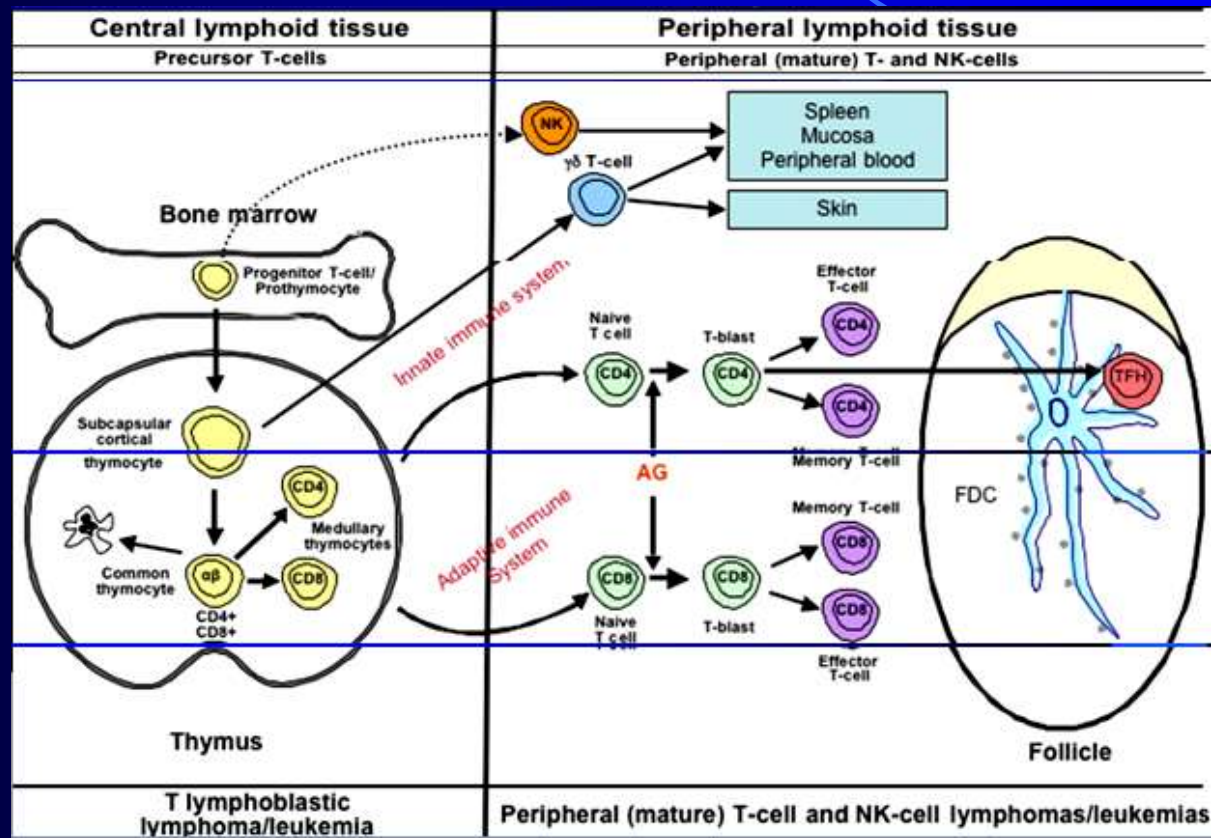


T και NK Λεμφοϋπερπλαστικά Νοσήματα και Υπολειμματική Νόσος

**Ιωάννα Αθανασιάδου
Κλινικός Βιοχημικός (M.Sc.)
Γ.Ν.Α Λαϊκό Νοσοκομείο**

Περιφερικά T / NK Λεμφώματα

Ετερογενής ομάδα σπάνιων χρόνιων λεμφοϋπερλαστικών νοσημάτων που προέρχονται από τα T και NK κύτταρα τα οποία μοιράζονται αρκετά κοινά ανοσοφαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.



Ο όρος **περιφερικό** T λέμφωμα δεν αναφέρεται στην θέση προσβολής αλλά στον ανοσοφαινότυπο των παθολογικών κυττάρων που προέρχονται από τα **ώριμα/μεταθυμικά (post-thymic)** T λεμφοκύτταρα

T – ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ

WHO Classification 2008 χρησιμοποιεί:

- Μορφολογικά
- Ανοσοφαινοτυπικά
- Μοριακά
- Κυτταρογενετικά



χαρακτηριστικά

Σε αντίθεση με τα Β λεμφώματα η εξέλιξη στην διάγνωση, ταξινόμηση και αντιμετώπιση των Τ λεμφωμάτων υπήρξε πολύ πιο αργή.

Tab. 1: The 2008 WHO classification of mature (peripheral) T- and NK-cell neoplasms

Primarily leukaemic T/NK-cell tumours

T-cell prolymphocytic leukaemia (T-PLL)

T-cell large granular lymphocytic leukaemia (T-LGL)

Chronic lymphoproliferative disorders of NK-cells

Aggressive NK-cell leukaemia

Adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL)

T/NK-cell tumours of extranodal sites

Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type (NK/TCCL)

Enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL)

Hepatosplenic T-cell lymphoma (HSTL)

Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL)

Primarily cutaneous T-cell tumours

Mycosis fungoides (MF)

Sézary syndrome (SS)

Primary cutaneous CD30-positive T-cell lymphoproliferative disorders

- Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma (c-ALCL)
- Lymphomatoid papulosis

Primary cutaneous peripheral T-cell lymphomas, rare subtypes

- Primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma
- Primary cutaneous CD8+ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma
- Primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoma

Primarily nodal T-cell tumours

Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL-nos)

Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL)

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK+

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-negative

EBV+ T-cell lymphoproliferative disorders of childhood (systemic and hydroa vacciniforme-like lymphoma)

Λόγω σημαντικής μορφολογικής και ανοσοφαινοτυπικής αλληλοεπικάλυψης για την σωστή ταξινόμηση τους έχουν μεγάλη σημασία οι κλινικές εκδηλώσεις και η ανατομική τους εντόπιση (λευχαιμικά, εξωλεμφαδενικά, λεμφαδενικά, δερματικά).

Περιφερικά T λεμφώματα μια ετερογενής ομάδα νοσημάτων που διάγνωση, ταξινόμηση, παρακολούθηση και αντιμετώπιση αποτελεί πρόκληση

- Σπάνια
- Σημαντική μορφολογική, ανοσοφαινοτυπική και κλινική αλληλοεπικάλυψη
- Σε πολύ λίγες περιπτώσεις έχουν αναγνωριστεί συγκεκριμένες γενετικές διαταραχές
- Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν είναι ακόμα γνωστό το αντίστοιχο φυσιολογικό κύτταρο από το οποίο προέρχεται ο παθολογικός κλώνος.
- Συχνά η ανατομική εντόπιση τους επιβάλλει την αναζήτηση των παθολογικών κυττάρων σε υλικά που η ποσότητα τους είναι μικρή και ο αριθμός των κυττάρων ελάχιστος (FNA λεμφαδένων, υγρό από δερματικές βλάβες, ENY κλπ)
- Συχνά τα παθολογικά κύτταρα βρίσκονται μέσα σε ένα υπόστρωμα αντιδραστικών φυσιολογικών λεμφοκυττάρων
- Δύσκολη η τεκμηρίωση κλωνικότητας σε σχέση με τα B λεμφώματα

VOLUME 26 • NUMBER 25 • SEPTEMBER 1 2008

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

International Peripheral T-Cell and Natural Killer/T-Cell Lymphoma Study: Pathology Findings and Clinical Outcomes

International T-Cell Lymphoma Project

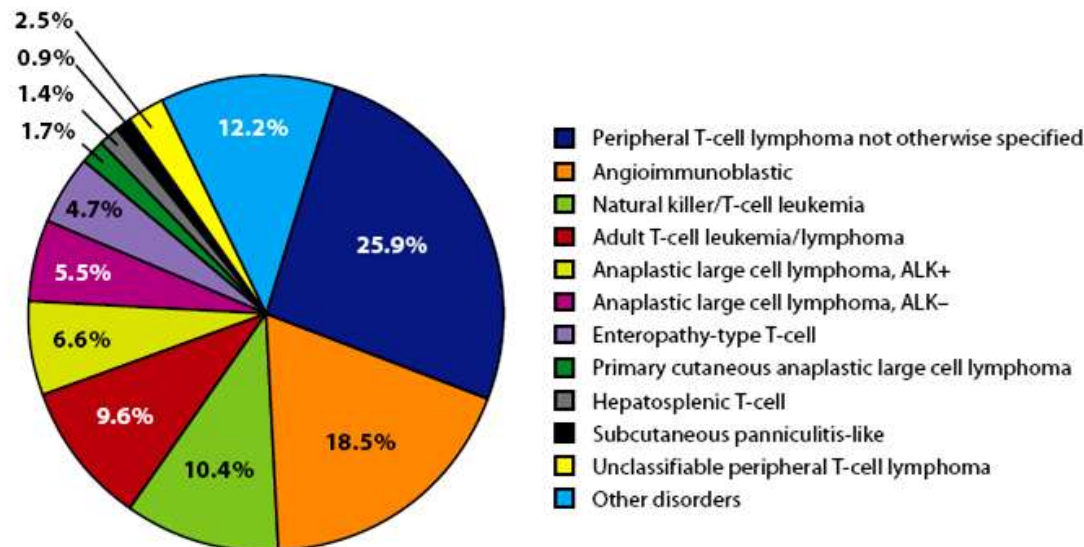
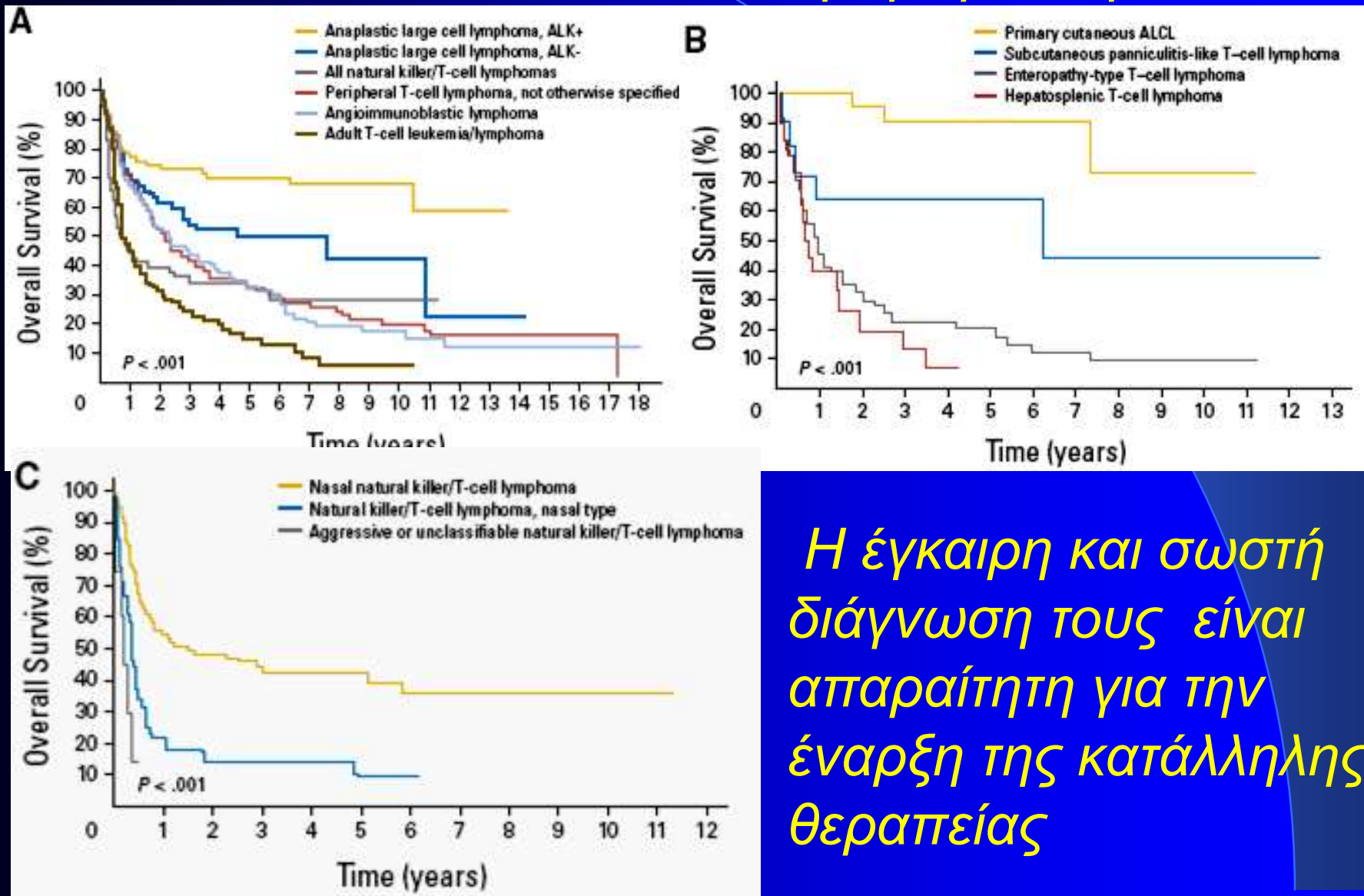


