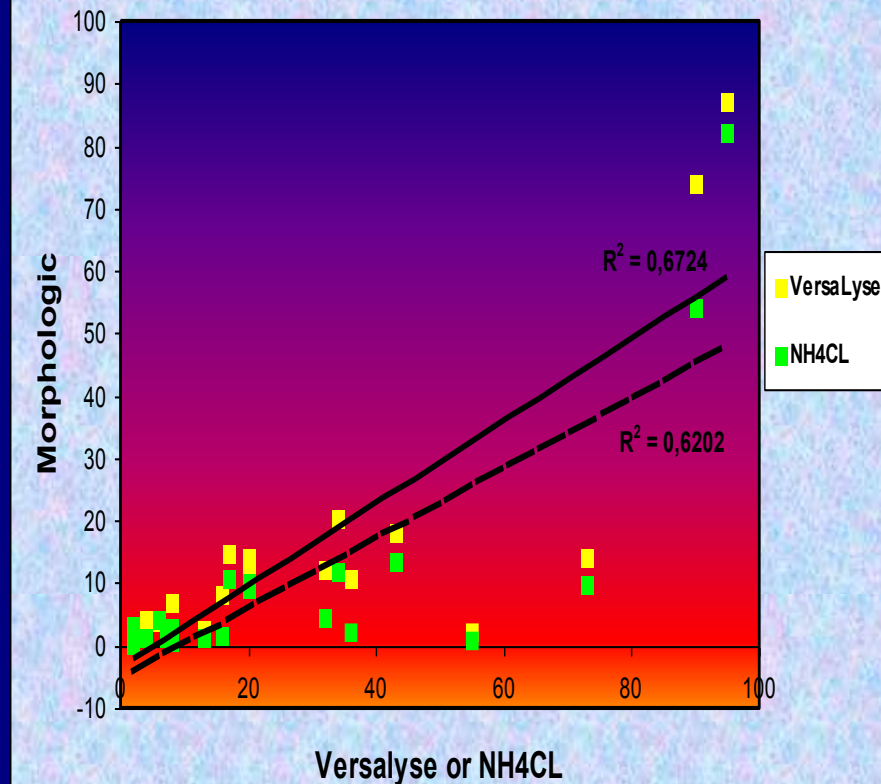
- Αιτιολογία;

1. Αιμαραίωση
2. Διαφορετική κατανομή (διαμερισματοποίηση) των ΠΚ στα κοκκία του μυελού
3. Απώλεια κατά την επεξεργασία

Συσχέτιση μορφολογικής ανάλυσης και ανοσοφαινοτύπου



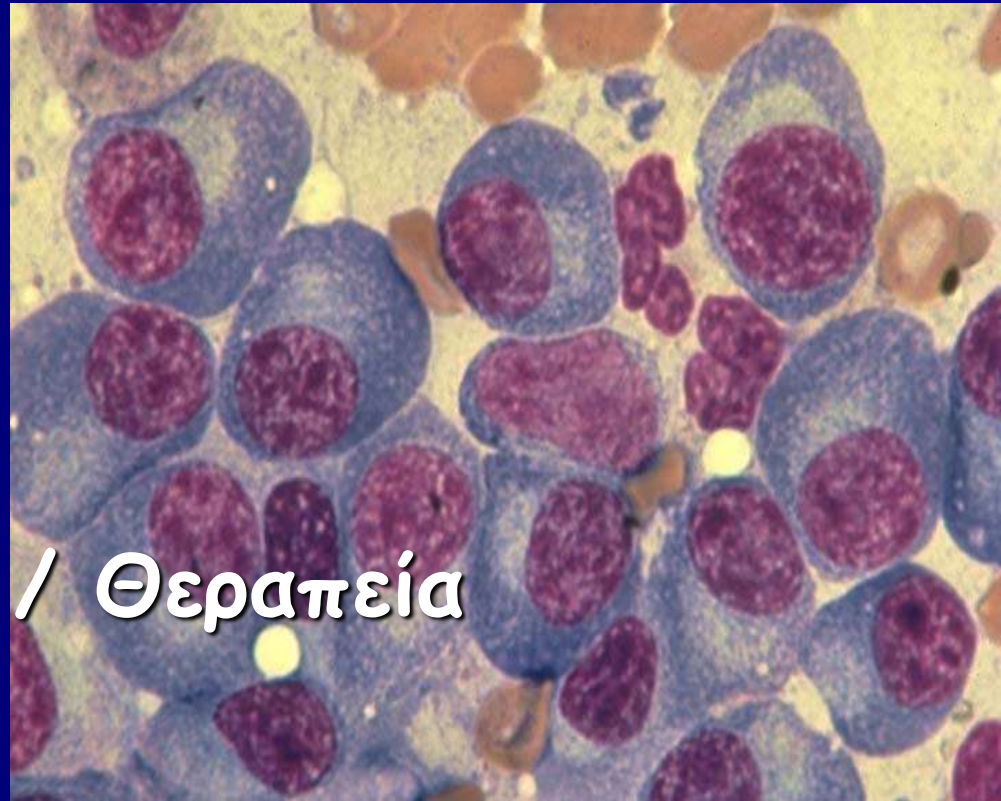
Υποεκτίμηση 60%
Paiva et al. Haematologica 2009



Υποεκτίμηση 50%
Yiannaki et al ESCCA Abst 2006

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

- Διάγνωση
- Πρόγνωση
- Παρακολούθηση / Θεραπεία

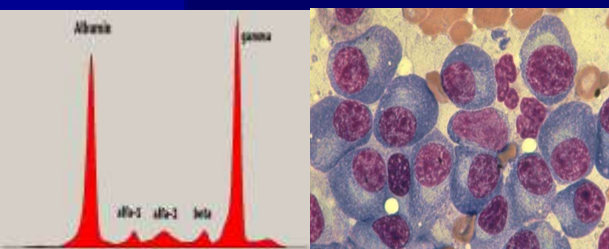


Διάγνωση και αξιολόγηση ΠΜ

ΟΡΙΣΜΟΣ



- Ανίχνευση-μέτρηση M- ανοσοσφαιρίνης (ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες)
- ποσοστό π/κ μυελού >10%



ΕΝΑΡΞΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ



- Αναγνώριση παρουσίας βλάβης τελικών οργάνων

- C** υπερασβεστιαμία
- R** νεφρική ανεπάρκεια
- A** αναιμία
- B** οστική προσβολή

ΠΡΟΒΛΕΨΗ- ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ



- Προγνωστικοί δείκτες



Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΤΜ

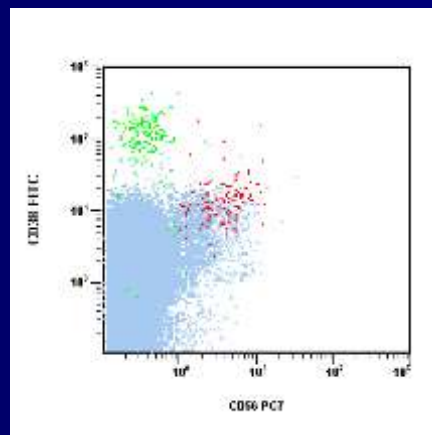
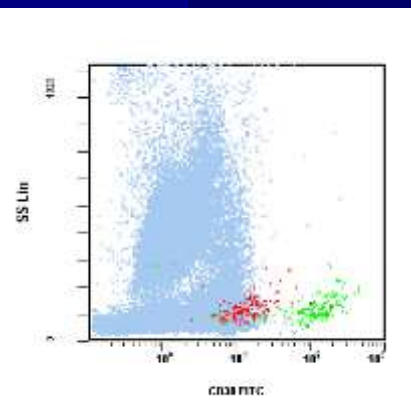
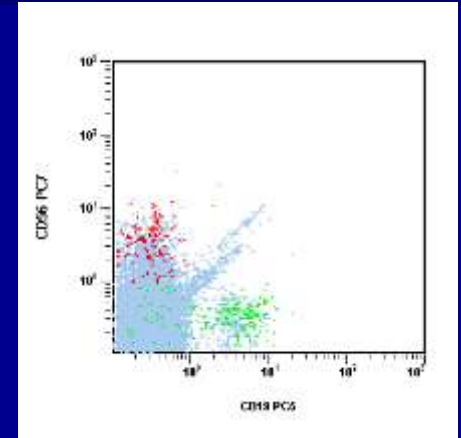
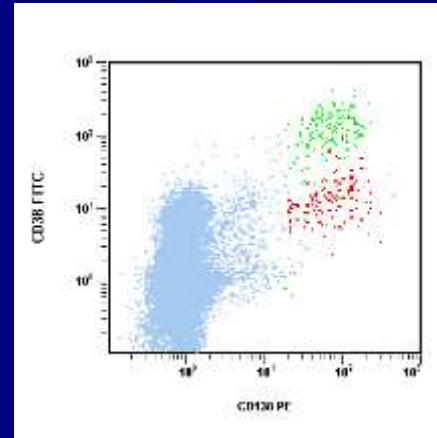
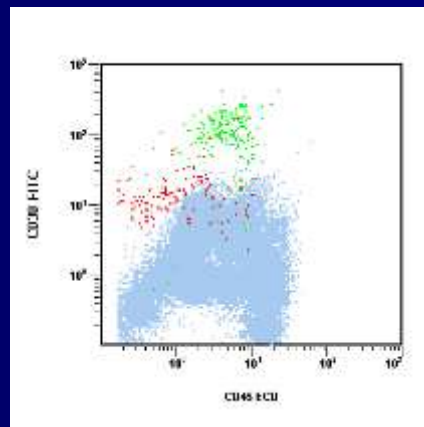
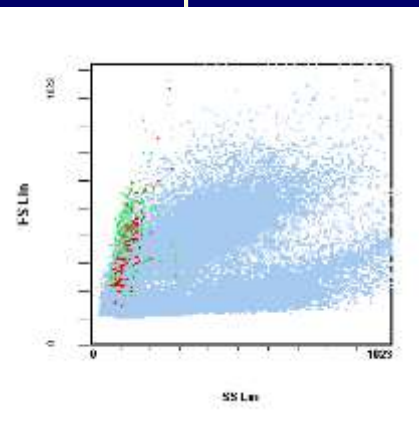
■ Διάγνωση

- Διαφοροδιάγνωση μεταξύ MGUS και ΤΜ

■ Πρόγνωση

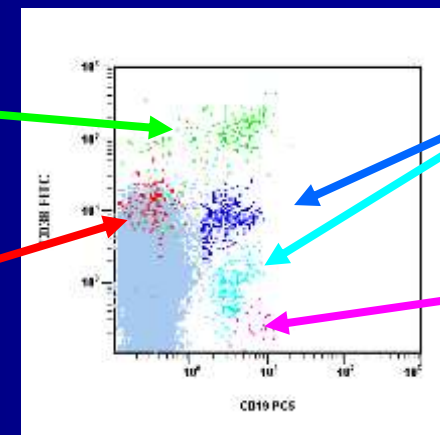
■ Παρακολούθηση / Θεραπεία

MGUS (σύγχρονη παρουσία φυσιολογικών και μυελωματικών ΠΚ)



Φυσιολ ΠΚ

Μυελ ΠΚ



Αιματογόνια

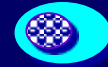
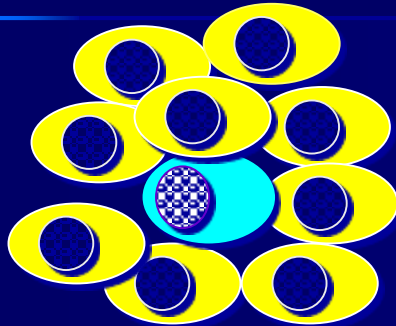
Β κύτταρα

Διαφοροδιάγνωση



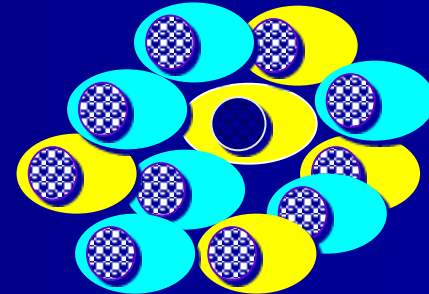
Clonal

MM



Poly-Clonal

MGUS



versus

Only 20% of MM patients showed **poly-PC**
and constantly **<5%** (median: 0.25%)¹

>5% poly-PC: 98% MGUS

Το πιο ισχυρό κριτήριο για διαφοροδιάγνωση (ακόμη και σε στάδιο I MM)

1. Ocqueteau M, Am J Pathol 1998, 152: 1655

Κίνδυνος για MGUS μετάπτωση²

Περιπτώσεις με κυρίως (>95%) CD19-^{ve} PC.... Υψηλό κίνδυνο (26% μετάπτωση σε 31 μήνες)

2. Rawstron A, Blood 2003, 102, 36 a (Abstr.116)

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

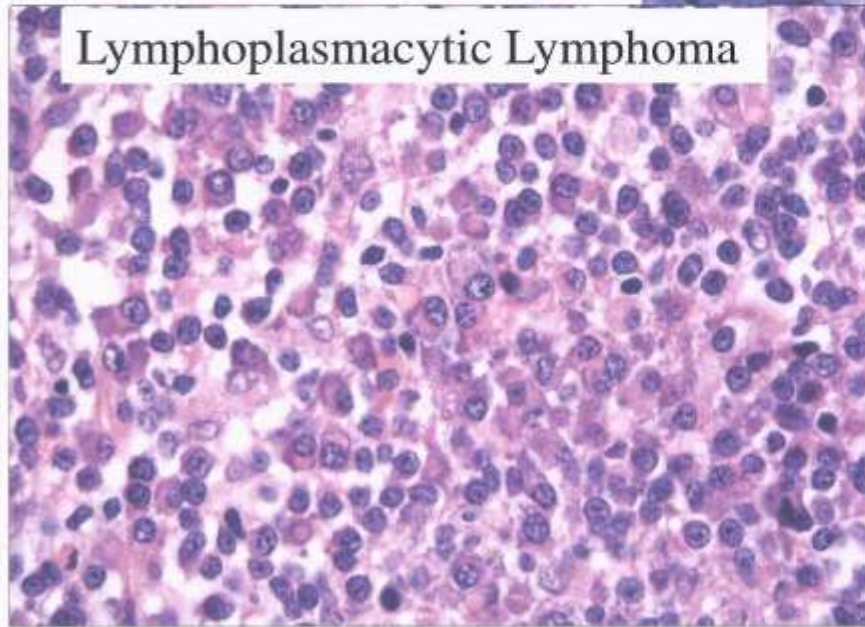
Διάγνωση

- Διαφοροδιάγνωση μεταξύ MGUS και ΠΜ
- Διαχωρισμός ΜΤΚ από αντιδραστικά φυσιολογικά ΤΚ και Β κύτταρα NHL λεμφοπλασματοκυτταρικού λεμφώματος.