Table 1. Major Lymphoma Subtypes by Geographic Region

Subtype	%		
	North America	Europe	Asia
PTCL-NOS	34.4	34.3	22.4
Angioimmunoblastic	16.0	28.7	17.9
ALCL, ALK positive	16.0	6.4	3.2
ALCL, ALK negative	7.8	9.4	2.6
NKTCL	5.1	4.3	22.4
ATLL	2.0	1.0	25.0
Enteropathy-type	5.8	9.1	1.9
Hepatosplenic	3.0	2.3	0.2
Primary cutaneous ALCL	5.4	0.8	0.7
Subcutaneous panniculitis-like	1.3	0.5	1.3
Unclassifiable T-cell	2.3	3.3	2.4

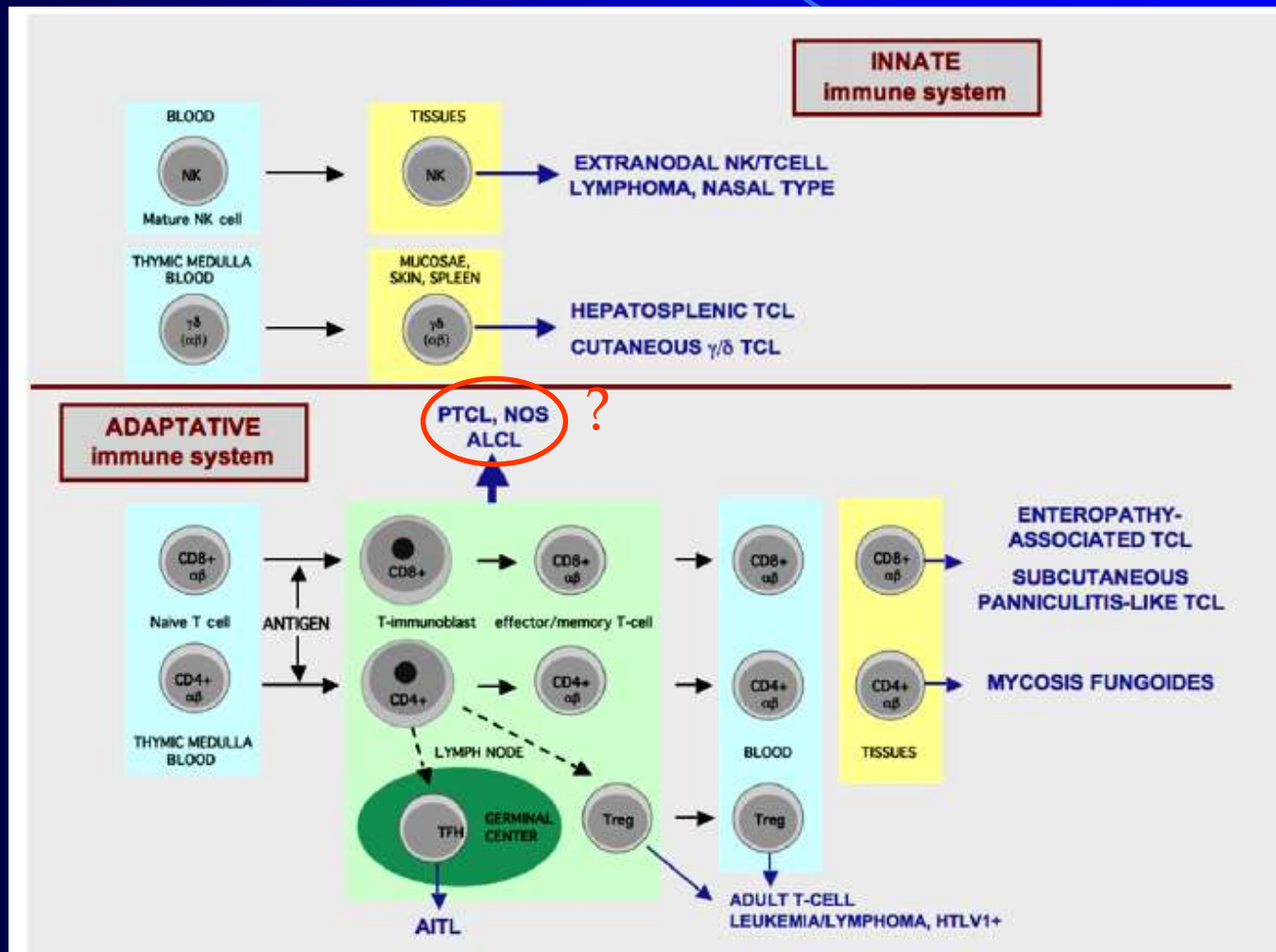
Abbreviations: PTCL, peripheral T-cell lymphoma; NOS, not otherwise specified; ALCL, anaplastic large-cell lymphoma; NKTCL, natural killer/T-cell lymphoma.

*Μπορεί να είναι σπάνιαπροσβάλλουν νέα άτομα
συχνά έχουν επιθετική πορεία
και κακή πρόγνωση*



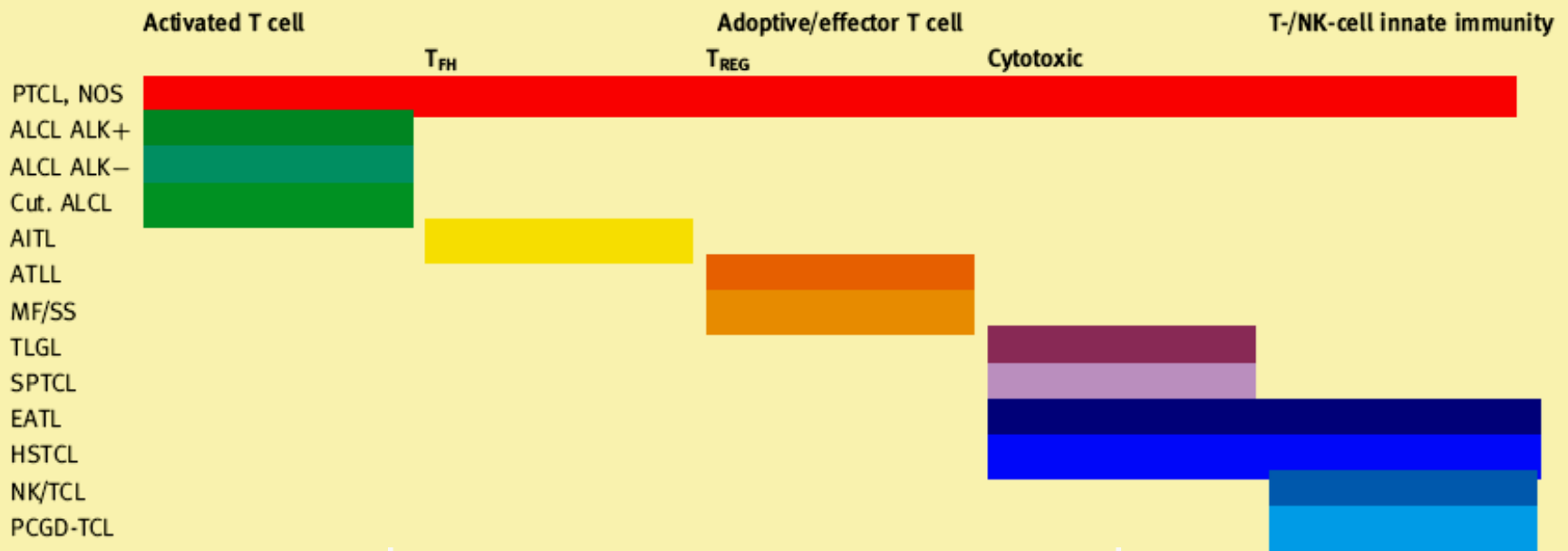
*Η έγκαιρη και σωστή
διάγνωση τους είναι
απαραίτητη για την
έναρξη της κατάλληλης
θεραπείας*

GEP: αναγνωρίστηκαν οι ομοιότητες που παρουσιάζουν τα παθολογικά κύτταρα κάποιων T λεμφωμάτων με συγκεκριμένους φυσιολογικούς T υποπληθυσμούς.



Η αναγνώριση του κυττάρου προέλευσης εξηγεί τον ανοσοφαινότυπο και κάποιες κλινικές εκδηλώσεις που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα T λεμφώματα

Hypothetical physiologic normal counterparts of PTCL



Gene specific recurrent genetic abnormalities in PTCL

Genetic abnormality	PTCL-type
<i>ALK</i> translocations	ALCL, ALK+ (100%)
<i>TRA@/TCL 1A/B</i> translocation	T-PLL (80%)
<i>IRF4</i> rearrangements	Cutaneous ALCL (50%), PTCL, NOS (rare)
<i>CDK6</i> amplification	PTCL, NOS (23%)
<i>ITK/SYK</i> translocation	PTCL, NOS (rare)
<i>TRA@/BCL3</i> translocation	PTCL, NOS (rare)

Ανοσοφαινότυπος T/NK περιφερικών λεμφωμάτων.

- Ανοσοφαινότυπος μετα-θυμικού ώριμου T λεμφοκυττάρου αρνητικά για τους δείκτες CD1α, TdT, και CD34.

- Panel με συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων που βοηθούν στην ταυτοποίηση:

1. της κυτταρικής σειράς που ανήκουν τα παθολογικά κύτταρα (T ή NK)
2. του σταδίου διαφοροποίησης των παθολογικών κυττάρων.
3. της παρουσίας κλωνικού πληθυσμού.
4. της έκτοπης έκφρασης δεικτών που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα νοσήματα.
5. της απώλειας έκφρασης, υποέκφρασης ή υπερέκφρασης ενός ή περισσότερων δεικτών που εκφράζονται στα φυσιολογικά T/NK λεμφοκύτταρα.
6. της έκφρασης δεικτών που αποτελούν θεραπευτικούς στόχους.
7. της έκφρασης δεικτών που μπορεί να αποτελούν προγνωστικούς δείκτες.

Δείκτες για την διάγνωση και ταξινόμηση των T-NK λεμφούπερπλαστικών νοσημάτων

Table 3. Reagents of clinical utility in the evaluation of mature T- and NK-cell lymphoid neoplasms

Reagent	Normal distribution	Clinical utility in mature T- and NK-cell lymphoid neoplasms	Comments
CD2	T cells and NK cells.	Indicator of T- or NK-cell lineage.	May be aberrantly expressed in AML.
CD3, surface	Acquired during maturation of T cells.	Indicator of T-cell lineage. May be aberrantly lost or decreased in intensity.	—
CD4	T-cell subset and monocytes/histiocytes.	Useful in classification of mature T-cell lymphoid neoplasms.	NOT indicator of clonality. Also may be positive in AML and HDN.
CD5	T cells and minor B-cell subset.	Indicator of T-cell lineage. May be aberrantly lost or decreased in intensity.	May be aberrantly expressed on B cells.
CD7	T cells and NK cells.	Indicator of T-cell lineage. May be aberrantly lost or decreased in intensity.	Some normal and reactive CD7 ⁺ cells. May be aberrantly expressed in AML.
CD8	T-cell subset and some NK cells.	Useful in classification of mature T-cell lymphoid neoplasms.	NOT indicator of clonality
CD45	All B cells (weaker intensity on precursors and plasma cells), all T cells (weaker intensity on precursors).	Useful in distinguishing mature lymphoid neoplasms (bright intensity) from ALL and PCN (weak intensity to negative).	—
CD56	NK cells and NK-like T cells.	Indicator of NK differentiation.	Aberrant expression in AML, PCN. Positive HDN. Small subset of regenerating myeloid cells demonstrates weak expression.
CD1a*	Immature T cells.	ALL.	Also positive on Langerhans cells.
CD3, cytoplasmic*	All T cells including lymphoblasts.	Indicator of T- or NK cell lineage. NK cells contain cCD3 epsilon.	—
CD10*	Immature T cells and B cells, subset of mature T cells and B cells, and neutrophils.	Frequently present in ALL. Found on some mature T-cell neoplasms, in particular AITCL.	Minor subset of normal T cells.
CD16*	NK cells, NK-like T cells, and maturing neutrophilic cells.	Indicator of NK differentiation.	Antibodies with differing specificity for lymphoid cells and neutrophilic cells..
CD25*	Activated T cells.	Uniform strong positivity in ATLL. More variable expression in other subtypes. Assessment for anti-CD25 therapy, eg, Ontak.	—

Δείκτες για την διάγνωση και ταξινόμηση των T-NK λεμφούπερπλαστικών νοσημάτων

Reagent	Normal distribution	Clinical utility in mature T- and NK-cell lymphoid neoplasms	Comments
CD25*	Activated T cells.	Uniform strong positivity in ATLL. More variable expression in other subtypes. Assessment for anti-CD25 therapy, eg, Ontak.	—
CD26*	Immature T cells, NK cells, and activated T cells. Most CD4 ⁺ T cells also CD26 ⁺ .	CTCL/Sézary syndrome often CD26 negative (> 30% CD4 ⁺ cells, CD26 ⁻).	Not specific for Sézary/CTCL.
CD30*	Activated T and B cells, and monocytes.	Strong uniform staining in ALCL. More variable staining in other mature T- and NK-cell neoplasms. Positive in Hodgkin lymphoma.	—
CD45RA*	B- and T-cell subsets, including mostly naive T cells.	May help to identify restricted population.	—
CD45RO*	B- and T-cell subsets, including mostly memory T cells.	May help to identify restricted population.	—
CD57*	NK cells, NK-like T cells.	Indicator of NK-differentiation.	—
TCR α/β*	Mature T cells in association with sCD3.	Classification mature T-cell lymphoid neoplasms.	—
TCR γ/δ*	Mature T cells in association with sCD3.	Classification mature T-cell lymphoid neoplasms. May help to identify restricted population.	—
TIA-1*	Cytotoxic T cells.	Classification mature T-cell lymphoid neoplasms.	—
T-β* chain isoforms	T cells.	Restricted expression associated with clonality.	—

Screening Panel

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD20 and CD4	CD45	CD8 and smIgλ	CD56 and smIgκ	CD5	CD19 and TCRγδ	smCD3	CD38

NK Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim**
1	CD4	CD45	CD7	CD26	smCD3	CD56	CD5	CD19	Phenotypic characterization
Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim**
1	CD2	CD45	CD7	CD26	smCD3	CD56	CD5	CD19	Detection of aberrant NK cell phenotype
2	CD16	CD45	CD57	CD25	smCD3	CD56	CD11c	CD19	Detection of aberrant NK cell phenotype
3	HLADR	CD45	cyPerforin	cyGranzyme	smCD3	CD56	CD94	CD19	Detection of aberrant NK cell phenotype; Assessment of cytotoxic effector phenotype
6	CD4	CD45		CD279	smCD3			CD8	Identification of lymphomas derived from follicular helper T cells (angioimmunoblastic T-cell lymphomas)

Panel διάγνωσης T και NK λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων.

- Κλινικές πληροφορίες (Γεωγραφική κατανομή, Ανατομική εντόπιση, αριθμός λευκών, υπεργαμμασφαιριναιμία, ανοσοκαταστολή, προηγηθείσα θεραπεία κλπ)
- Μορφολογία (μέγεθος κυττάρου, πυρήνας κλπ)
- Επιλογή panel δεικτών

FITC	PE	RerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
CD8	CD56	CD3	CD4	CD14	CD45
K	L	CD19	CD5	CD20	CD45

FITC	PE	RerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
CD2	CD7	CD3	CD5	CD4/ CD8	CD45
CD57	CD16	CD3	CD10	CD8	CD45
CD4	CD25	CD3	CD45RA	CD11b	CD45
TCRab	TCRgd	CD3	HLA-DR	CD4/ CD8	CD45

CD26	CD7	CD3	CD10	CD4	CD45
------	-----	-----	------	-----	------

CD30	CD25	CD3	HLA-DR	CD4	CD45
------	------	-----	--------	-----	------

Η διάγνωση ενός λεμφώματος προϋποθέτει την απόδειξη κλωνικότητας

B

■ Κλωνικότητα

κ/λ ratio
>3/1

στο βασικό panel

Μοριακά

T

■ Κλωνικότητα

Υπερέκφραση ενός
επιτόπου της V περιοχής
των β και γ αλύσεων του
TCR υποδοχέα

οχι στο βασικό panel

+

TCRVb Repertoire Kit
70% των Vb επιτόπων
του TCRαβ

Μοριακά

NK

■ Κλωνικότητα

?

οχι στο βασικό panel

+

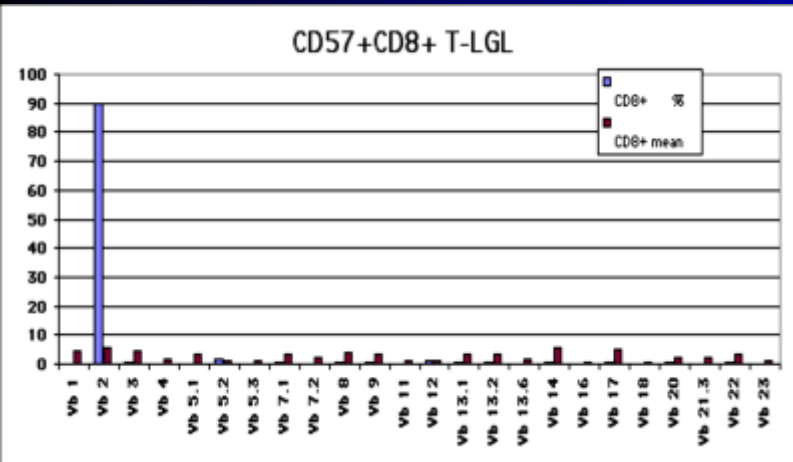
KIR ???

ΟΧΙ

Μοριακά

Μελέτη ρεπερτορίου επιτόπων της Vβ αλυσίδας του TCRαβ με KP

Panel που μελετά την έκφραση 24 επιτόπων της Vβ αλυσίδας του TCRαβ υποδοχέα που καλύπτει το 70% του συνόλου των επιτόπων.



- Η επικράτηση ενός επιτόπου θέτει ισχυρή υποψία ύπαρξης μονοκλωνικού T πληθυσμού
- Η ελάττωση όλων των επιτόπων αποτελεί έμμεση ένδειξη ύπαρξης κλωνικού T πληθυσμού
- Απαιτείται πάντα επιβεβαίωση με μοριακή μελέτη (PCR)

Πλεονεκτήματα KP:

- ανιχνεύση κλωνικότητας σε συγκεκριμένο T υποπληθυσμό (CD4 ή CD8).
- με την πολυχρωματική KP ανίχνευση κλωνικότητας στον υποπληθυσμό που ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηρίζει τα παθολογικά κύτταρα.

Μειονεκτήματα KP:

- δεν ανιχνεύει όλους τους επιτόπους
- δεν μπορεί να εφαρμοστεί στις περιπτώσεις με απώλεια sCD3
- δεν μπορεί να εφαρμοστεί στις περιπτώσεις TCRγδ+ T λεμφωμάτων.

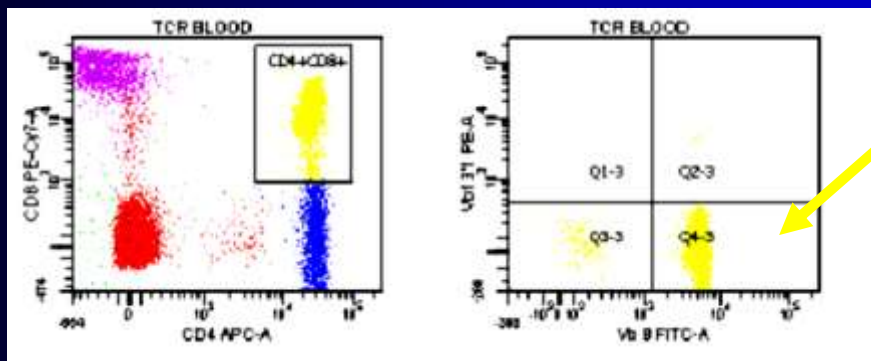
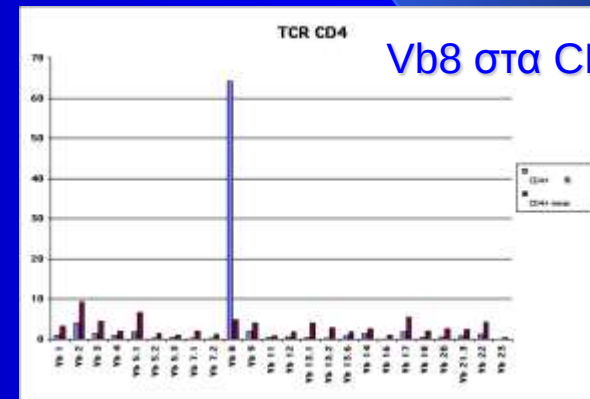
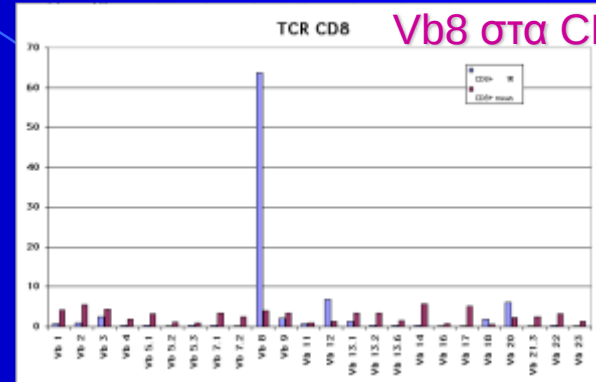
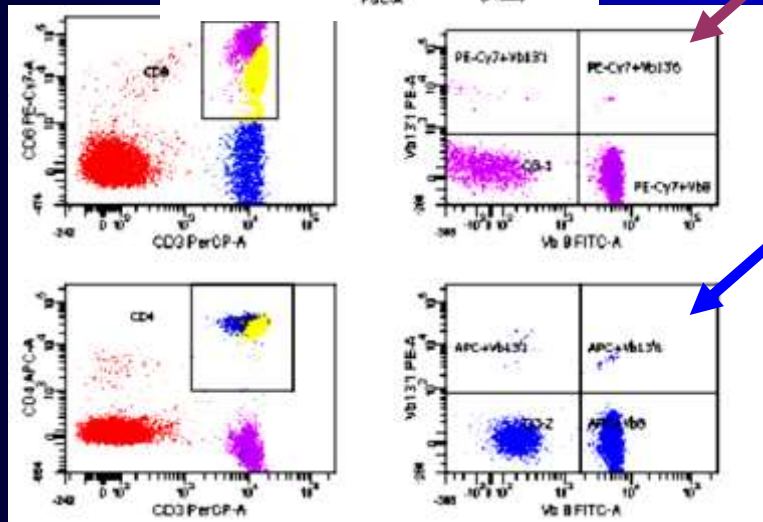
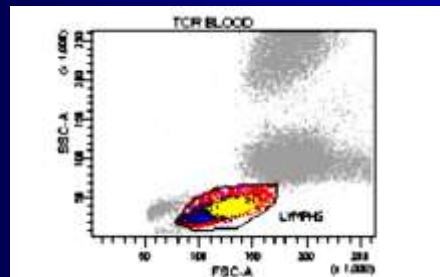
Μελέτη των Vb επιτόπων του TCRαβ με πενταπλό φθορισμό