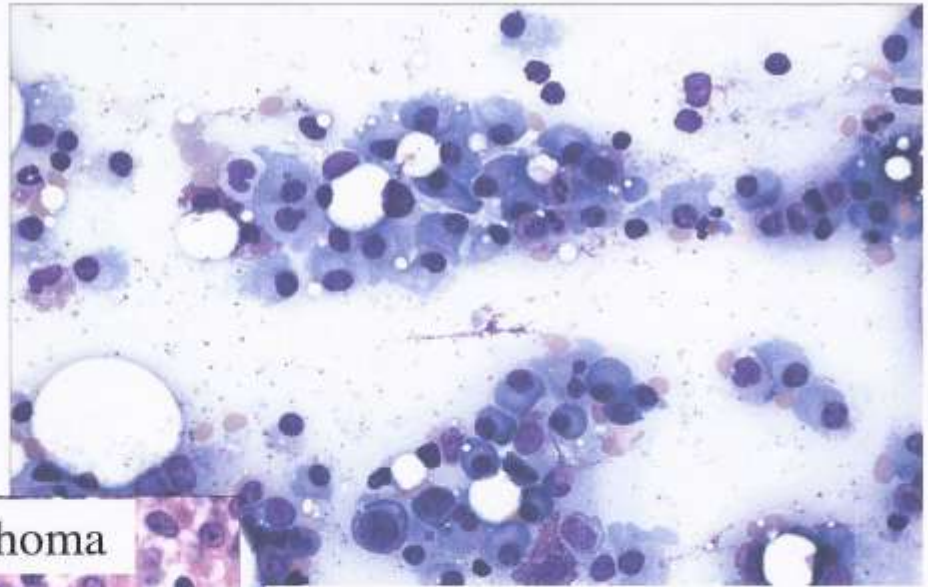
Πρόγνωση

Παρακολούθηση / Θεραπεία

Lymphoplasmacytic Lymphoma



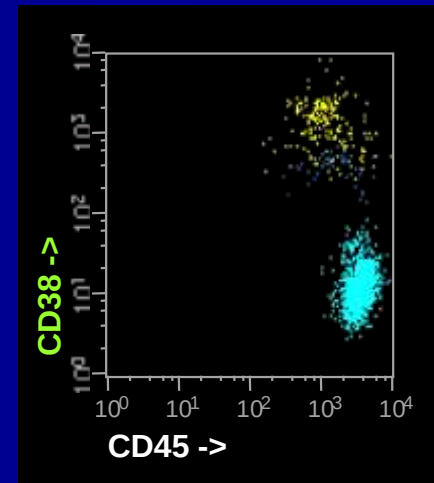
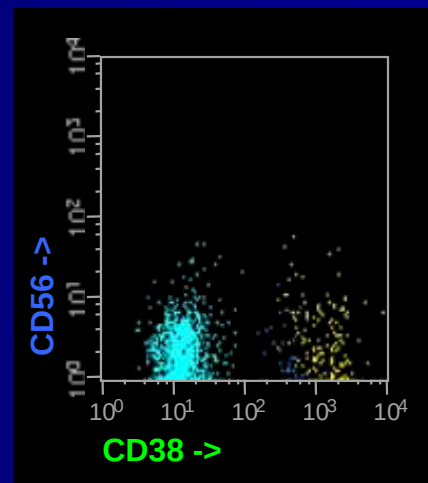
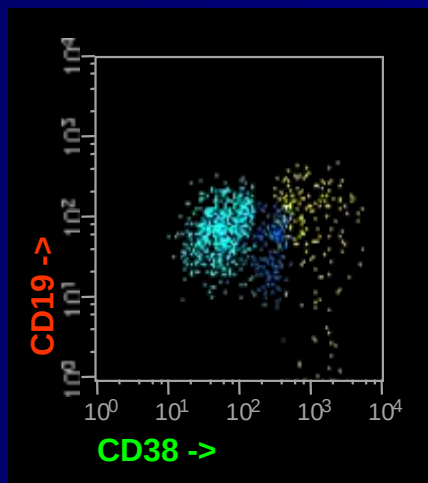
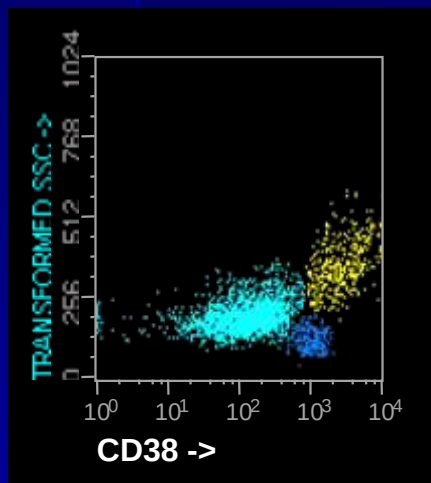
Reactive Plasmacytosis (HIV)



Ανοσοφαινότυπος ΤΚ σε WM (15 ασθενείς)

Αριθμός: Φυσιολογικός 0.3% σε WM vs. 0.36% μάρτυρες
εκτός δύο ασθ. (14%) ... 1% & 2.8% (>0.58% ανώτερο όριο)

Φαινότυπος Φυσιολογικός ? $CD38^{++}CD19^{-/+}CD56^{-}CD45^{++}$
:



■ B-WM

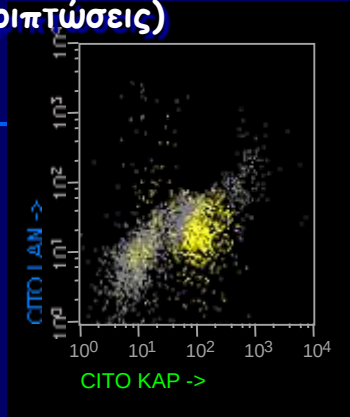
■ B-αιματογόνια ■ ΤΚ

....όμως

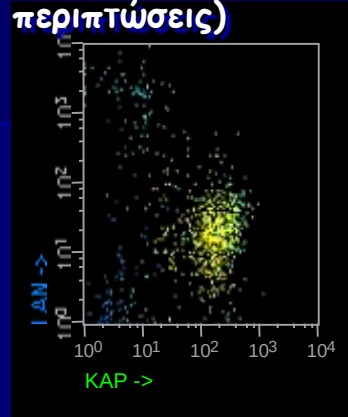


Ανοσοφαινότυπος ΠΚ σε WM

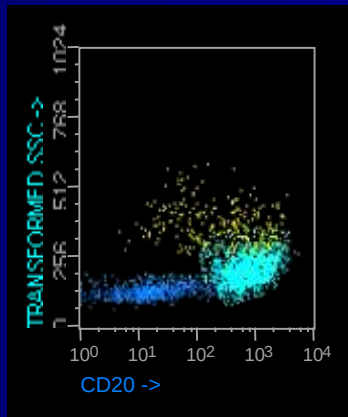
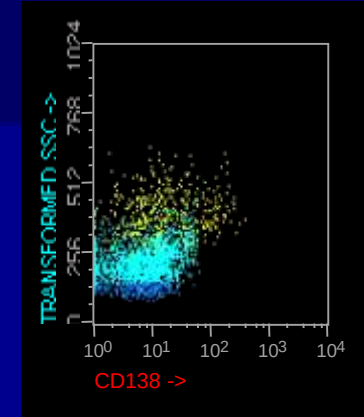
**cyIg⁺ (75% WM
περιπτώσεις)**



**sIg⁺ (50% WM
περιπτώσεις)**



CD138^{-/+}



**CD20⁺⁺ σε 14/15 ασθεν
(93%)**

■ B-WM ■ B-αιματογόνια ■ ΠΚ

ΠΚ (ενδιάμεσα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά)

Διάκριση ΤΚ ΤΜ από νεοπλασματικά ΤΚ NHL με πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση

- Ο ανοσοφαινότυπος των ΤΚ του ΤΜ είναι διαφορετικός από αυτό των ΤΚ της μακροσφαιριναιμίας Waldenström (MW) CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD22^{-/+}, CD38⁺⁺, CD138^{-/+} CD45⁺, CD56⁻, FMC7⁺ και sIg⁺.

(San Miguel JF et al, Semin Oncol. 2003)

- ΤΚ NHL vs MM εκφράζουν συχνότερα CD19 (95%+ vs 5%), CD45 (91% vs 41%) & sur Igs (76% vs 44%), και σπανιότερα CD56 (33% vs 71%)

(Seegmiller et al, AJCP 2007)

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

Διάγνωση

- Διαφοροδιάγνωση μεταξύ MGUS και ΠΜ
- Διαχωρισμός ΜΤΚ από αντιδραστικά φυσιολογικά ΤΚ και Β κύτταρα NHL λεμφοπλασματοκυτταρικού λεμφώματος.
- Ανοσοφαινοτυπικό αποτύπωμα για MRD ανάλυση

Πρόγνωση

Παρακολούθηση / Θεραπεία

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

- Διάγνωση

- Πρόγνωση

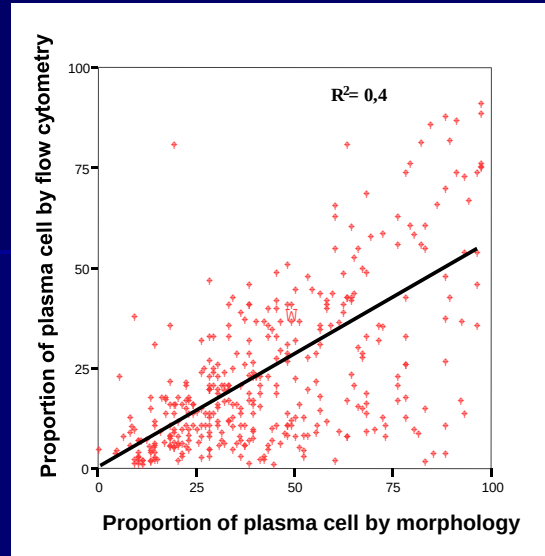
 - Καταμέτρηση μυελωματικών ΤΚ

- Παρακολούθηση

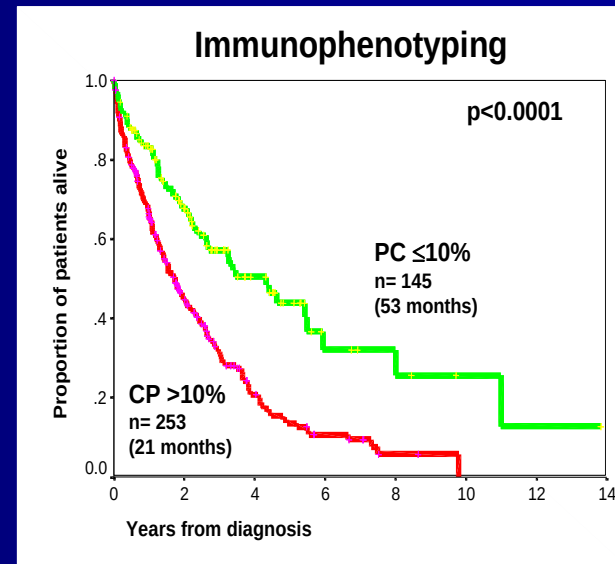
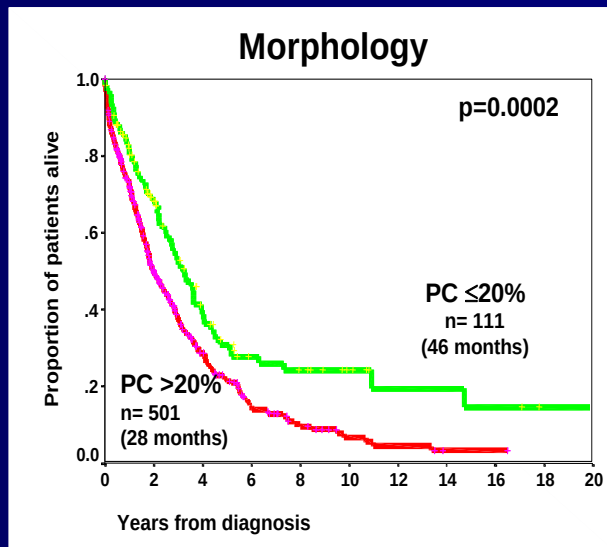
Συσχέτιση μορφολογικής ανάλυσης και ανοσοφαινοτύπου

- Οι Orfao και συν σε μελέτη ελέγχου της προγνωστικής σημασίας του αριθμού ΜΠΚ με ΚΡ απέδειξαν ότι: με όριο τα 10% ΜΠΚ, ασθενείς ΠΜ που διαγνώστηκαν με $\text{ΜΠΚ} \geq 10\%$ με ΚΡ είχαν μειωμένα ποσοστά επιβίωσης σε διάστημα παρακολούθησης 14 ετών συγκρινόμενοι με ασθενείς με $\text{ΜΠΚ} \leq 10\%$ με ΚΡ κατά την διάγνωση.