Μεγάλη αύξηση του Vb8

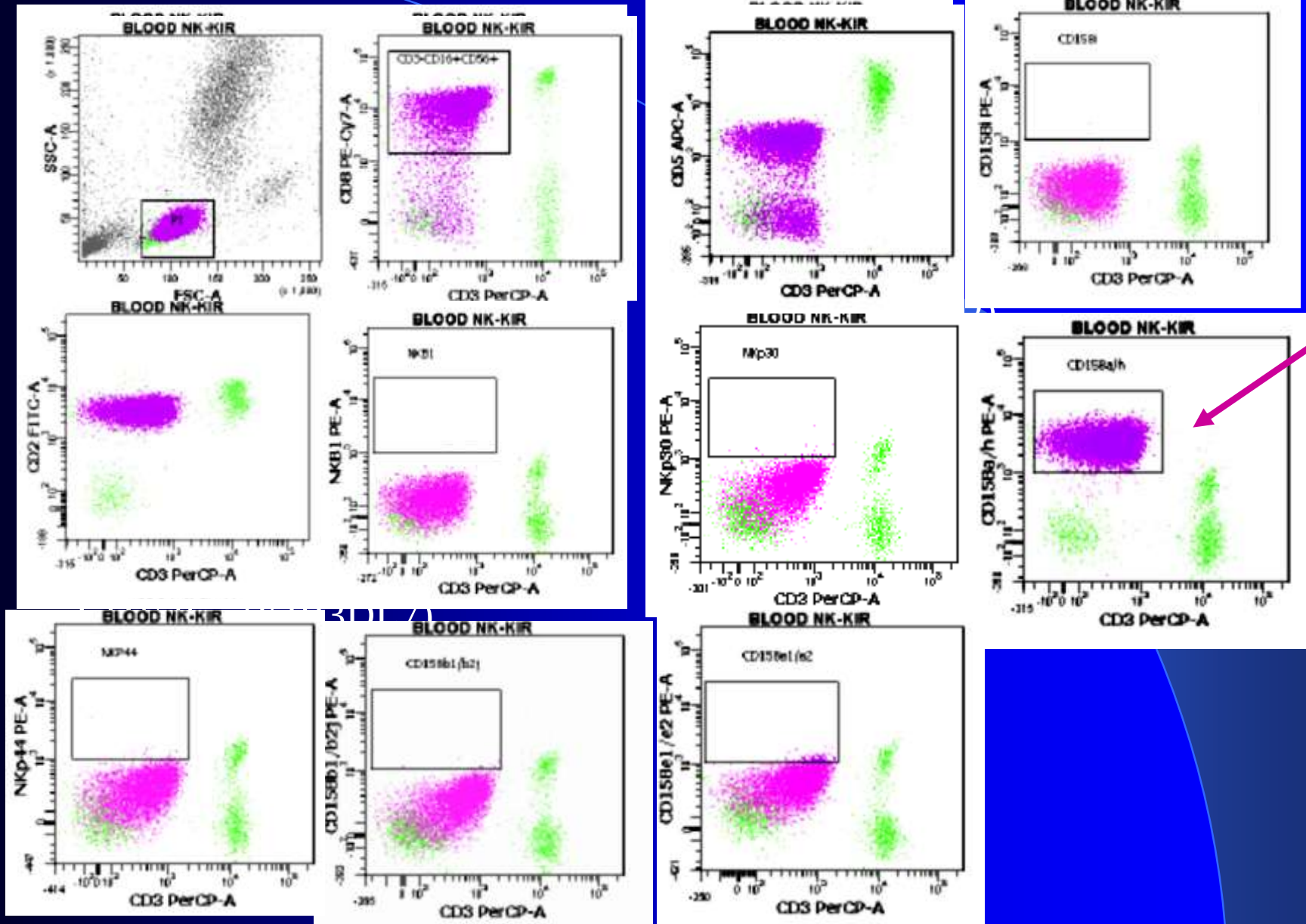
Vb8 στα CD8+ = 64%,

Vb8 στα CD4+ = 64%

Vb8 στα CD4+CD8+ = 92%



ΚΙΡ υποδοχείς ΝΚ λεμφοκυττάρων



Υποψία ύπαρξης παθολογικού T ή NK πληθυσμού τίθεται:

T

- Αύξηση της % ενός από τους υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων (CD4/CD8)
- Απώλεια έκφρασης, ασθενής ή εντονότερη έκφραση ή ενός ή περισσότερων T δεικτών.
- Null phenotype : περιπτώσεις με απώλεια όλων των αντιγόνων που χαρακτηρίζουν την T σειρά
- Έκτοπη έκφραση δεικτών ή δεικτών που χαρακτηρίζουν λειτουργία πχ :

NK

CD10+ (AITL), CD30+ (ALCL), CD57+(T-LGL)

- Αύξηση της % των CD3-CD16+CD56+ κυττάρων
- Έκφραση CD2, CD7, CD8dim, απώλεια έκφρασης CD16 ή CD56
- Έκτοπη έκφραση δεικτών (πχ CD5) ή δεικτών που χαρακτηρίζουν λειτουργία πχ : CD57, Granzyme, Perforin, CD94

Στην αξιολόγηση ενός παθολογικού T πληθυσμού πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν :

- Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν φυσιολογικούς T υποπληθυσμούς όπως π.χ τα TCRγδ+ T λεμφοκύτταρα που είναι CD4- CD8- CD5-
- Στις περιπτώσεις T παθολογικών πληθυσμών με απώλεια του επιφανειακού CD3 (sCD3-) είναι απαραίτητη η κυτταροπλασματική χρώση CD3 (cytCD3).
- Κατά την ανάλυση πρέπει να αποφεύγεται η οριοθέτηση με βάσει την έκφραση sCD3 γιατί συχνά το παθολογικό κύτταρο δεν εκφράζει sCD3. Επίσης η αναζήτηση δεν πρέπει να περιορίζεται στην gate των λεμφοκυττάρων γιατί στίς περιπτώσεις που τα παθολογικά κύτταρα είναι μεγάλου μεγέθους όπως π.χ στο ALCL μπορεί να βρίσκονται ανάμεσα ή πάνω απο τα μονοκύτταρα.
- Για την αξιολόγηση NK πληθυσμών πρέπει να χρησιμοποιείται και το CD56 και το CD16 γιατί συχνά τα παθολογικά κύτταρα εκφράζουν έναν μόνο απο τους δύο δείκτες.
- Η ανεύρεση ενός κλωνικού T πληθυσμού δεν σημαίνει ύπαρξη T λεμφώματος. Συχνή ανεύρεση αντιδραστικών κλωνικών T πληθυσμών στην οξεία φάση ιογενών λοιμώξεων, σε ηλικιωμένα άτομα κλπ.

Η έκφραση των δεικτών CD4 και CD8 διαχωρίζει τα T λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα σε 4 ανοσοφαινοτυπικές κατηγορίες που αλληλοεπικαλύπτονται

Table 4. Flow cytometric approach to the diagnosis and classification of T- and NK-cell lymphoid neoplasms

Disease entities to consider	Distinguishing phenotypic features	Additional diagnostic information
CD4⁺ CD8⁻		
<u>CTCL/Sézary syndrome</u>	Often CD7 ⁻ , CD26 ⁻ , CD25 ^{+/+} (with heterogeneous staining intensity).	Confirm characteristic morphology and clinical presentation. HYL-1 ⁻
T-PLL	Usually lacks significant phenotypic aberrancy. CD16 ⁻ , CD56 ⁻ , CD57 ⁻ .	80% t(14;14)(q11;q32) or inv(14)(q11;q32). TCL1 protein overexpression.
<u>Adult T-cell leukemia/lymphoma</u>	CD7 ⁻ , CD25 ⁺ (uniform bright intensity).	HTLV-1 ⁺ , endemic to Japan and Caribbean.
Anaplastic large cell lymphoma	Often loss of many pan-T-cell antigens. Strong uniform CD30 ⁺ , Alk-1 protein ^{+/+} . CD56 ^{+/+} , CD13 ^{+/+} , CD15 ^{+/+} , CD33 ^{+/+} . Cytotoxic granule-associated protein (+).	Anaplastic morphology, except in small cell/monomorphic variant. ALK gene rearrangement.
Angioimmunoblastic TCL	Often aberrant phenotype (eg, decreased intensity CD7 and CD3). CD10 ^{+/+} .	Characteristic morphology. Proliferative follicular dendritic meshwork, CXCL13 ⁺ , scattered EBV ⁺ B cells.
Peripheral TCL, NOS	Variable phenotype, often aberrant loss of CD5 and/or CD7.	Diagnosis by exclusion of other distinct disease entities.
CD4⁻/CD8⁺		
T-cell large granular lymphocyte leukemia	Frequent aberrant expression CD5 and/or CD7. CD16 ^{+/+} , CD56 ^{+/+} , CD57 ⁺ . TIA-1 ⁺ , granzyme-B ⁺ , perforin ⁺ .	Often LGL morphology. Usually indolent course, associated with rheumatoid arthritis and cytopenias (eg, neutropenia and anemia). EBV ⁻ .
Subcutaneous panniculitis-like TCL	Usually only focal CD56, EBV ⁻ , TCR α/β, TIA-1 ⁺ , granzyme-B ⁺ , perforin ⁺	Infiltrate in subcutis with rimming fat droplets, beanbag histiocytes. Must distinguish from lupus profundus.
Hepatosplenic TCL	Usually CD5 ⁻ and CD7 ⁺ . CD16 ^{+/+} , CD56 ⁺ , CD57 ⁻ , TIA-1 ⁺ , granzyme-B ⁻ , perforin ⁻ .	Often TCR γ/δ but may be TCR α/β, EBV ⁻ . Frequent isochromosome 7q. Usually aggressive clinical course.

Table 4. Flow cytometric approach to the diagnosis and classification of T- and NK-cell lymphoid neoplasms

Disease entities to consider	Distinguishing phenotypic features	Additional diagnostic information
CD4⁺/CD8⁺		
<u>T-PLL</u>	Usually lacks significant phenotypic aberrancy. CD16 ⁻ , CD56 ⁻ , CD57 ⁻ .	80% t(14;14)(q11;q32). TCL1 protein overexpression.
Adult T-cell leukemia/lymphoma	CD7 ⁻ , CD25 ⁺ (uniform bright).	HTLV-1 ⁺ , endemic to Japan and Caribbean.
Peripheral TCL, NOS	Variable phenotype, often aberrant loss of CD5 and/or CD7.	Diagnosis by exclusion of other distinct disease entities.
CD4⁻/CD8⁻		
Enteropathy-associated TCL	CD5 ⁻ , CD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD103 ⁺ , CD56 ^{+/+} . TIA-1 ⁺ , granzyme-B ⁺ , perforin ⁺ .	CD30 ^{+/+} , EBV ⁻ . FISH for gains 9q33–34. History of celiac disease.
<u>Hepatosplenic TCL</u>	Usually CD5 ⁻ and CD7 ⁺ . CD16 ^{+/+} , CD56 ⁺ , CD57 ⁻ . TIA-1 ⁺ , granzyme-B ⁻ , perforin ⁻ .	Often TCR δ but may be TCR α/β , EBV ⁻ . Frequent isochromosome 7q. Usually aggressive clinical course.
Nonhepatosplenic γ/δ TCL	CD5 ⁻ , CD56 ⁺ , mostly CD57 ⁻ , TCR γ/δ . TIA-1 ⁺ , granzyme-B ⁺ , perforin ⁺ .	Skin, mucosal sites, and other extranodal locations. EBV often positive in mucosal and negative in cutaneous lymphoma.

Αγγειονοσοβλαστικό T – Λέμφωμα (AITL)

- Λεμφαδενικό περιφερικό T - λέμφωμα
- Σπάνιο αλλά επιθετικής μορφής T – λέμφωμα
- 13-24 % των PTCL
- Α:Γ 1:1
- Μέση ηλικία εμφάνισης 60 έτη
- Μέσος χρόνος επιβίωσης 1-3 έτη

Αγγειονοσοβλαστικό T – Λέμφωμα (AITL)

Κλινικά Χαρακτηριστικά

Γενικευμένη Λεμφαδενοπάθεια

Ηπατοσπληνομεγαλία

B – συμπτώματα

Δερματικές αλλοιώσεις

Εργαστηριακά Ευρήματα

Υπεργαμμασφαιριναιμία

Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία

Ηωσινοφιλία

Ιστολογικά Ευρήματα

Μικρά Λεμφοκύτταρα,

Ιστιοκύτταρα,

Ηωσινόφιλα

Πλασματοκύτταρα

Αγγειονοσοβλαστικό T – Λέμφωμα (AITL)

- Η μορφολογία του AITL είναι χαρακτηριστική αλλά ΟΧΙ μοναδική.
- Καθυστερήσεις στη διάγνωση λόγω αδυναμίας αξιολόγησης της μορφολογίας και της μοριακής ανάλυσης για T – κλωνικότητα.
- Η διάγνωση βασίζεται σε:
 - Ανοσοφαινότυπο
 - Ιστολογική Εξέταση
 - PCR T-Κλωνικότητα

Ανοσοφαινότυπος AITL

- Ωριμο CD4+ T – κύτταρο
CD2+ CD4+ CD5+
CD8- CD56-
CD3+dim ή CD3-
CD7+ ή CD7-
CD10+