- Συσχέτιση μεταξύ μορφολογίας και ανοσοφαινοτύπου:



- Προγνωστική σημασία του αριθμού των ΜΡΚ:



Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

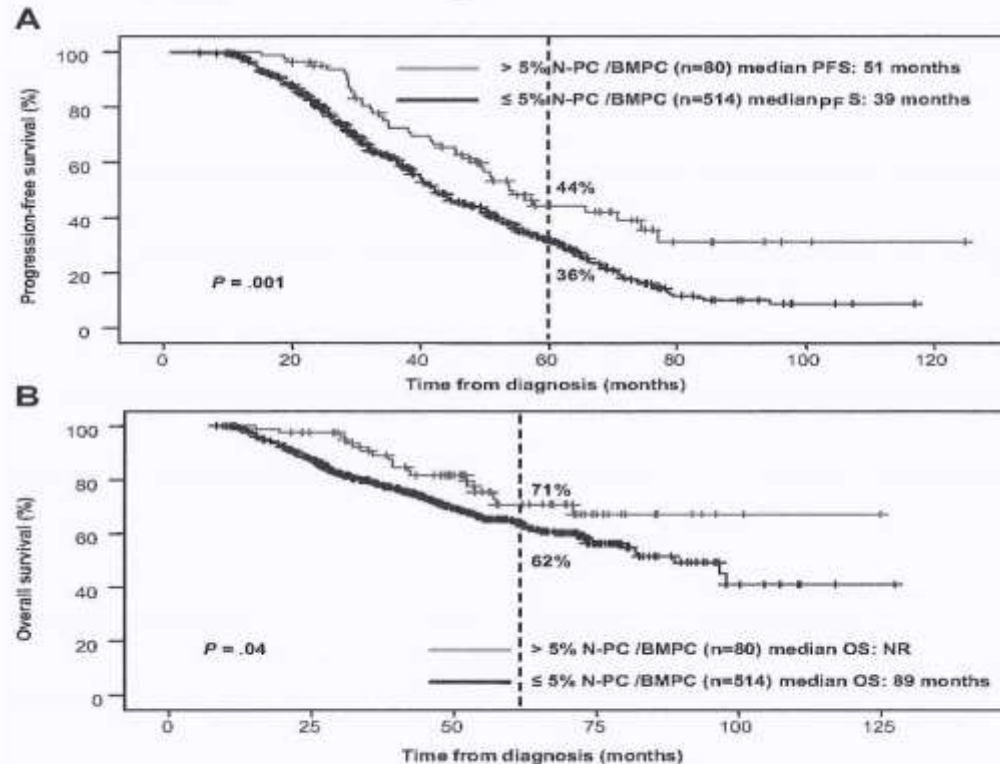
- Διάγνωση

- Πρόγνωση

- Καταμέτρηση μυελωματικών ΤΚ
- Καταμέτρηση φυσιολογικών ΤΚ

- Παρακολούθηση

Παρουσία φυσιολογικών κυττάρων κατά τη διάγνωση



Paiva et al, Blood 2009;4369-4372

- **>5%** φυσιολογικά ΤΚ συσχετίζονται με άλλους ευμενείς προγνωστικούς παράγοντες όπως:
- Λιγότερες υψηλού κινδύνου κυτταρογενετικές αλλαγές
- Υψηλό ποσοστό CD117 έκφρασης
- Τα περισσότερα ΠΜ έχουν πολύ λίγα ή καθόλου ΤΚ κατά την διάγνωση

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

■ Διάγνωση

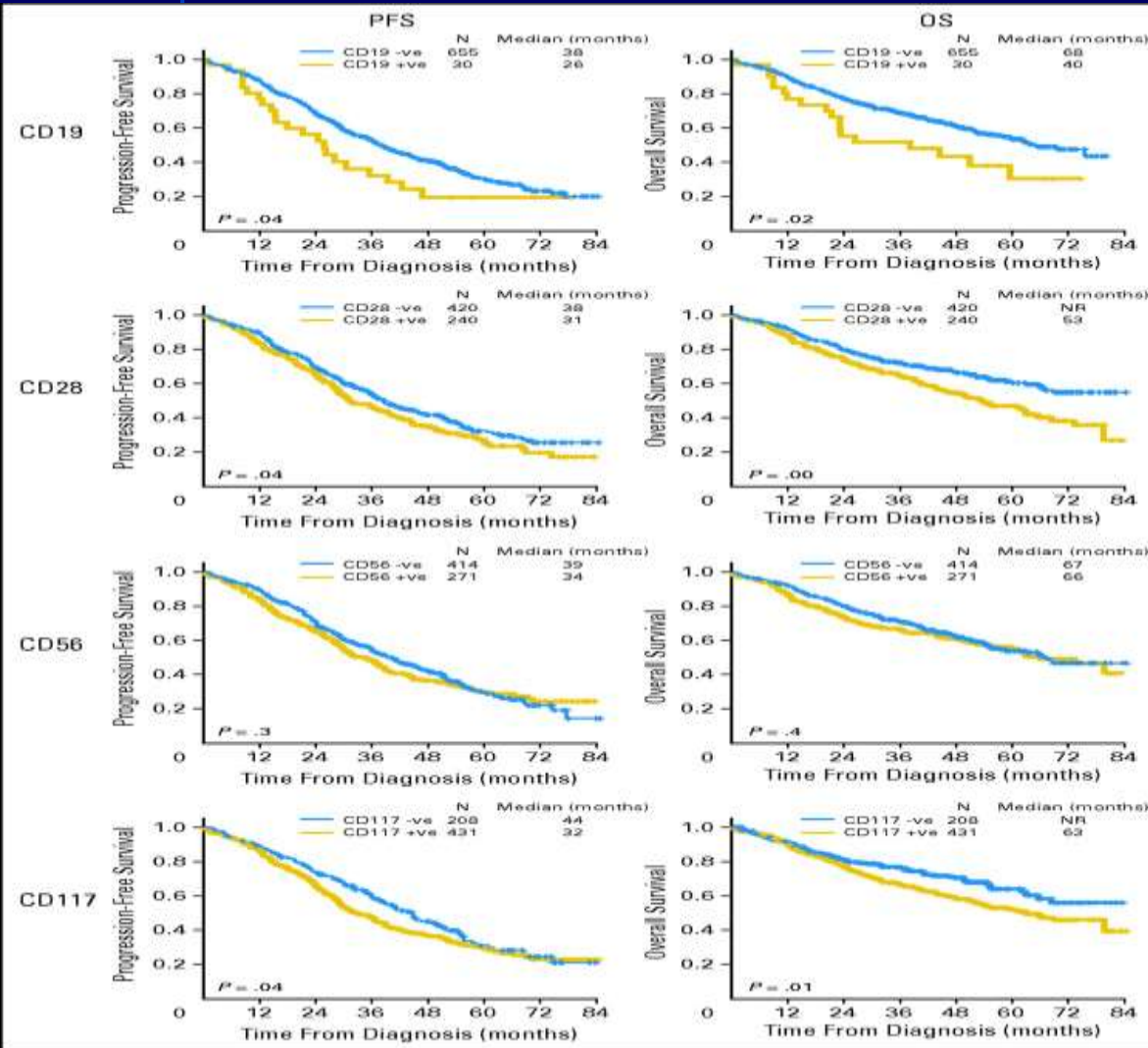
■ Πρόγνωση

- Καταμέτρηση μυελωματικών ΤΚ
- Καταμέτρηση φυσιολογικών ΤΚ
- Πρότυπα αντιγονικής έκφρασης

■ Παρακολούθηση

Αντιγόνο	Έκφραση
CD56	Εμποδίζει την διαφυγή των ΤΚ από ΜΟ. Μείωση/έλλειψη συσχετίζεται με εξωμυελική εξάπλωση.
CD117	Καλός προγνωστικός δείκτης, σπάνια εκφράζεται σε υποτροπή.
CD19	Στο 98% ΜΤΚ δεν εκφράζεται. Η έκφρασή του σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση
CD28	Αυξάνεται το ποσοστό των ΜΤΚ που το εκφράζουν καθώς η νόσος υποτροπιάζει
CD27	Καλός προγνωστικός δείκτης, χάνεται καθώς η νόσος υποτροπιάζει
CD45	Τα ΜΤΚ χαρακτηρίζονται από αρνητική έως έντονα θετική έκφραση (18-75%+), διφορούμενο προγνωστικά
CD200	80% περιπτώσεων ΤΜ το εκφράζουν έντονα, αντικρουόμενες απόψεις για την προγνωστική του αξία
CD20	Η έκφρασή του σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση
CD81	45% θετικός, ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας
CD33	Η παρουσία του συσχετίζεται με χαμηλή επιβίωση πιθανά λόγω φαρμακευτικής ανοχής

Prognostic Value of Immunophenotyping in Multiple Myeloma: A Study by the PETHEMA/GEM Cooperative Study Groups on Patients Uniformly Treated With High-Dose Therapy



CD19: 5% MM +
Δυσμενής, αλλά όχι σημαντικός σε πολυπαραμετρική ανάλυση

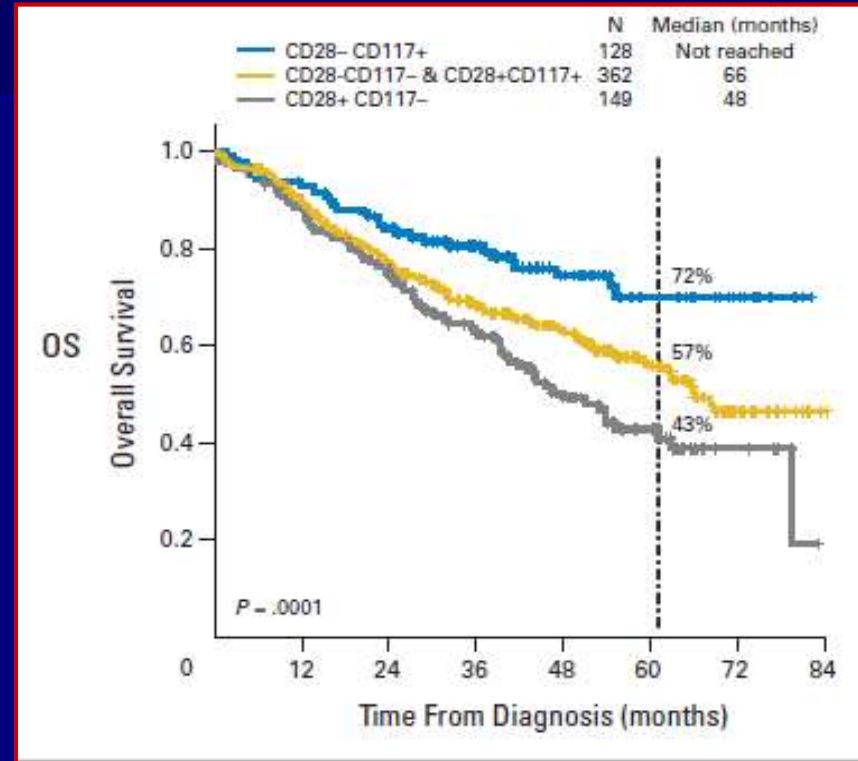
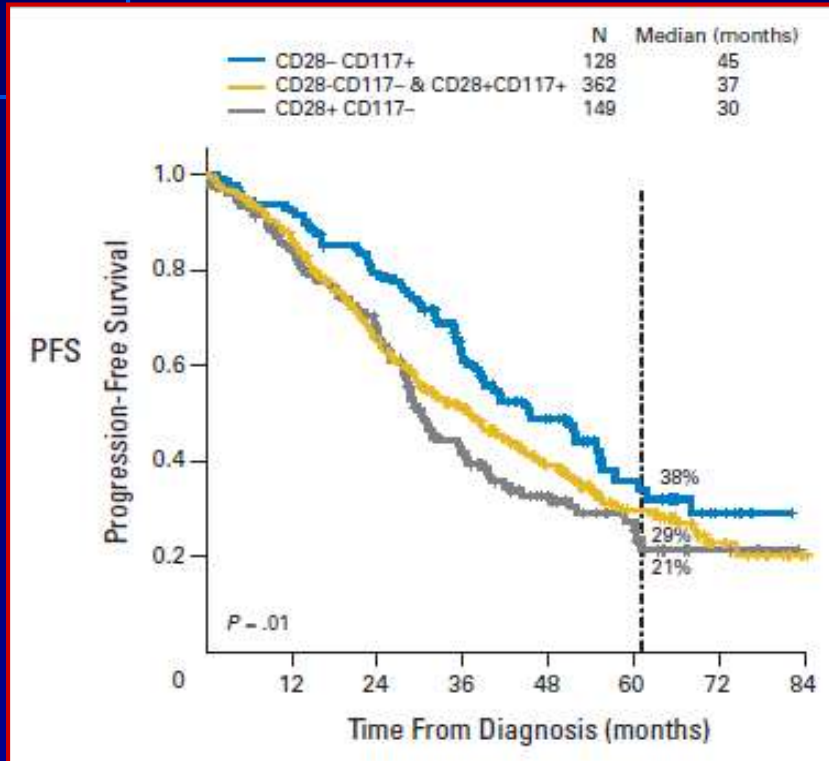
CD28: 36% MM+
Δυσμενής, αλλά όχι σημαντικός σε πολυπαραμετρική ανάλυση

CD56: 3/4 MM+
Καλής πρόγνωσης? Μείωση/έλλειψη συσχετίζεται με εξωμυελική εξάπλωση, πλασματοκυτταρική λευχαιμία, υψηλό φορτίο ΜΟ, εξωμυελικούς όγκους, τάση για λιγότερες οστεολύσεις.

CD117: 1/3 MM+
Καλής πρόγνωσης, αλλά όχι σημαντικός σε πολυπαραμετρική ανάλυση

Mateo G et al. JCO 2008;26:2737-2744

Prognostic impact of combined CD28 & CD117 markers on survival of patients with multiple myeloma (n = 685).



Σημαντικοί σε πολυπαραμετρική ανάλυση...

...αλλά όχι όταν συσχετιστούν με κυτταρογενετική

CD45 εκφράζεται στο 18-75% των ΤΜ (!)

(Τεχνικά θέματα)

Διφορούμενο προγνωστικά

- Ασθενείς ΤΜ CD45 - έχουν μικρότερη επιβίωση από τους CD45+. CD45 - ΜΡΚ έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να κυκλοφορούν, να πολλαπλασιάζονται και είναι λιγότερο ευαίσθητα στην απόπτωση

(Moreau et al, Haematologica 2004)

- Πολλαπλασιαζόμενα ΜΤΚ χαρακτηρίζονται από CD45bright, CD11a + Bcl-2low φαινότυπο.

(Robillard et al. Blood. 2005)

CD 33 εκφράζεται σε 17-22% των ΤΜ

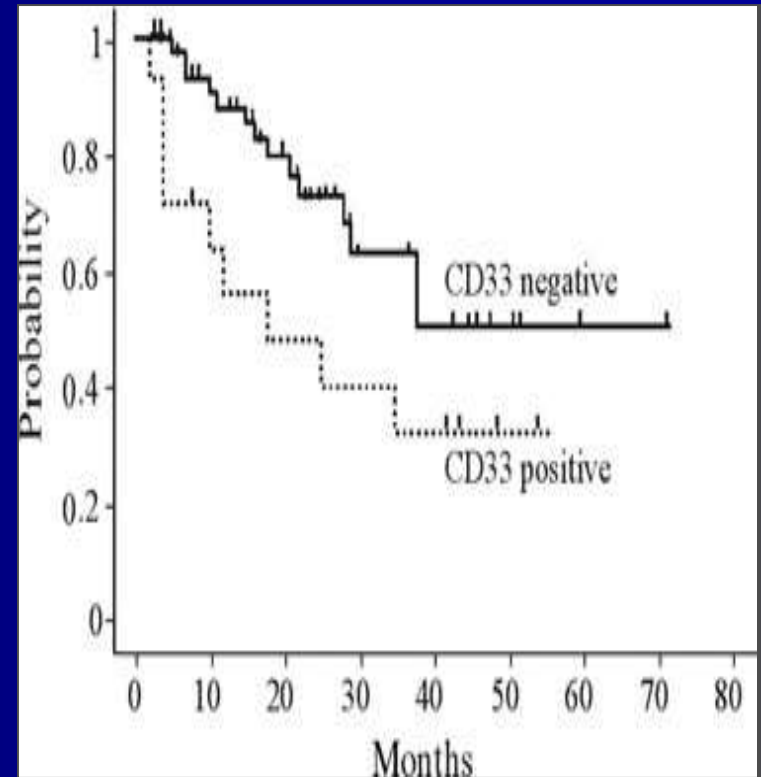
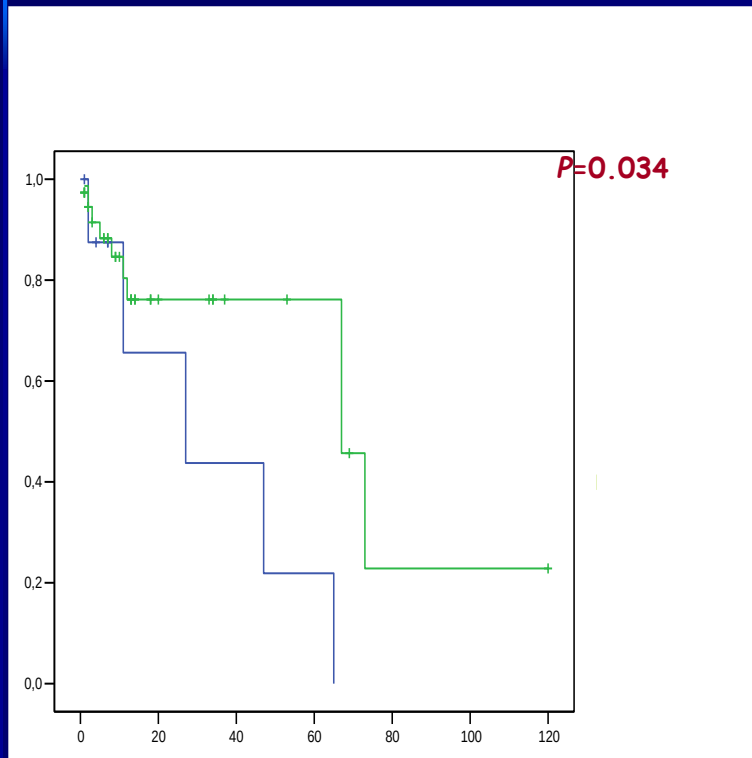
Ολική επιβίωση ασθενών (104 ασθενείς)

Διάμεση ολική επιβίωση:

- CD33+ : 27 μήνες 8/9 (88.9%)
- CD33- : 67 μήνες 1/42 (2.4%)

Αμφιλεγόμενη προγνωστική αξία
Πιθανή συσχέτιση με εξωμυελική
υποτροπή

OS πιθανότητα%



διάμεσο χρονικό διάστημα παρακολούθησης 14 μήνες (1-73)

➤ Sahara et al, Eur J Haematol, 2006

➤ Mateos et al, JCO, 2008

➤ Shin et al, JHC, 2001

Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders.

Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Sevnaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE; European Myeloma Network.

Table 2. List of most useful antigens for the detection of aberrant plasma cells in multiple myeloma.^{5-10;20-44}

<i>Antigen</i>	<i>Normal expression profile (percentage expression on normal plasma cells)</i>	<i>Abnormal expression profile</i>	<i>Percentage of myeloma cases with abnormal expression</i>	<i>Requirement for diagnosis and monitoring</i>
CD19	Positive (>70%)	Negative	95%	Essential
CD56	Negative (<15%)	Strongly positive	75%	Essential
CD117	Negative (0%)	Positive	30%	Recommended
CD20	Negative (0%)	Positive	30%	Recommended
CD28	Negative/weak (<15%)	Strongly positive	15-45%	Recommended
CD27	Strongly positive (100%)	Weak or negative	40-50%	Recommended
CD81	Positive (100%)	Weak or negative	Not published	Suggested
CD200	Weakly positive	Strongly positive	Not published	Suggested

45% (Paiva et al
Leukemia 2012)

80% (Alapat et al
AJClin Path 2012)

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΤΜ

■ Διάγνωση

■ Πρόγνωση

-Καταμέτρηση μυελωματικών ΤΚ

-Πρότυπα αντιγονικής έκφρασης

-Κίνδυνος εξέλιξης MGUS και SMM

■ Παρακολούθηση

Κίνδυνος εξέλιξης MGUS και (smoldering) ασυμπτωματικού ΠΜ (SMM) σε ΠΜ.

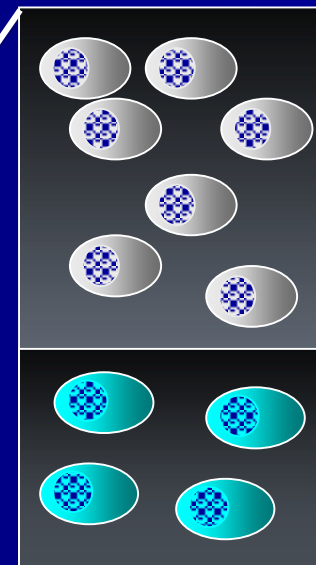
- Τα MGUS και SMM είναι δύο ασυμπτωματικές μορφές πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών με δείκτη προόδου προς ΠΜ περίπου 1% (Kyle RA et al, 2006) και 10% (Weber DM. et al 1997) ανά χρόνο αντίστοιχα.
- Ο σαφής διαχωρισμός με ΚΡ των κλωνικών ΠΚ (ΚΠΚ) από τα φυσιολογικά ΠΚ (ΦΠΚ), βοηθά στην διαφοροδιάγνωση της MGUS από το ΠΜ.
- Επιπρόσθετα η ποσοστιαία αναλογία των ΚΠΚ προς το σύνολο των ΠΚ του ΜΟ (ΚΠΚ/ΠΚ) αναδείχθηκε ως πολύτιμη παράμετρος πρόβλεψης μετασχηματισμού αυτών των ΠΚ δυσκρασιών σε συμπτωματική νόσο.

ΠΚ ανάλυση ΜΟ με ΚΡ

1st step
Total cellularity



2nd step
PC compartment



% aPC/BMPC

% nPC/BMPC

Proportion of aPC referred to the
total-PC (aPC/BMPC)

% PC within
BM cellularity

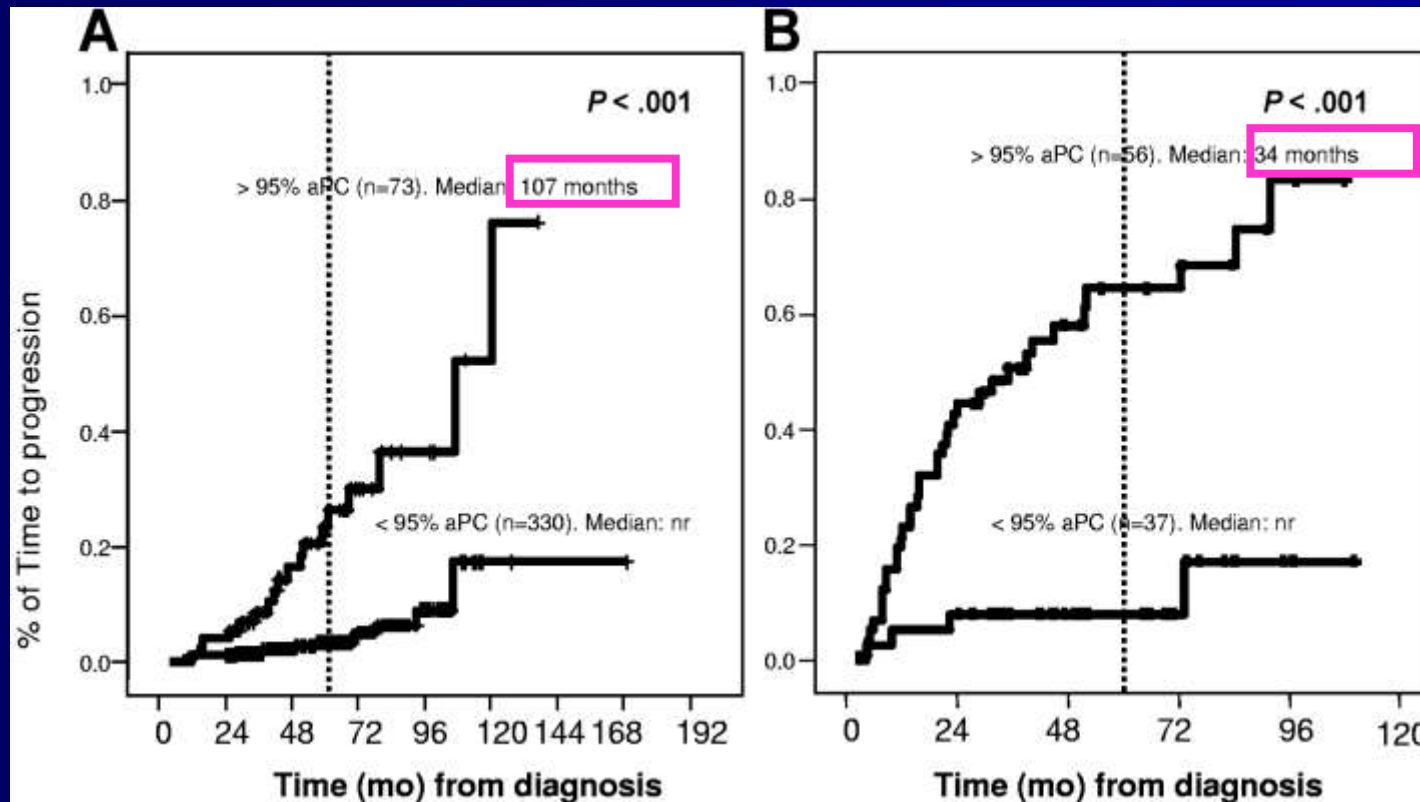
Flow Cytometry Results

MGUS:407 SMM:93

% Total PC in BM*	2.8 (0.9-22.0)
% of aPC / BMPC compartment	97 (35-100)
< 95% aPC / BMPC	36 (40%) (82%)
> 95% aPC / BMPC	53 (60%) (18%)

* Median (range)

Χρόνος εξέλιξης MGUS (A) & SMM (B) σε ΠΜ σύμφωνα με το ποσοστό των κλωνικών ΠΚ προς το σύνολο των ΠΚ (ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης)



Κίνδυνος εξέλιξης MGUS και (smoldering) ασυμπτωματικού ΤΜ (SMM). Συμπέρασμα

- Η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι η εφαρμογή πολυπαραμετρικής ανάλυσης με ΚΡ των ΤΚ του ΜΟ κατά τη διάγνωση ατόμων με MGUS και SMM αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο πρόβλεψης κινδύνου εξέλιξης σε ΤΜ, διότι επιτρέπει την αναγνώριση ασθενών υψηλού κινδύνου οι οποίοι μπορεί να ευνοηθούν από εφαρμογή προληπτικής θεραπείας.