- Έκτοπη έκφραση προσφέρει υψηλή ευαισθησία

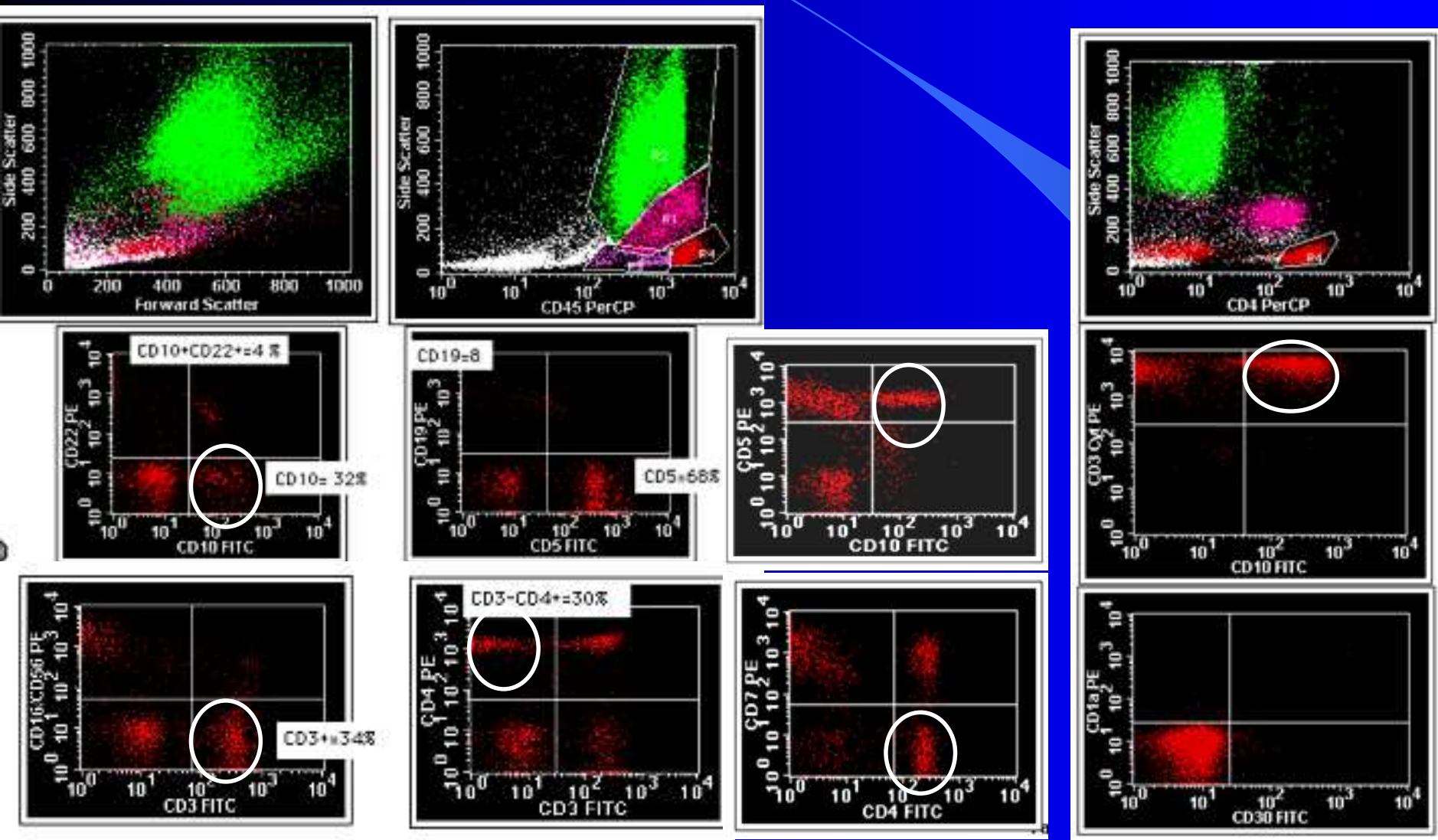
- Θα πρέπει να αξιολογείται το συνολικό pattern των αντιγόνων και όχι μεμονωμένων.

- Χαρακτηριστική έκφραση CD10 και απώλεια ενός ή περισσότερων T - δεικτών

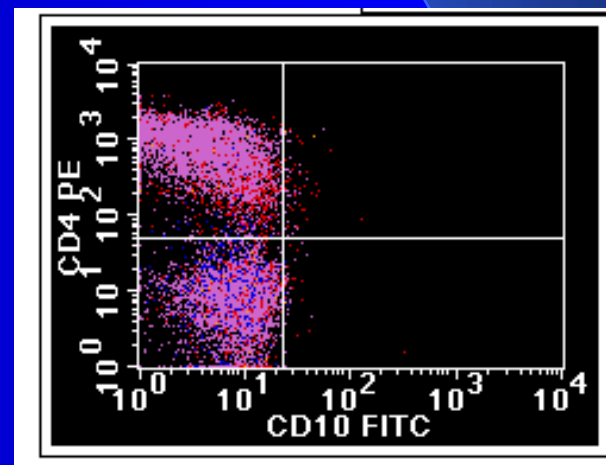
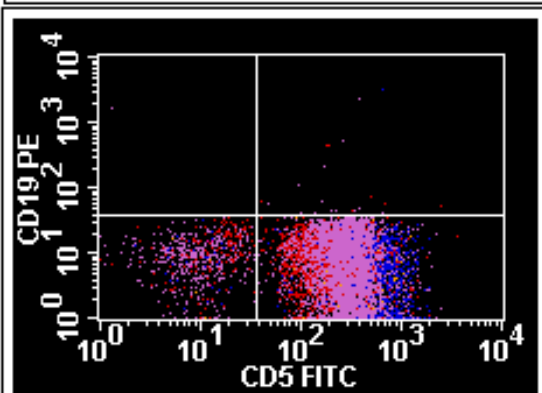
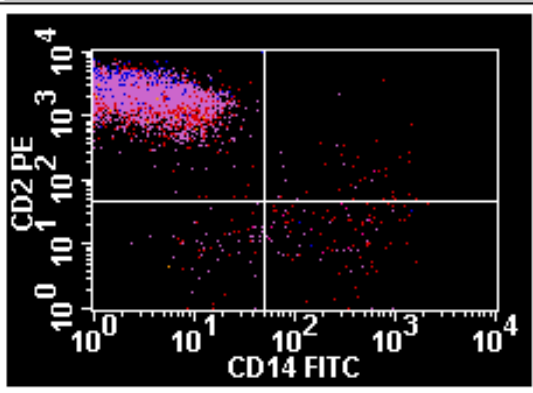
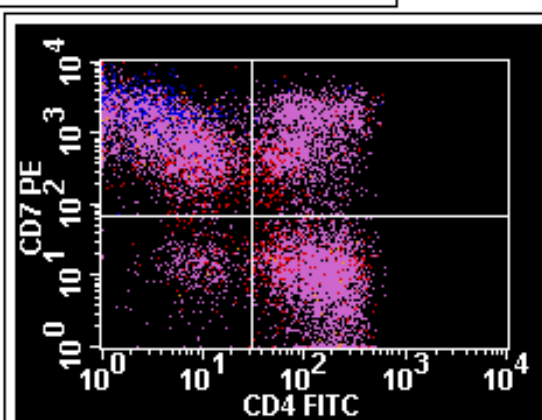
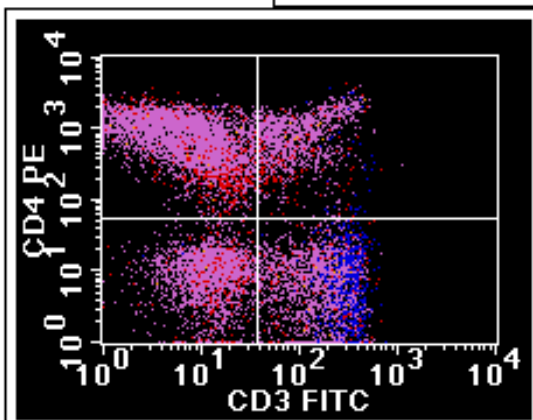
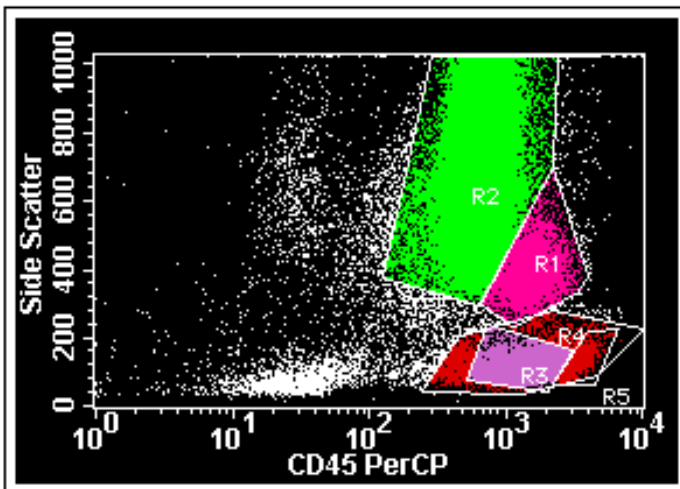
CD10 στο Αγγειονοσοβλαστικό (AITL)

- CD10 ως ειδικός δείκτης του AITL με την εξαίρεση ενός σπάνιου intrafollicular PTCL
- Ασαφείς εξηγήσεις για την έκφραση και την ποικιλία έκφρασης του σε διάφορες περιπτώσεις AITL
- Η έκφραση του CD10 στο AITL υποστηρίζει την προέλευση του λεμφώματος από follicular helper T cells (οζώδες B-NHL)
- Διακριτοί T – κλώνοι ανιχνεύονται αρκετά νωρίς πριν καν υπάρξει μορφολογική αλλοίωση.
- Η ανάλυση του CD10 πρέπει να γίνεται στο σύνολο των λεμφοκυττάρων και όχι μόνο στα CD3+ γιατί στις περιπτώσεις με μεγάλη απώλεια CD3- χάνεται η συνέκφραση του CD10

Ανοσοφαινότυπος AITL



Υποτροπή



Large Granular Lymphocyte Disorders (LGL)

LGL διαταραχές: φάσμα παθήσεων που προκύπτουν από την επέκταση

T → T-Cell LGL Leukemia

NK → Chronic Lymphoproliferative Disorders of NK cells

Aggressive NK-cell Leukemia

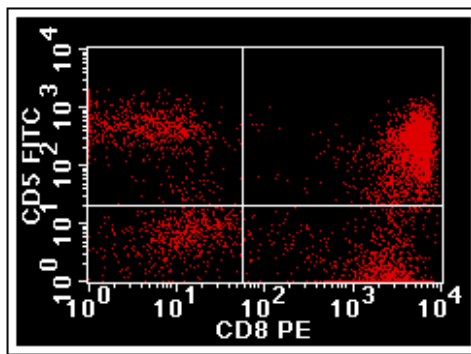
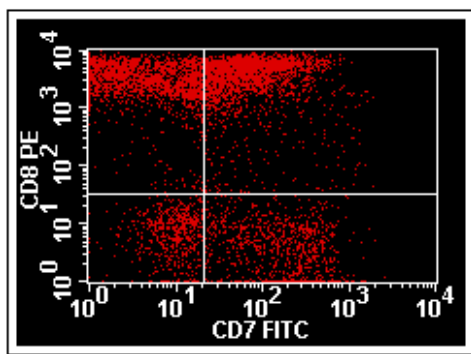
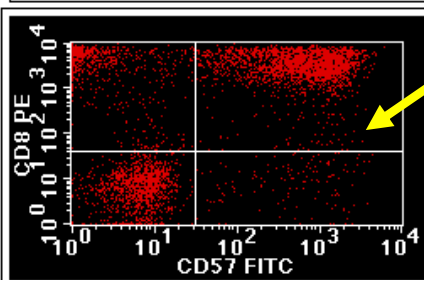
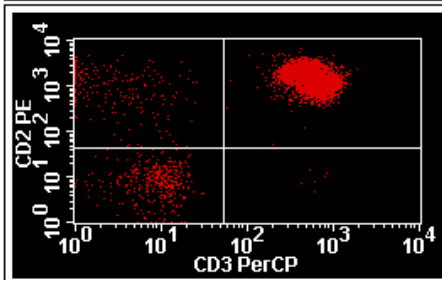
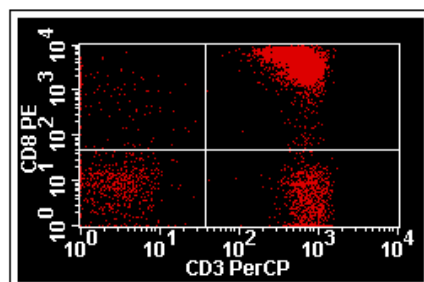
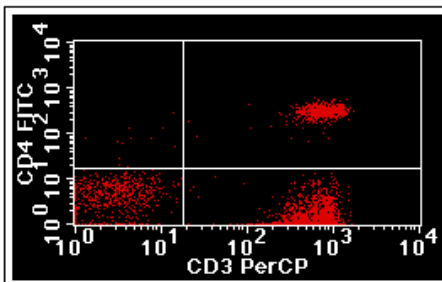
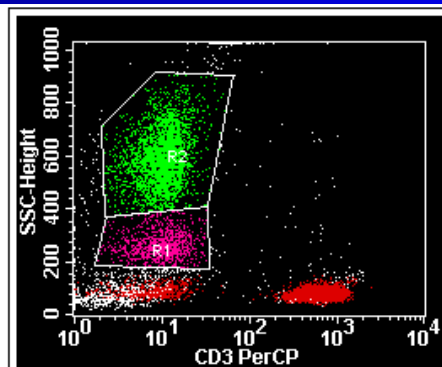
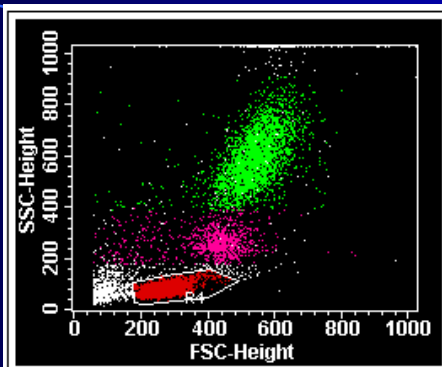
Large Granular Lymphocyte Disorders (LGL)

Παροδικές (<6 μήνες) επεκτάσεις

- Μόλυνση με ιούς π.χ EBV, HIV
- Μεταμόσχευση οργάνων
- Αυτοάνοσα νοσήματα
- Καρκίνο
- CD3+ και πολυκλωνικές

Χρόνιες (>6 μήνες) επεκτάσεις

- Κλωνικές
- Μετά από αλλογενή BMT
- Μετά από Rituximab



CD8+/CD57+
51% των
Λεμφοκυττάρων

HIV λοίμωξη!!