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

- Διάγνωση

- Πρόγνωση

- Παρακολούθηση

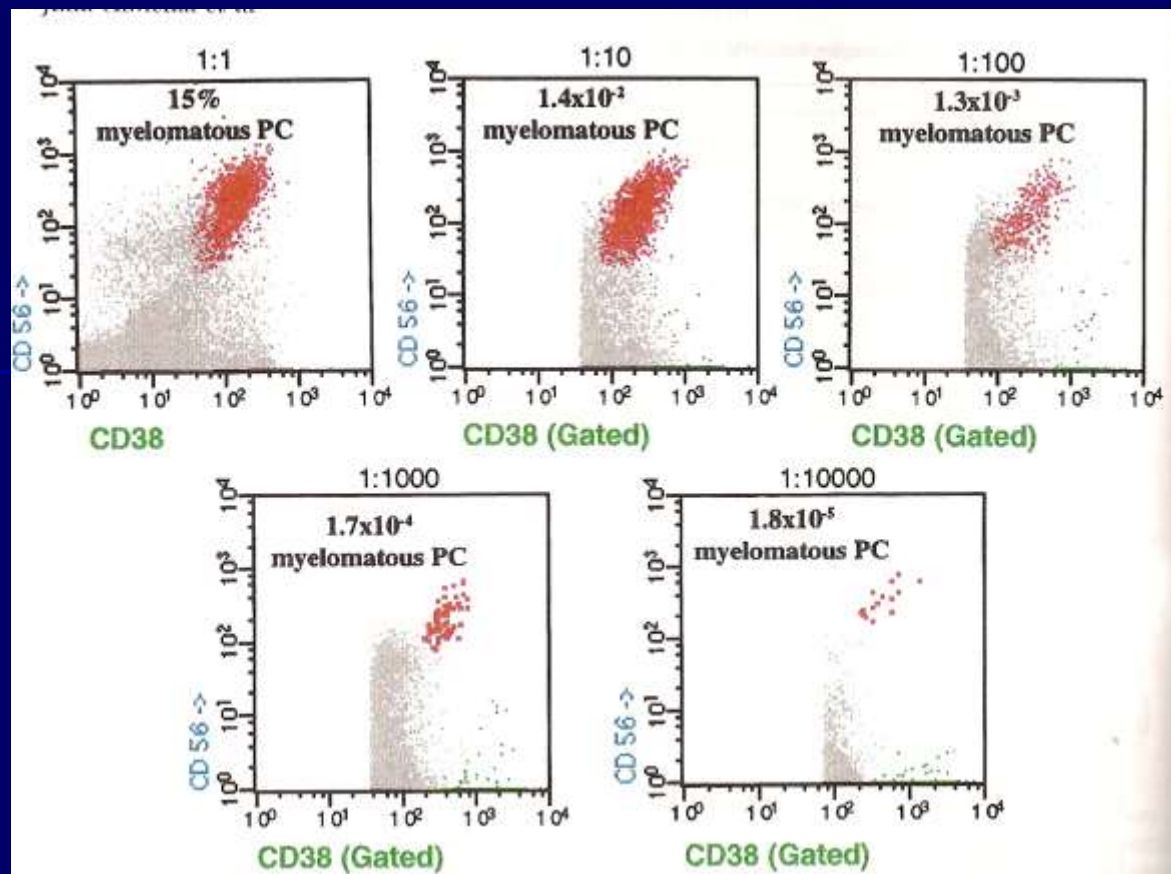
Ελάχιστη υπολειμματική νόσος MRD

Η ΚΡ **είναι** η μέθοδος
επιλογής για την
παρακολούθηση της
ελάχιστης υπολειμματικής
νόσου του ΠΜ μετά από
χημειοθεραπεία ή αυτόλογη
μεταμόσχευση

Owen R, Rawstron A. Br J Haematol 2005

Paiva B. Blood 2008

Rawstron A. JCO July 2013



Almeida J. et al 1999 Br J Haematol.

1/10,000 (10^{-4}) την 100^η ημέρα μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση (HSCT) παρουσιάζεται ως επαρκές κλινικά όριο

MRD τεχνικά θέματα:

- Ποια στρατηγική οριοθέτησης;
- Πόσα Abs;
- Πόσα κύτταρα;
- Πόσα χρώματα;
- Ανοσοφαινοτυπική αστάθεια αντιγόνων.

Οριοθέτηση με τρεις δείκτες και επιπλέον χρήση δύο επιπλέον δεικτών CD19, CD56 μπορεί να ανιχνεύσει το **90%** των περιπτώσεων MRD MM

Αντιγόνο	Ποσοστό διαφορετικότητας
CD19	95%
CD20	15-20%
CD27	40-50%
CD28	15-45%
CD52	15-45%
CD56	75%
CD117	33%
CD200	80%

Προσθήκη επιπλέον των πιο συχνά ανώμαλων δεικτών θα επιτρέψει την ανίχνευση σχεδόν το 100% των περιπτώσεων MRD

Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders.

Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Sevnaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE; European Myeloma Network.

Table 2. List of most useful antigens for the detection of aberrant plasma cells in multiple myeloma.^{5-10;20-44}

<i>Antigen</i>	<i>Normal expression profile (percentage expression on normal plasma cells)</i>	<i>Abnormal expression profile</i>	<i>Percentage of myeloma cases with abnormal expression</i>	<i>Requirement for diagnosis and monitoring</i>
CD19	Positive (>70%)	Negative	95%	Essential
CD56	Negative (<15%)	Strongly positive	75%	Essential
CD117	Negative (0%)	Positive	30%	Recommended
CD20	Negative (0%)	Positive	30%	Recommended
CD28	Negative/weak (<15%)	Strongly positive	15-45%	Recommended
CD27	Strongly positive (100%)	Weak or negative	40-50%	Recommended
CD81	Positive (100%)	Weak or negative	Not published	Suggested
CD200	Weakly positive	Strongly positive	Not published	Suggested

45% (Paiva et al
Leukemia 2012)

80% (Alapat et al
AJClin Path 2012)

Πόσα κύτταρα;

- Το European Myeloma Network συστήνει ως ελάχιστο όριο τα 100 νεοπλασματικά ΤΚ να ανιχνευθούν προκειμένου να αναδειχθεί ένα δείγμα ως θετικό για MRD
- Συντηρητικά 20 κύτταρα συστήνονται για MRD ανάλυση
- 100 κύτταρα δεν είναι απαραίτητο να ανιχνευθούν σε ένα σωληνάριο (αθροιστικά)

Rawstron et al, Haematologica 2008

Πόσα χρώματα;

- Το ελάχιστο 3 χρώματα

-Ευαισθησία 10^{-4} πραγματώνεται με χρήση περισσότερων του ενός σωληναρίων ανάλυσης.

(Rawstron et al, Blood 2002)

- Δεν διαπιστώθηκε ιδιαίτερη βελτίωση της ευαισθησίας με αύξηση των χρωμάτων έως 6

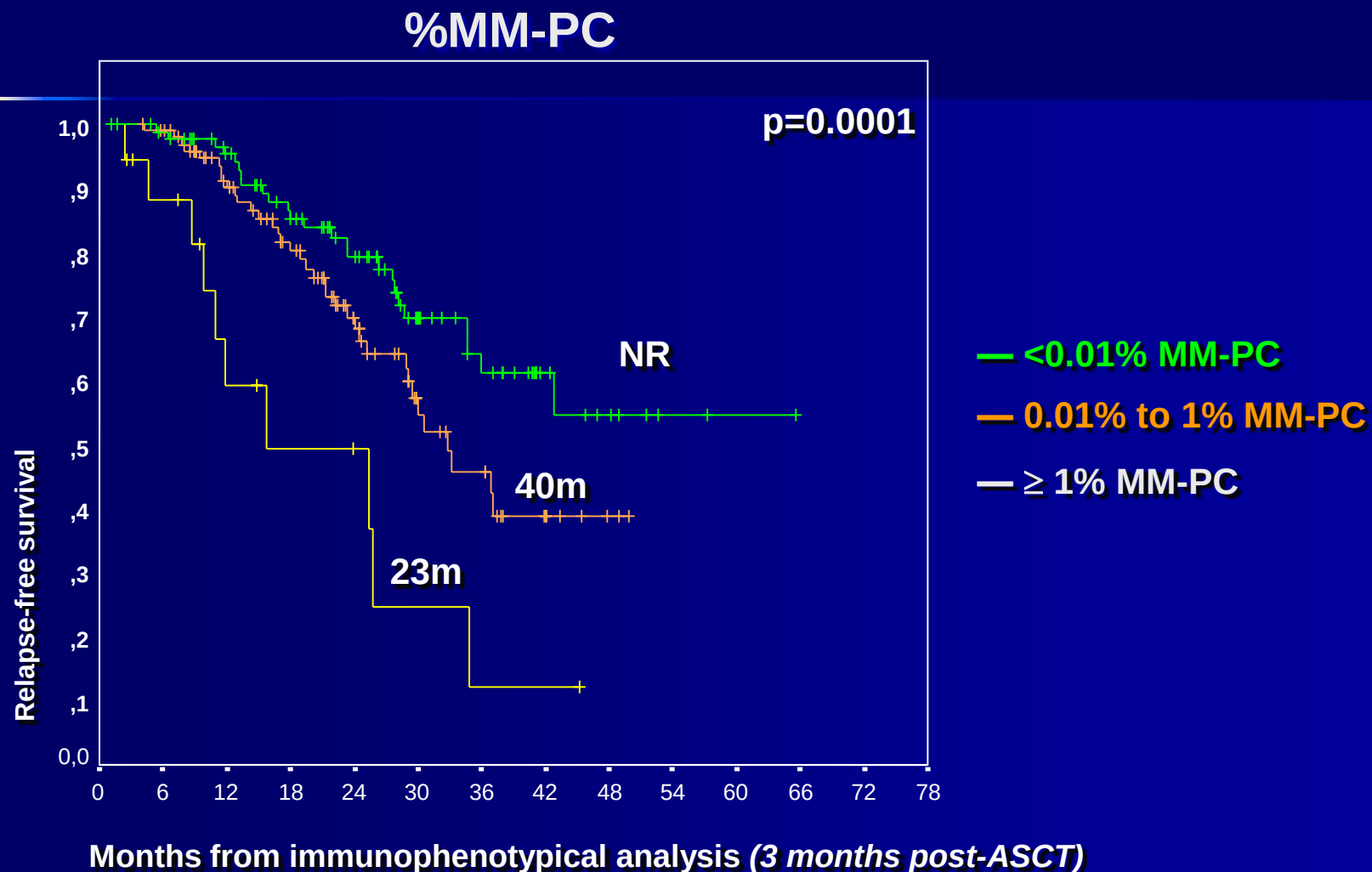
(De Tute et al, Leukemia 2007)

Ανοσοφαινοτυπική αστάθεια αντιγόνων στο χρόνο

Εμφάνιση, απώλεια, αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των πιο
συχνών αντιγόνων στο 1/3 των περιπτώσεων (48)

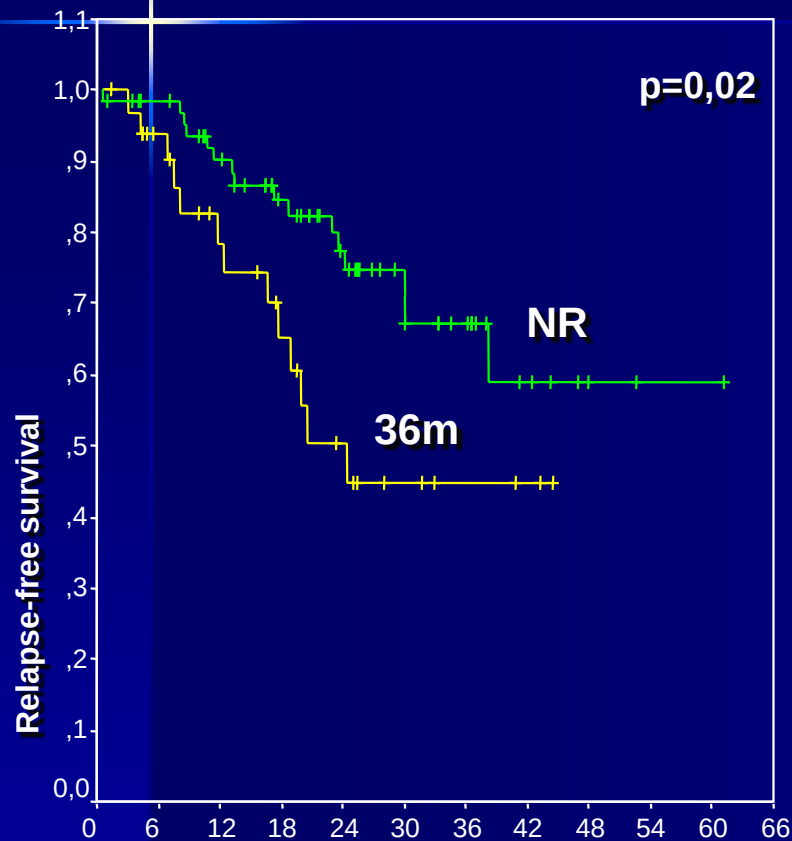
	CD19	CD20	CD45	CD56
Αύξηση / εμφάνιση	3	2	4	1
Απώλεια		1	1	1
Αύξηση ακολουθούμενη από απώλεια			2	
Αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης			5	1
Σύνολο	6.3%	6.3%	25%	6.3%

RFS of MM: Impact of immunophenotyping at 3 months post-ASCT (n=200 patients)



RFS: Impact of immunophenotyping at 3 months post-ASCT in 99 CR (IF-) patients

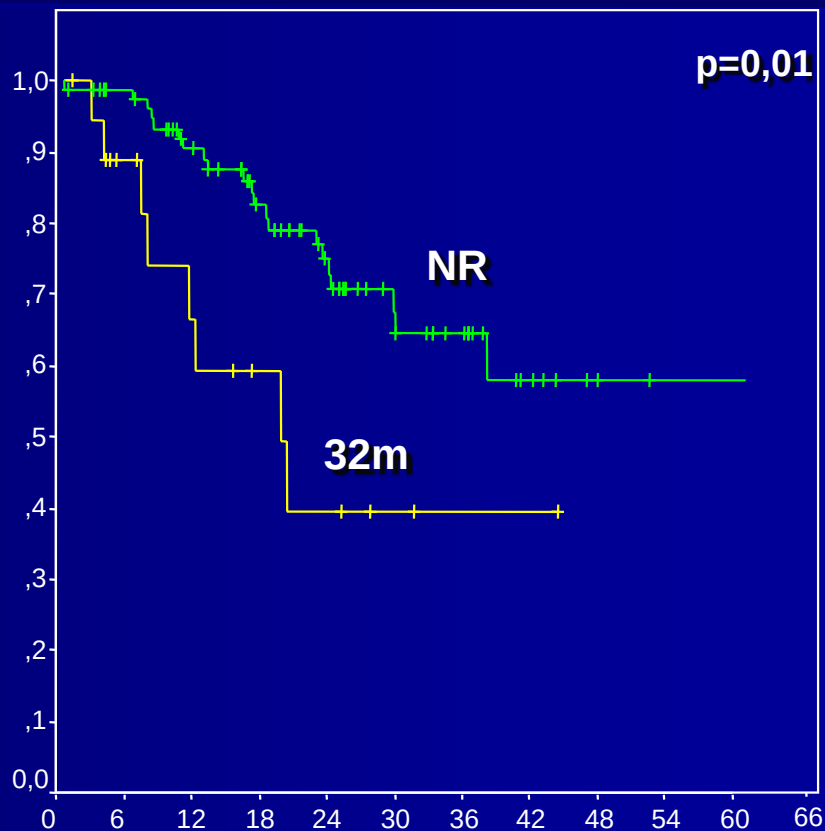
%MM-PC



Months from immunophenotypical analysis (3 months post-ASCT)

— $<0.01\%$ MM-PC
— $\geq 0.01\%$ MM-PC

%N-PC / total PC



— $\geq 75\%$ N-PC/total PC
— $< 75\%$ N-PC/total PC

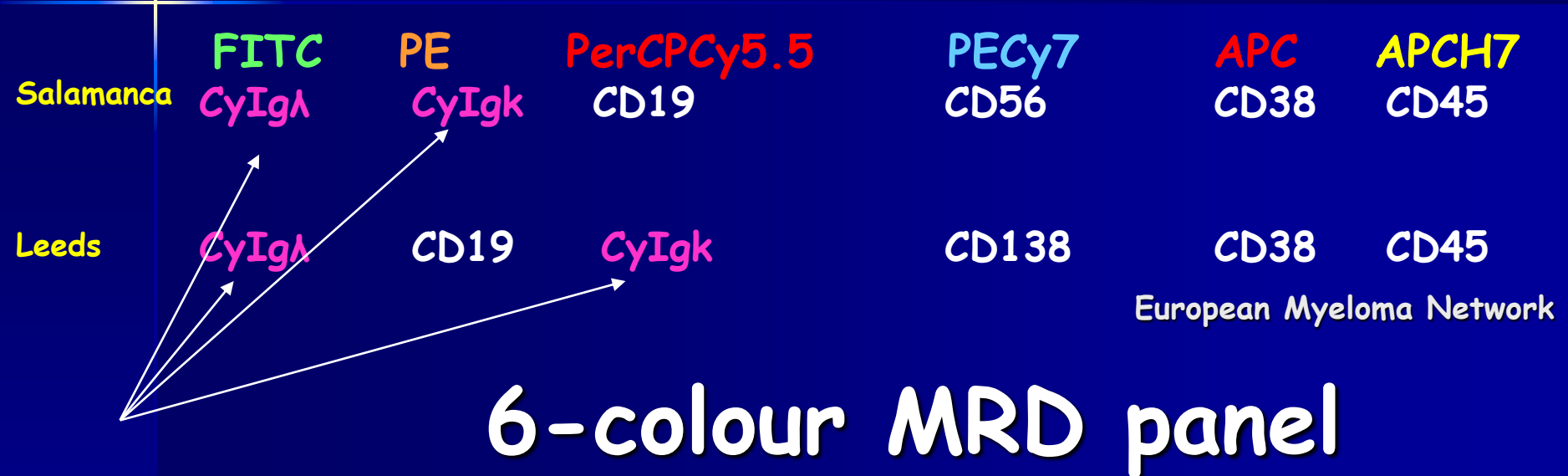
Ελάχιστη υπολειμματική νόσος MRD

- Γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος όχι μόνο καταμέτρησης υπολειμματικών ΜΠΚ αλλά ταυτόχρονα και τον έλεγχο της αναλογίας τους προς τα φυσιολογικά ΠΚ που είναι σημαντικός προγνωστικός δείκτης υποτροπής της νόσου μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση ασθενών.
- Εφαρμόσιμη σε όλες σχεδόν της περιπτώσεις **(90% ,έναντι 75% ASO-PCR)** και μπορεί να φτάσει το όριο ευαισθησίας ανίχνευσης ΠΚ έως και 0.01% (**10^{-4}**) .
- Είναι λιγότερο ευαίσθητη από την ASO-PCR (**10^{-5}**) όμως δεν διαφοροποιείται αναλόγως του περιστατικού.
- Μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς να είναι απαραίτητα γνωστός ο ανοσοφαινότυπος του υπό θεραπεία ΠΜ.
- Δίνει παράλληλα πληροφορία για την ποιότητα του υπό ανάλυση δείγματος και ταιριάζει στην καθημερινή πρακτική ενός ερευνητηρίου ρουτίνας.

PROTEINOMENA PANELS (Salamanca)

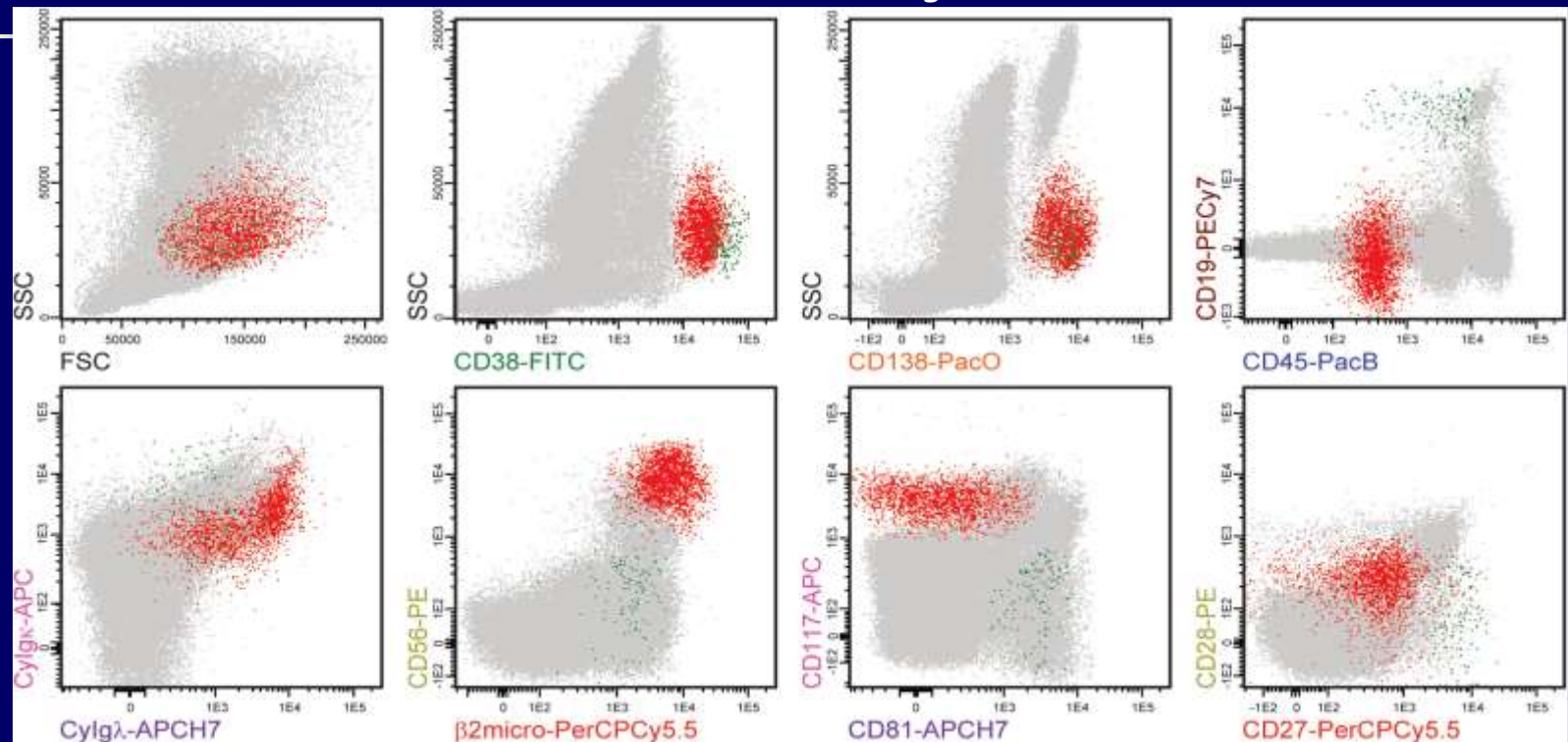
No. of Colors	PB	AMCA PO	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC	PE-Cy7	Alexa700	APC-Cy7
3			CD38	CD56	CD19				
4			CD38	CD56	CD19	CD45			
6			sIgL	sIgk	CD19	CD45	CD56	CD38	
8	CD19	CD45	sIgL	sIgk	CD138	CD28	CD56	CD38	

6-colour Screening panels



PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CD45	CD138	CD38	CD56	b2 micro	CD19	CyIgk	CyIgle
CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

EuroFlow antibody panels
JJM van Dongen et al Leukemia (2012)



Example of a bone marrow (BM) sample from a monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) patient. Normal plasma cells (green dots) show a typically normal immunophenotypic profile and coexist in this sample with a clonal population of plasma cells (red dots).