Large Granular Lymphocyte Disorders (LGL)

T- cell LGL λευχαιμίες

- TCRαβ+ LGL επέκταση των CD8+CD4-CD57+
- Σπανιότερα CD4+CD8-/CD8+dimCD57+
- Μειοψηφία TCRγδ+ LGL κλωνική επέκταση

NK-cell LGL λευχαιμίες

Επέκταση των CD3-TCR-CD16+CD56+

Large Granular Lymphocyte Disorders (LGL)

T- cell LGL λευχαιμίες

- 2-5% των T και NK κυτταρικών κακοηθειών
- Αύξηση των LGL στο ΠΑ > 6 μήνες
- Α:Γ 1:1 Μέση ηλικία εμφάνισης 60 έτη
- Συχνότερα σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα
- 1/3 ασυμπτωματικοί – Ουδετεροπενία
- Μέση επιβίωση > 10 χρόνια

NK-cell disorders

NK-cell Chronic Lymphoproliferative Disease

- Ασυμπτωματικοί ασθενείς
- Αύξηση των NK κυττάρων στο ΠΑ > 6 μήνες
- Μέση ηλικία εμφάνισης 60 έτη
- Α:Γ 1:1

Aggressive NK-cell LGL Leukaemia

- Επιθετική νόσος
- Συνδέεται με EBV λοίμωξη
- Λεμφοκυττάρωση, Ηπατοσπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, θρομβοπενία
- Εμφάνιση σε νεότερες ηλικίες 39 έτη

Large Granular Lymphocyte Disorders (LGL)

Αιτιολογία

- Αυτοαντιγόνο ή ιϊκό αντιγόνο?
- Μοριακό γεγονός?
- HTLVΙ και HTLVII – όχι σαφής ρόλος
- EBV στην παθογένεση της επιθετικής NK λευχαιμίας
- CMV στη σπάνια μορφή CD4+CD8- ή CD8dim LGL λευχαιμία

Large Granular Lymphocyte Disorders (LGL)

Διάγνωση

- Λεμφοκυττάρωση $2-20 \times 10^9/L$
- Κυκλοφορούντα LGL κύτταρα $> 0,5 \times 10^9/L$
- Κλινική κατάσταση
- Τεκμηρίωση κλωνικότητας T κυτταρικού πληθυσμού με PCR
- Χαρακτηριστικός ανοσοφαινότυπος
- TCRαβ κλωνικότητα με TCR Vb Repertoire kit?
- Μελέτη KIR υποδοχέων για την κλωνικότητα των NK κυττάρων?

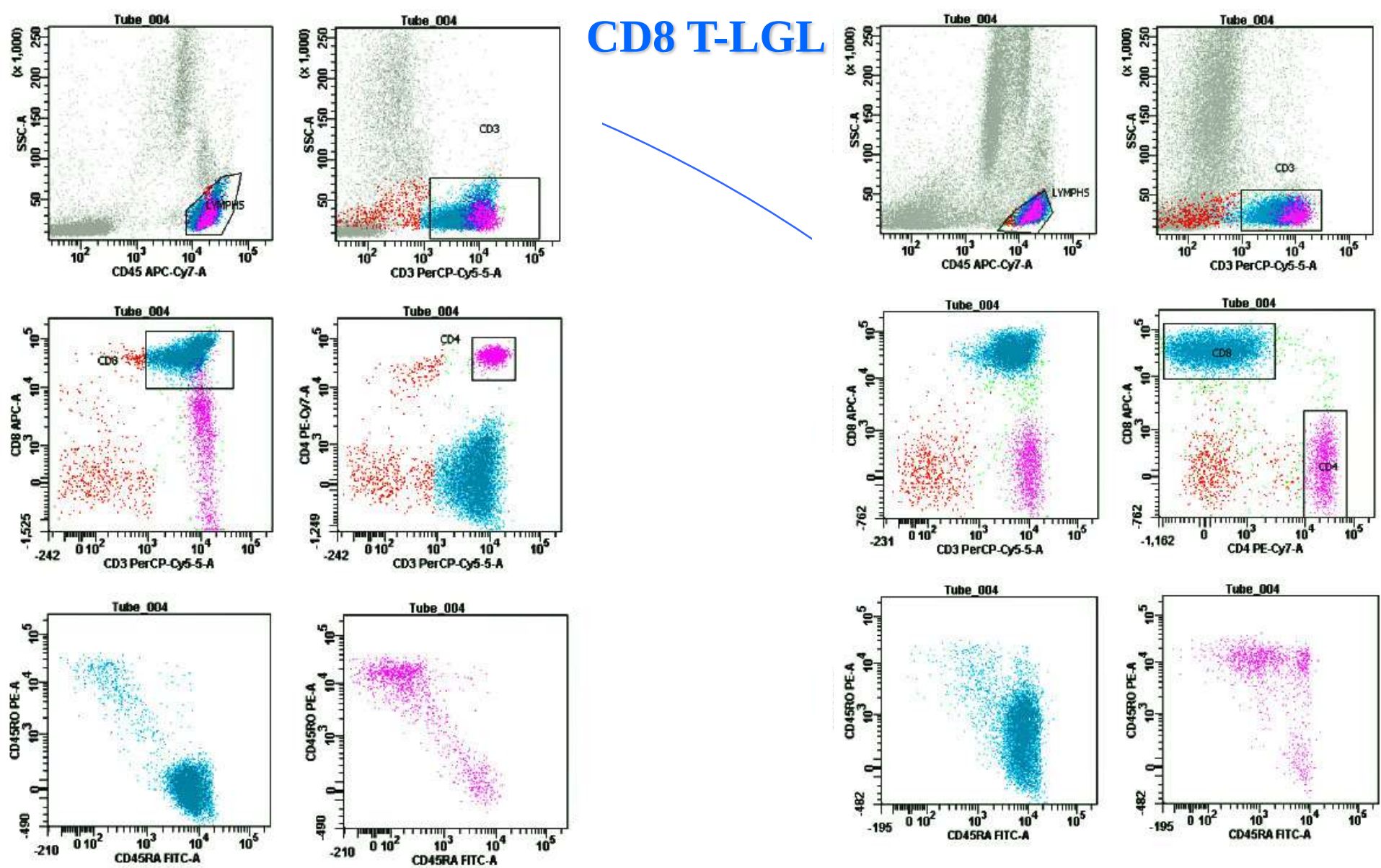
Ανοσοφαινότυπος T-LGL Λευχαιμίας

- CD2+ CD3+ CD8+ CD16+ CD57+
- CD5- CD7-
- CD56+ σπανίως συνδέεται με πιο επιθετική μορφή της νόσου
- Σπανίως CD4+ / CD8- ή CD8dim CD4- / CD8-

Ανοσοφαινότυπος NK - Λευχαιμίας

CD3- CD16+ CD56+

CD8 T-LGL



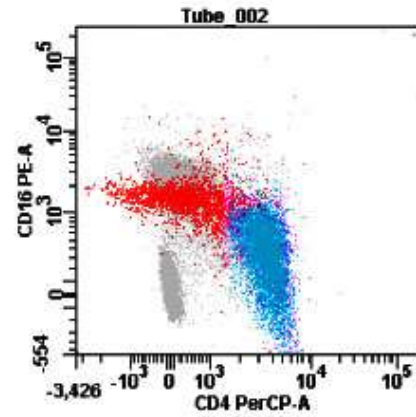
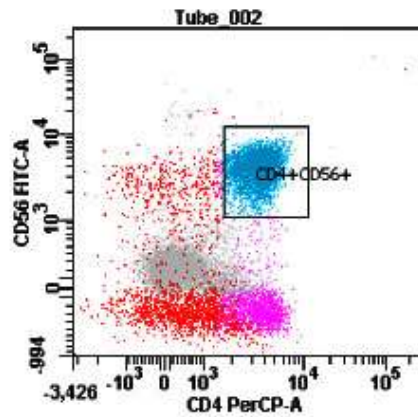
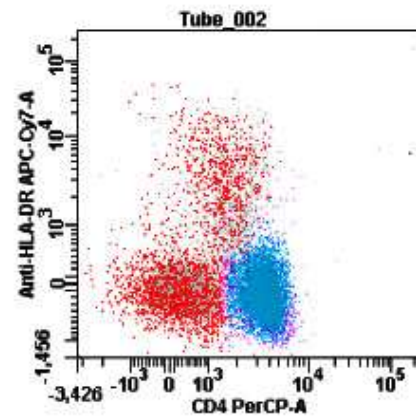
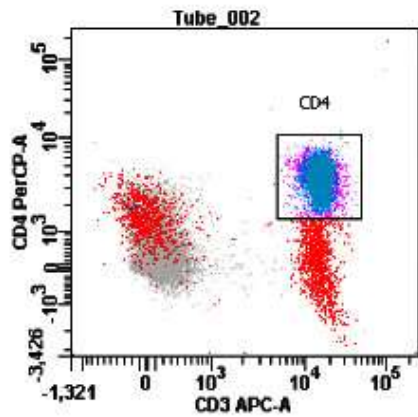
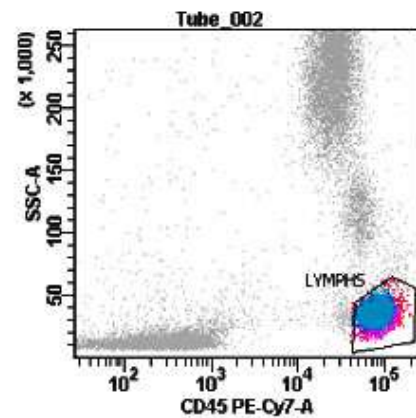
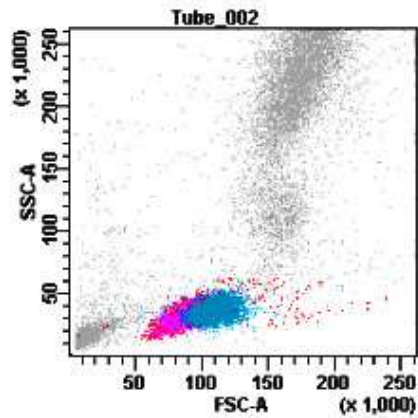
Tube: Tube_004

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	25,843	####	100.0
LYMPHS	10,283	39.8	39.8
CD3	8,573	93.1	37.0
CD8	8,452	82.2	32.7
CD4	1,319	12.8	5.1

Tube: Tube_004

Population	#Events	%Parent	%Total
ALL EVENTS	38,652	####	100.0
LYMPHS	9,580	24.8	24.8
CD3	8,929	93.2	23.1
CD8	7,589	79.2	19.6
CD4	1,185	12.4	3.1

CD4 T-LGL



Tube: Tube_001

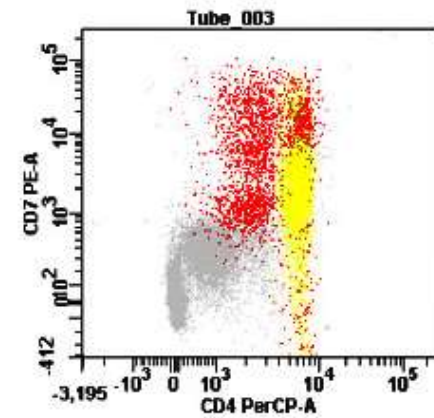
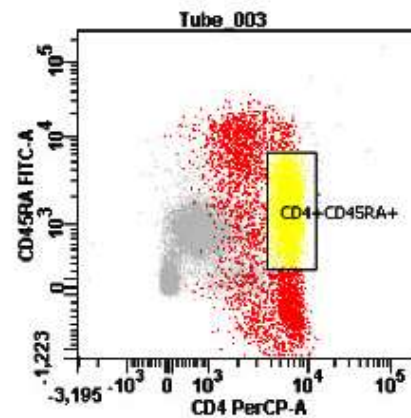
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	27,532	####	100.0
LYMPHS	8,390	30.5	30.5
CD4	6,485	77.3	23.6
CD8	1,009	12.0	3.7
CD4+CD57+	4,820	57.4	17.5

Tube: Tube_002

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	25,636	####	100.0
LYMPHS	8,229	32.1	32.1
CD4	6,355	77.2	24.8
CD4+CD56+	4,861	59.1	19.0