Θεραπευτικοί στόχοι

■ CD20 (15-25% +)

Μη ενθαρρυντική απόκριση σε αρκετές μικρές, φάσης II δοκιμές με χρήση μόνο του παράγοντα Rituximab

■ CD52 (15-45%)

Εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο ΠΜ

Η συμβολή της κυτταρομετρίας στο ΠΜ

■ Διάγνωση

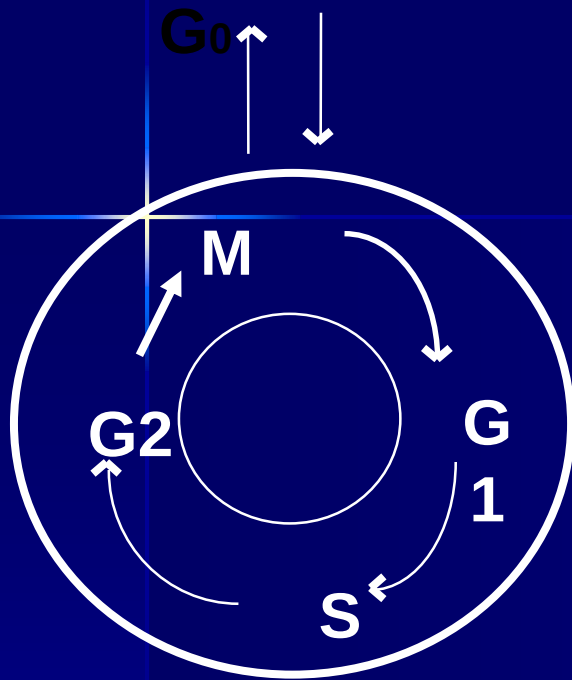
■ Πρόγνωση

■ Παρακολούθηση

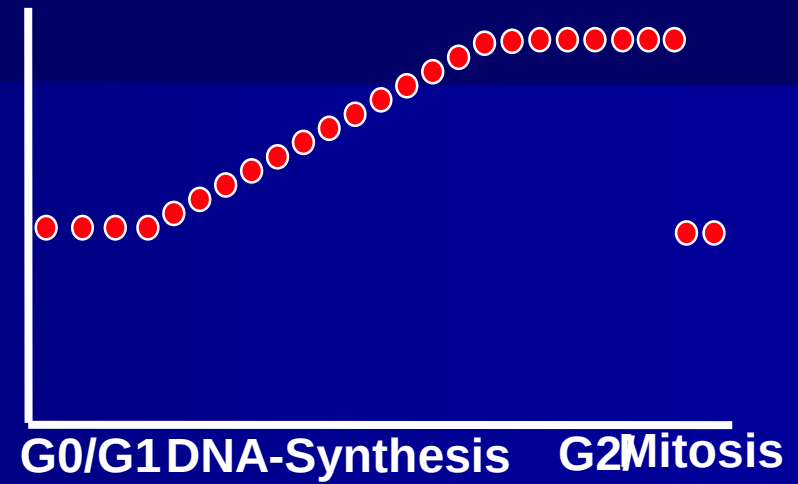
DNA ανάλυση



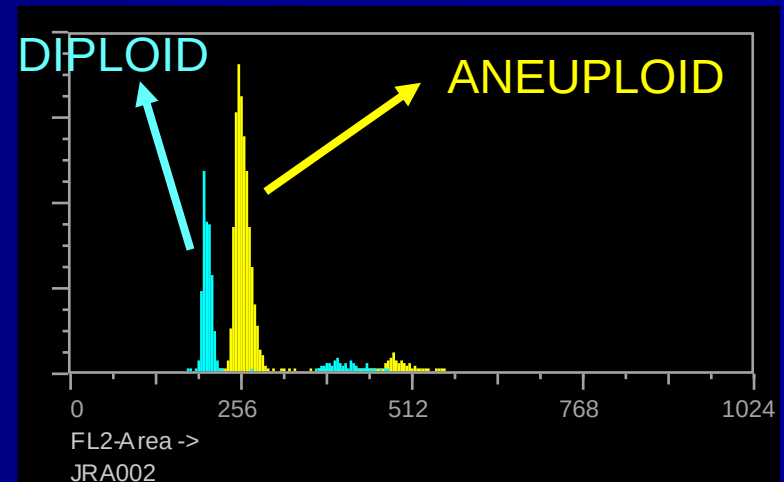
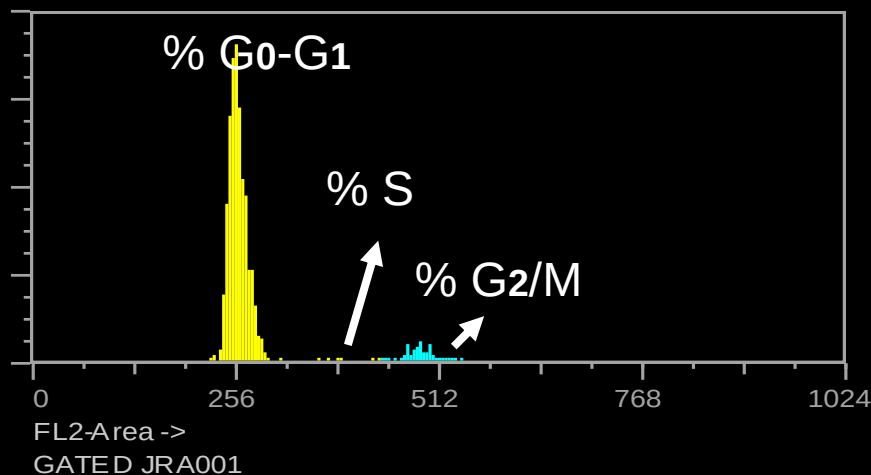
ANALYSE DNA



*Cell DNA
contents*



Cell Cycle phases



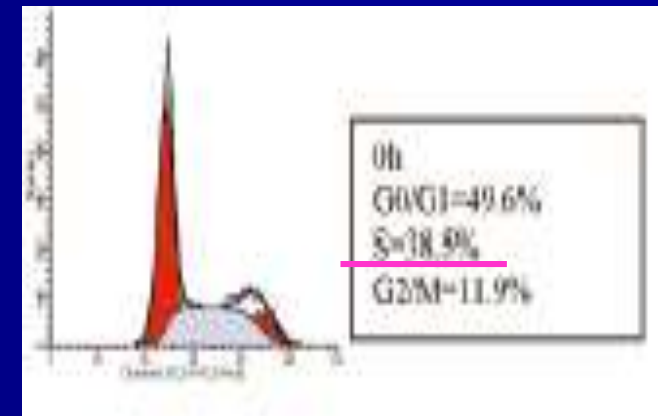
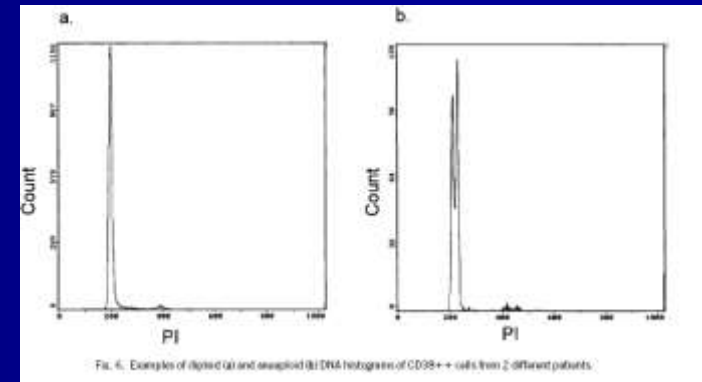
ΔΕΙΚΤΗΣ DNA (DNA INDEX)

$$\text{D.I.} = \frac{\text{Mean G0/G1 of tumor cells}}{\text{Mean G0/G1 of normal cells}}$$

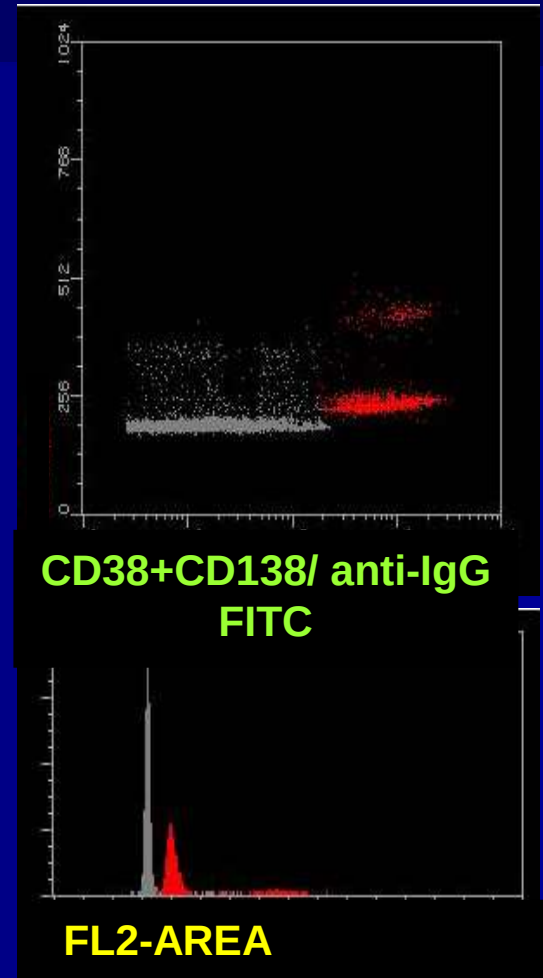
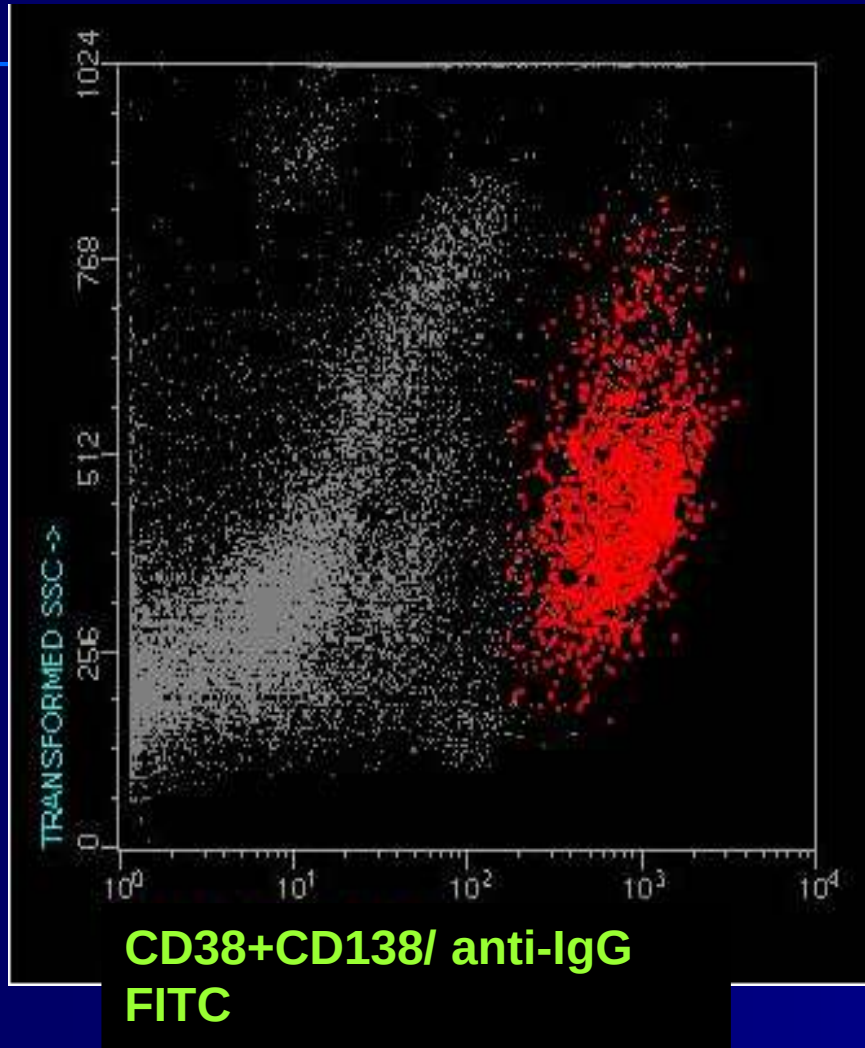
- . DNA diploid = 1
- . DNA aneuploid $< \dot{\eta} > 1$
- . DNA hyperdiploid > 1
- . DNA hypodiploid < 1
- . DNA poliploid 1.5, 2, 2.5...
- . DNA haploid 0.5