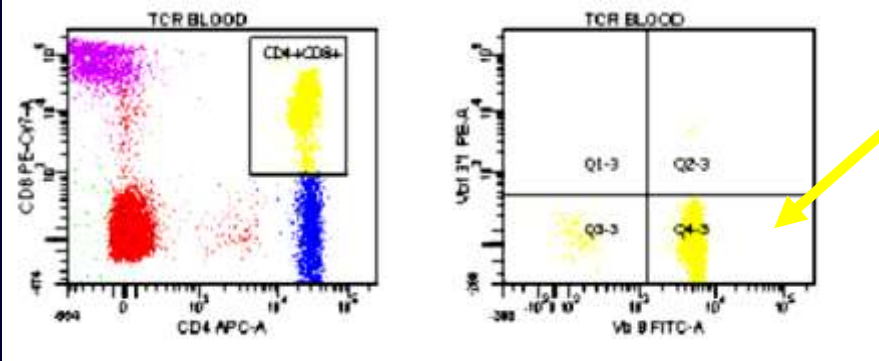
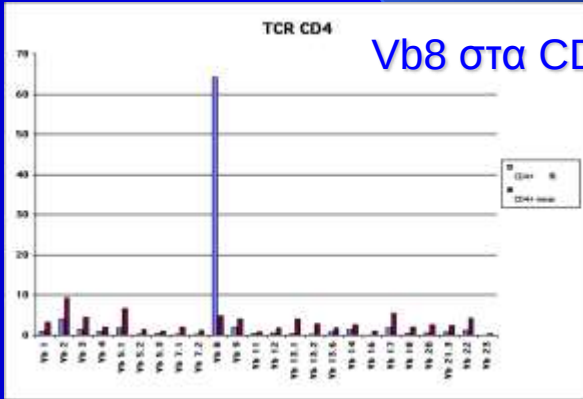
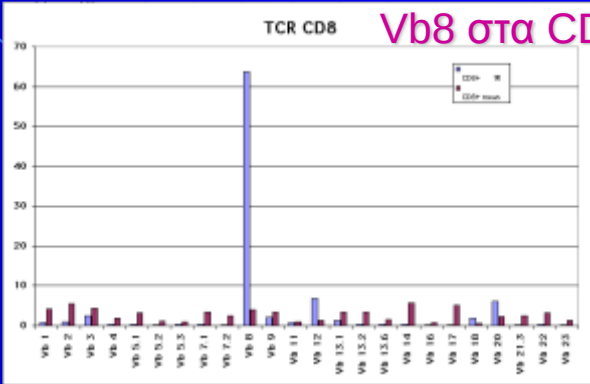
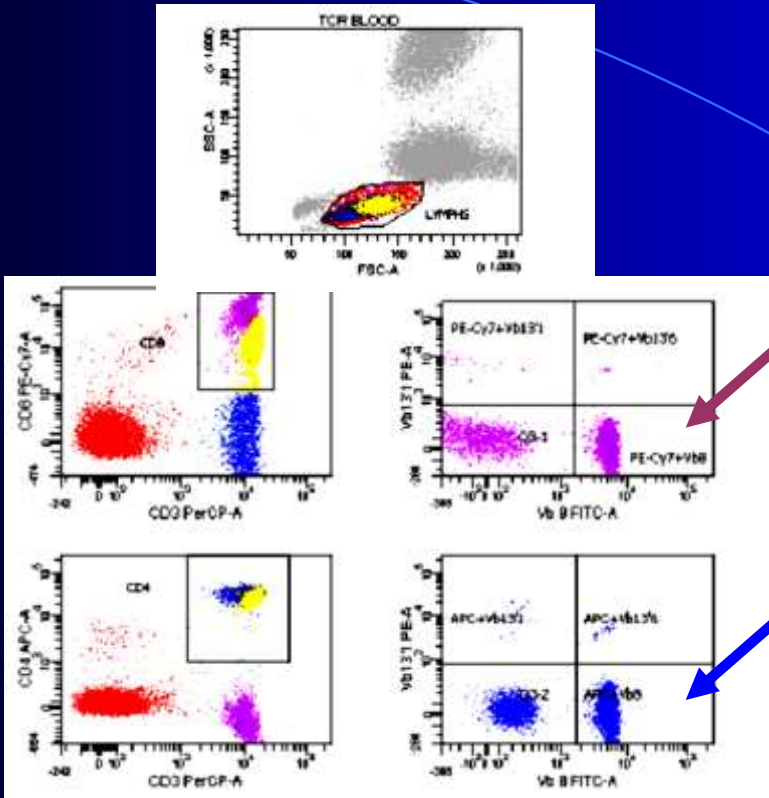
Tube: Tube_003

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	23,324	####	100.0
LYMPHS	7,231	31.0	31.0
CD4+CD45RA+	4,359	60.3	18.7



Μελέτη των Vb επιτόπων του TCRαβ με πενταπλό φθορισμό

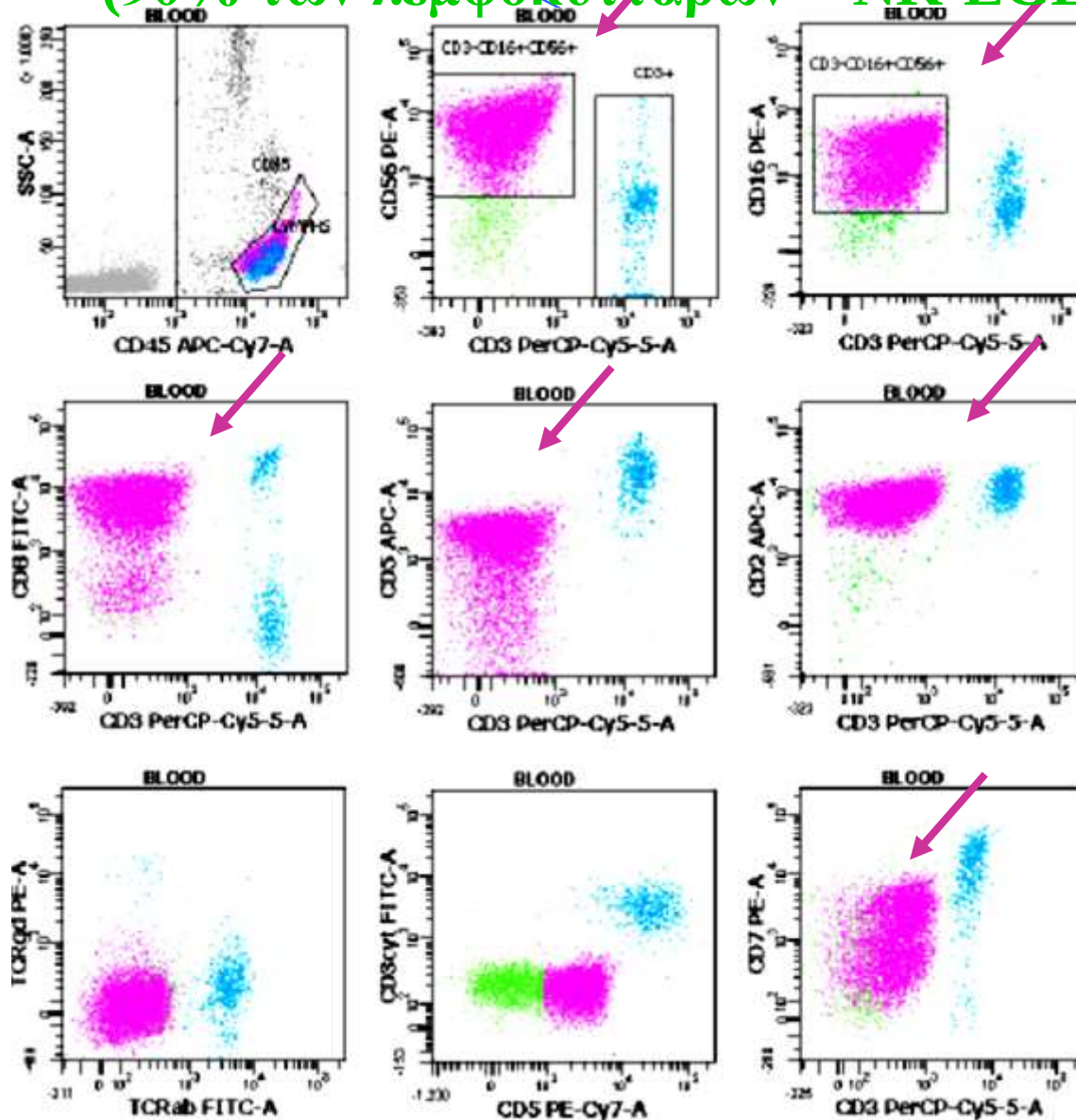
Μεγάλη αύξηση του Vb8



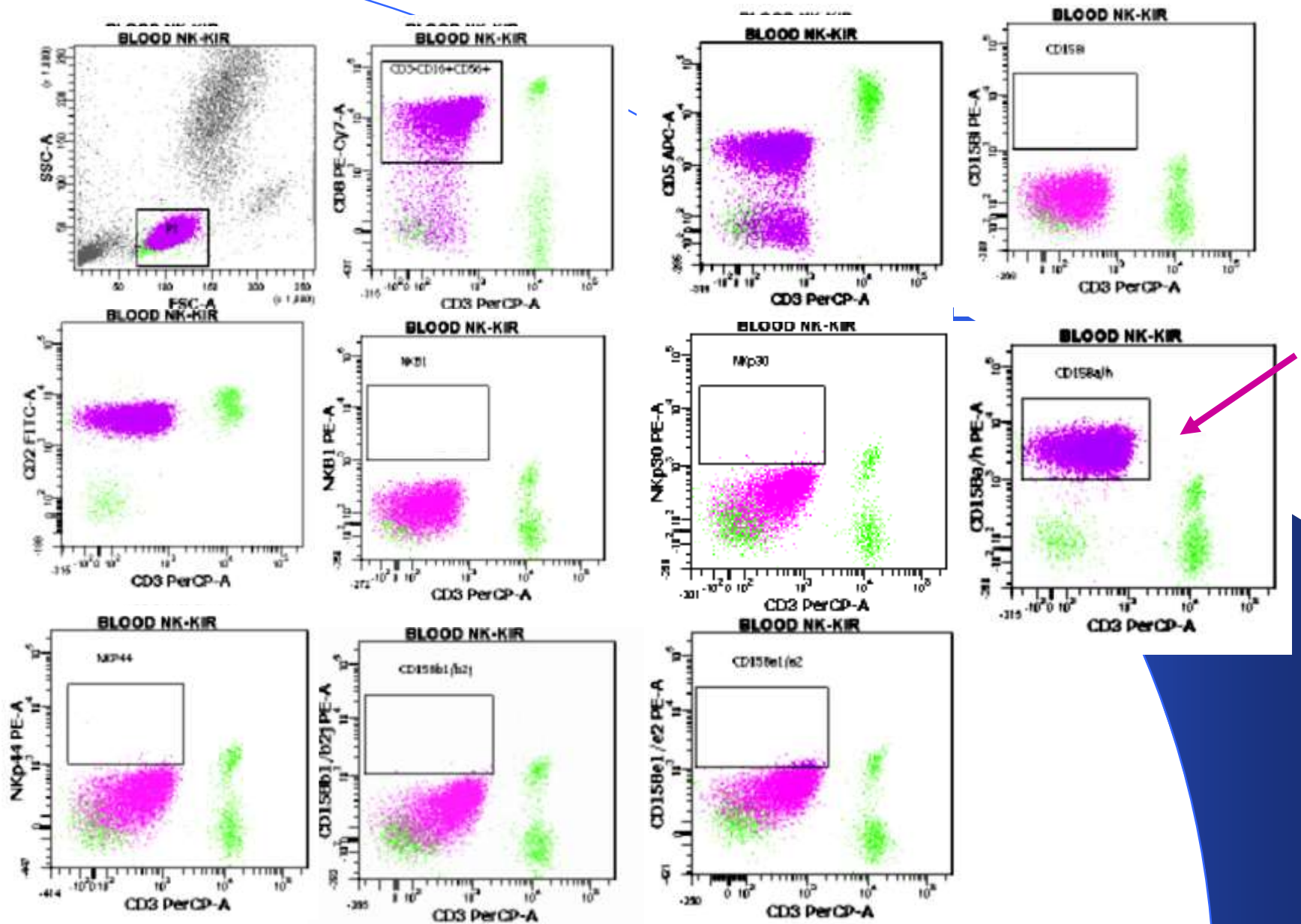
Vb8 στα CD4+CD8+ = 92%

NK-LGL

CD2+ CD56+ CD16+ CD8+ CD7+dim sCD3- cCD3- TCR $\alpha\beta$ - CD5+dim
(90% των λεμφοκυττάρων = NK-LGL)



KIR- ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ



SEZARY SYNDROME

Τα δερματικά Τ – κυτταρικά λεμφώματα (CTCLs) είναι ένα ετερογενές γκρουπ από λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές τα οποία προκαλούνται από κλωνικά Τ κύτταρα που εισβάλλουν στο δέρμα

Mycosis Fungoides (MF)

- Το πιο καλά μελετημένο T δερματικό λέμφωμα
- 1% από όλα τα non-Hodgkin λεμφώματα
- 0,36-0,9 / 100.000 άτομα το χρόνο
- Μέση ηλικία εμφάνισης 57 χρόνια
- Άνδρες :Γυναίκες 2:1

Sezary Syndrome (SS)

*“...is the leukemic form of the disease (MF) in which erythroderma is accompanied by measurable blood involvement by malignant lymphocytes with hyperconvoluted, cerebriform nuclei known as **Sezary cells**.”*

Sezary Syndrome (SS)

Διάγνωση

- Βιοψία Δέρματος
- Κλινική Εξέταση
- Μέτρηση των «άτυπων» T - λεμφοκυττάρων
- Μέτρηση LDH
- CT Scan
- PET Scan

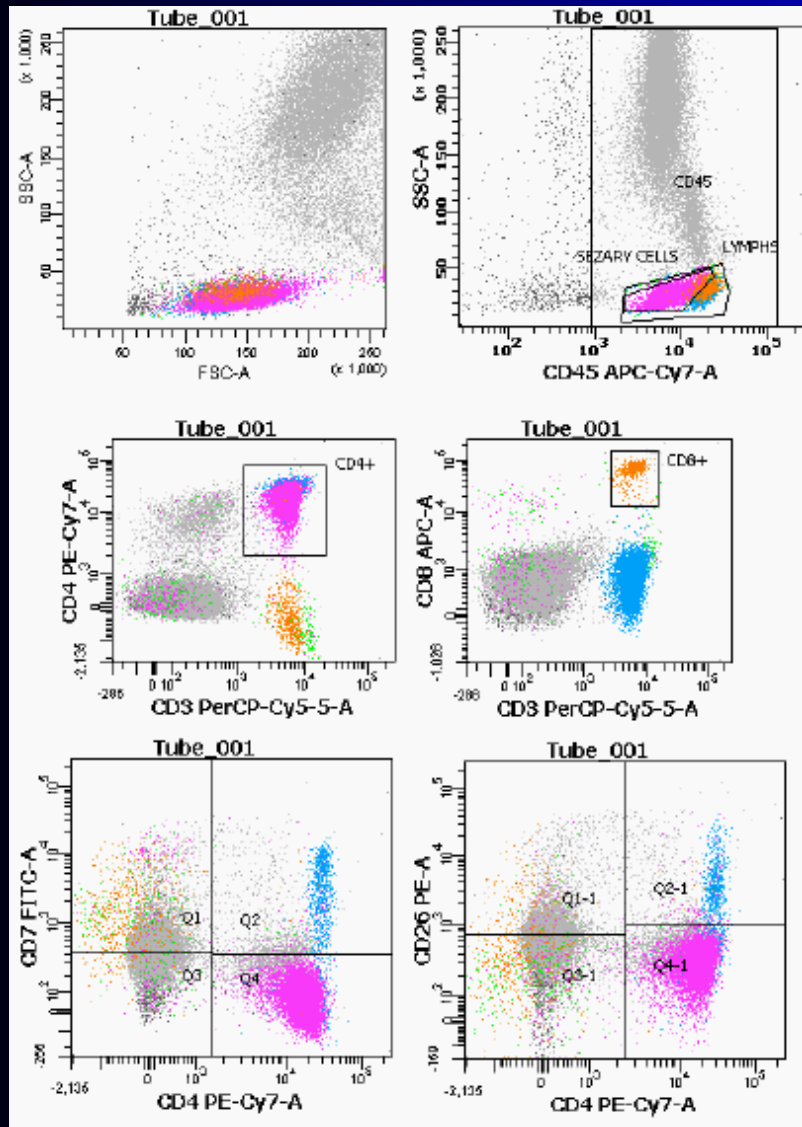
Διάγνωση

Ανοσοφαινότυπος *CD4+CD7-CD26-
T Cell Clonality*

Μοριακές Τεχνικές *T Cell Clonality
TCR gene rearrangements*

Κυτταρογενετική *Δεν υπάρχει συγκεκριμένο
συγκεκριμένο pattern
χρωμοσωμικών ανωμαλίων*

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ MF/SEZARY



CD3+/CD4+ CD7- CD26-
80% των Λεμφοκυττάρων

Μελέτες δείχνουν ότι η ΚΡ είναι η πιο ενδεδειγμένη μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτική μέτρηση του φορτίου νόσου στο αίμα και βοηθάει στην σταδιοποίηση και παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα στην ανίχνευση των παθολογικών κυττάρων αυξάνεται με την ταυτόχρονη ανίχνευση του παθολογικού V β επιτόπου πάνω στον πληθυσμό που ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηρίζει το νόσημα στην διάγνωση

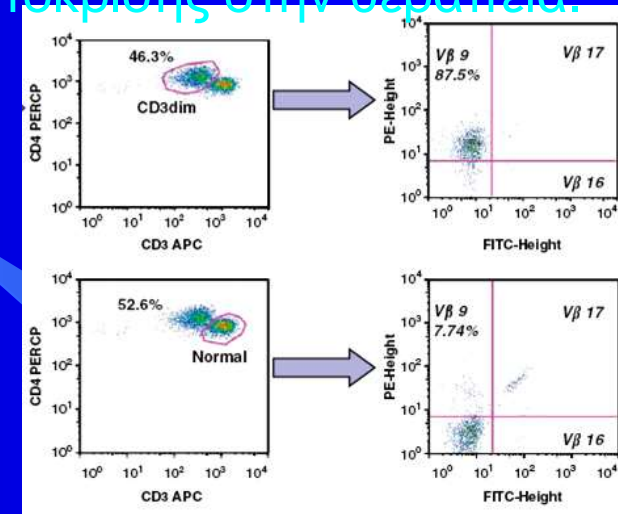
Borowitz M et.al, 2011,

Συσχέτιση της % CD4+CD7- και % CD4+CD26- με την πρόγνωση. Πιο ισχυρή συσχέτιση έχει το % CD4+CD26- και μάλιστα σε ποσοστά μικρότερα (15%) από τα προτεινόμενα από το ISCL/EORTC.

Η απώλεια των δεικτών CD7 και CD26 δεν είναι ειδική για το νόσημα γιατί παρατηρείται και σε άλλα T λεμφώματα καθώς και σε καλοήθεις καταστάσεις.

Συχνά παρατηρούνται άτυπες εκφράσεις άλλων T δεικτών όπως CD2, CD3, CD4 ενώ σπανιότερα ο ανοσοφαινότυπος της διάγνωσης μπορεί να αλλάξει.

Προσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έκτοπη έκφραση ενός KIR υποδοχέα, του CD158k (KIR3/DL2) στα παθολογικά CD4 αποτελεί ειδικό δείκτη που μπορεί να χρησιμεύσει στην διάγνωση και παρακολούθηση του νοσήματος



Αναπλαστικό Τ Λέμφωμα

Anaplastic Large Cell Lymphoma

(ALCL)

- 3 διαφορετικές οντότητες από μοριακά και κλινικά κριτήρια
- Έντονη έκφραση της κυτταροκίνης CD30
- Διαφοροποιούνται από την έκφραση της ALK η οποία προκαλείται από τη χρωμοσωμική μετάθεση t(2;5)

Αναπλαστικό Τ Λέμφωμα *Anaplastic Large Cell Lymphoma* *(ALCL)*

ALK+ ALCL

νεαρούς άντρες
καλής πρόγνωσης

ALK- ALCL

μεγαλύτερους ασθενείς
κακής πρόγνωσης
άνδρες και γυναίκες

Δερματικό ALCL
(ALK-)

διαφορετικά κλινικά χαρακ.
de novo στο δέρμα
μέση ηλικία εμφάνισης 60 έτη

Αναπλαστικό Τ Λέμφωμα (ALCL) Ανοσοφαινότυπος

CD30+

T- cell φαινότυπος

90% των περιπτώσεων

CD3+

TCR gene rearrangements

NK- cell φαινότυπος

10% των περιπτώσεων

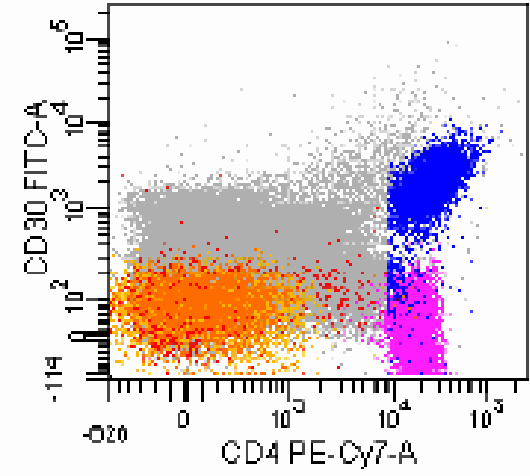
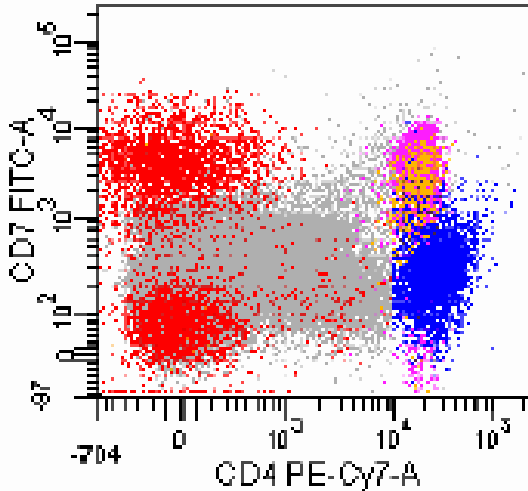
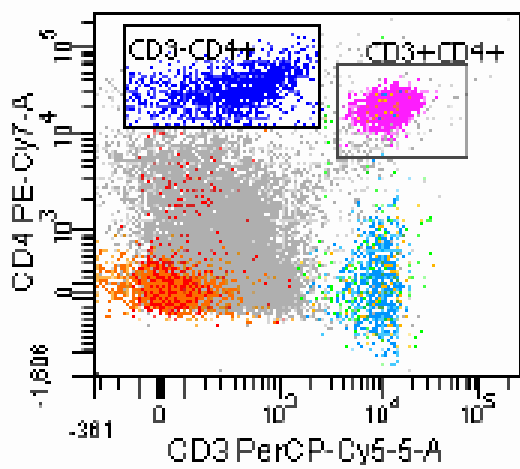
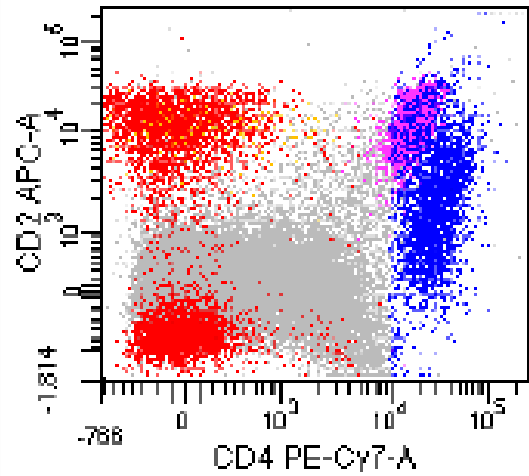
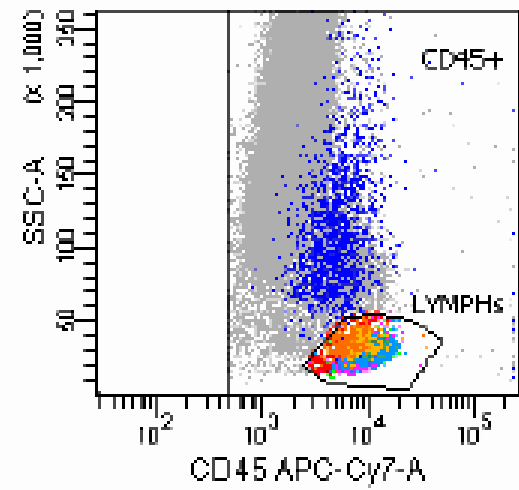
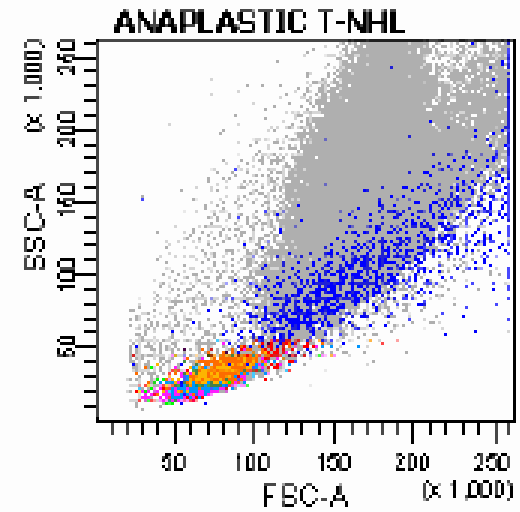
CD3-, TCR-

CD56+

B- cell φαινότυπος

Εξαιρετικά σπάνιο

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟΥ CD30+ T-NHL