LABELING INDEX : LI

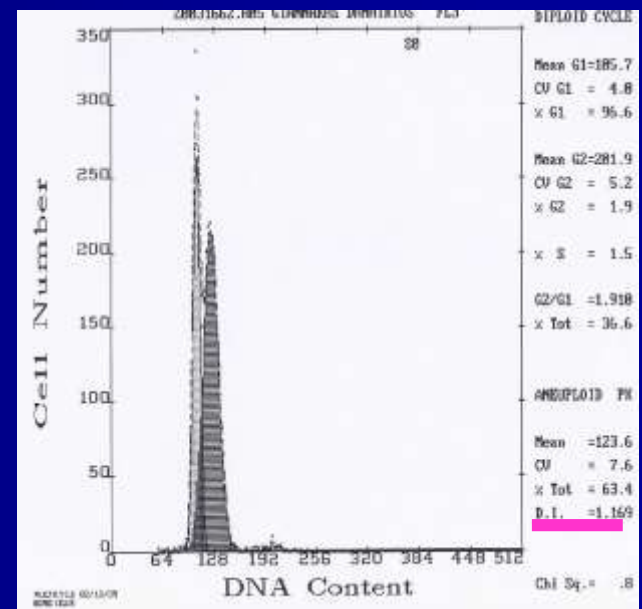
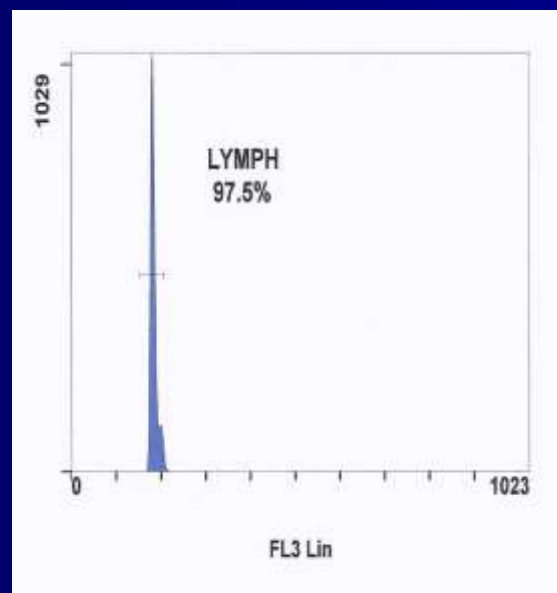
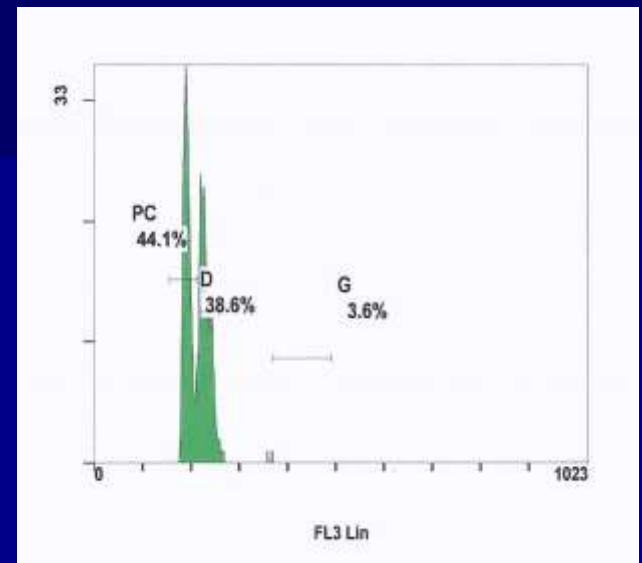
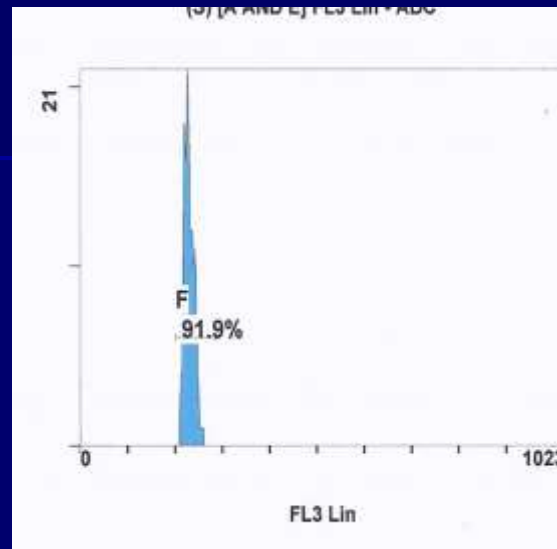
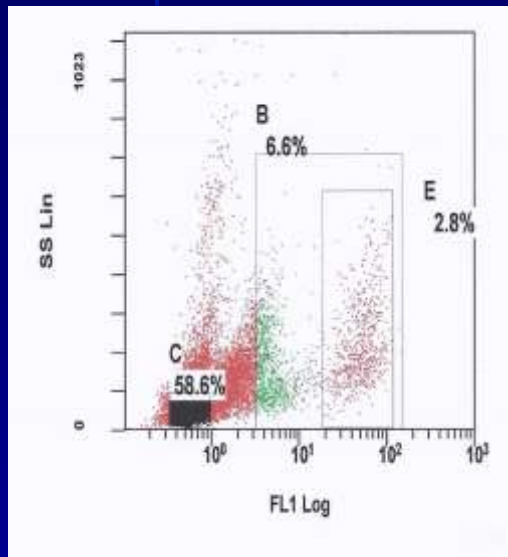
- Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (**Labeling index LI**) που συσχετίζεται με το ποσοστό των κυττάρων στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου αποτελεί έναν ακόμη προγνωστικό δείκτη.
- Η χρήση IP με κατάλληλα mAbs επιτρέπουν την μέτρηση της S φάσης του κυτταρικού κύκλου συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών στο κυτταρόμετρο, με την χρήση κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων.



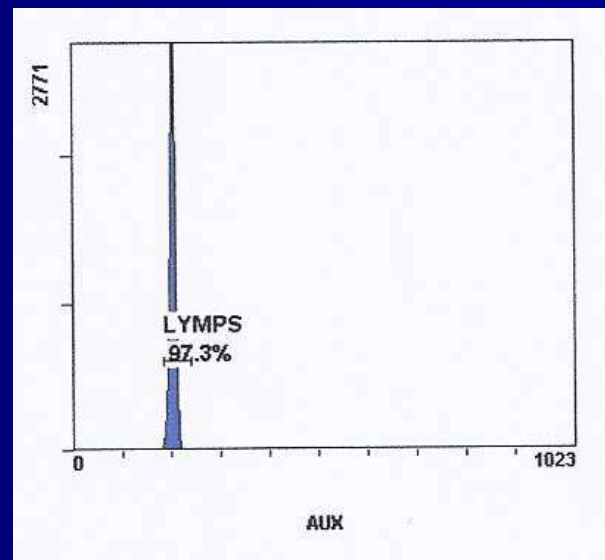
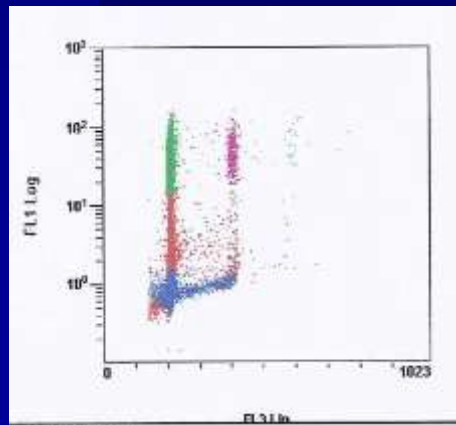
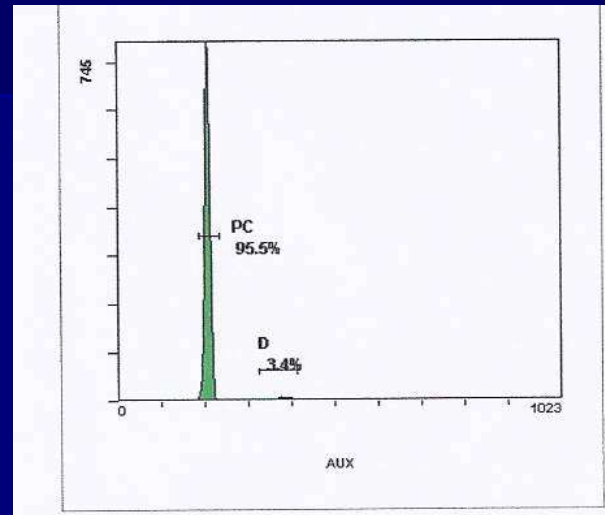
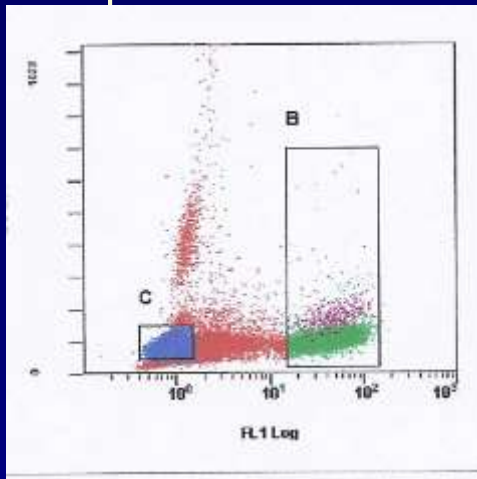
DNA ANALYSIS TTK

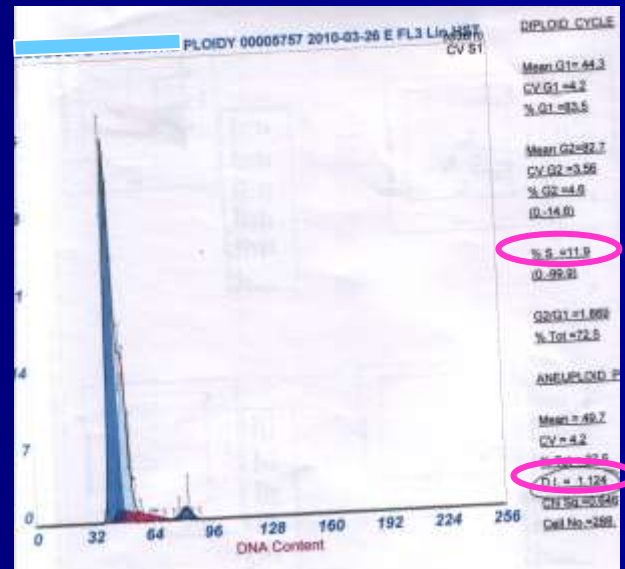
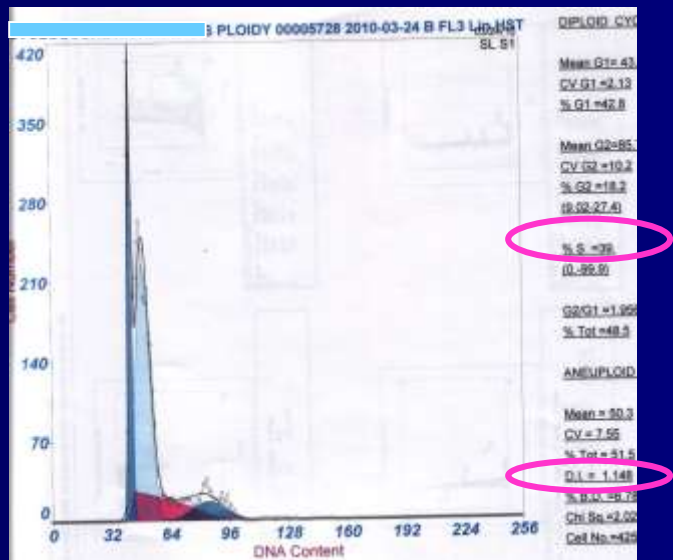


DI= 1.169 Υπερπλοειδικό



DI= 1.01 διπλοειδικό





DNA ανάλυση

- Η επιβίωση είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε υπερπλοειδή από ότι σε διπλοειδή ΤΜ (*Garcia-Sanz R et al 1995*).
- Υποπλοειδή ή δικλωνικά ΤΜ έχουν χειρότερη πρόγνωση και μεγαλύτερη αντοχή στη χημειοθεραπεία από τα διπλοειδή ή τα υπερπλοειδή (*Smith L, et al 1986*).
- Το ποσοστό των διαιρούμενων (S-φάση) ΤΚ (LI) είναι **ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης** στο ΤΜ. Υψηλό ποσοστό 2 ή 3% ΤΚ σε S φάση προβλέπει κακή πρόγνωση (*Trendle M, et al 1999*).
- Ωστόσο ο δείκτης LI παρόλο που είναι αυξημένος στο ΤΜ σε σχέση με ασθενείς MGUS και smoldering MM δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαφοροδιάγνωση, γιατί το 1/3 των ασθενών με ΤΜ έχουν φυσιολογικές τιμές LI των ΤΚ. (*San Miguel et al 2006*)

Συμπεράσματα

Η κυτταρομετρία ροής αναδεικνύεται σε ένα **πολύτιμο σύμμαχο** για την κλινική πρακτική αντιμετώπιση του ΠΜ διότι αποδεδειγμένα συνεισφέρει στη:

- Διαφοροδιάγνωση ανάμεσα στη MGUS και ΠΜ
- Πρόγνωση του ΠΜ βάσει του αριθμού των ΠΚ
- Πρόγνωση βάσει του προτύπου έκφρασης αντιγονικών δεικτών (παρέχοντας τη δυνατότητα εξατομικευμένης θεραπείας).
- Πρόγνωση βάσει DNA ανάλυσης.
- Πρόβλεψη του κινδύνου εξέλιξης του SMM σε ΠΜ.
- Διερεύνησης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.
- Διάγνωση διαφόρων πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αιματολογικό
εργαστήριο

Μαρκάλα Δ
Δίτσα Μ
Σαχπατζίδου Δ
Μπλίκης Α
Γκριτζέλη Β
Καρυπίδου Β
Μαραγκοζίδου Π
Δομούζη Π



Αιματολογική
κλινική

Κωνσταντίνиду Π.
Κατωδρύτου Ει.
Χατζηχαρίση Ε.
Βέρρου Ε



ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ !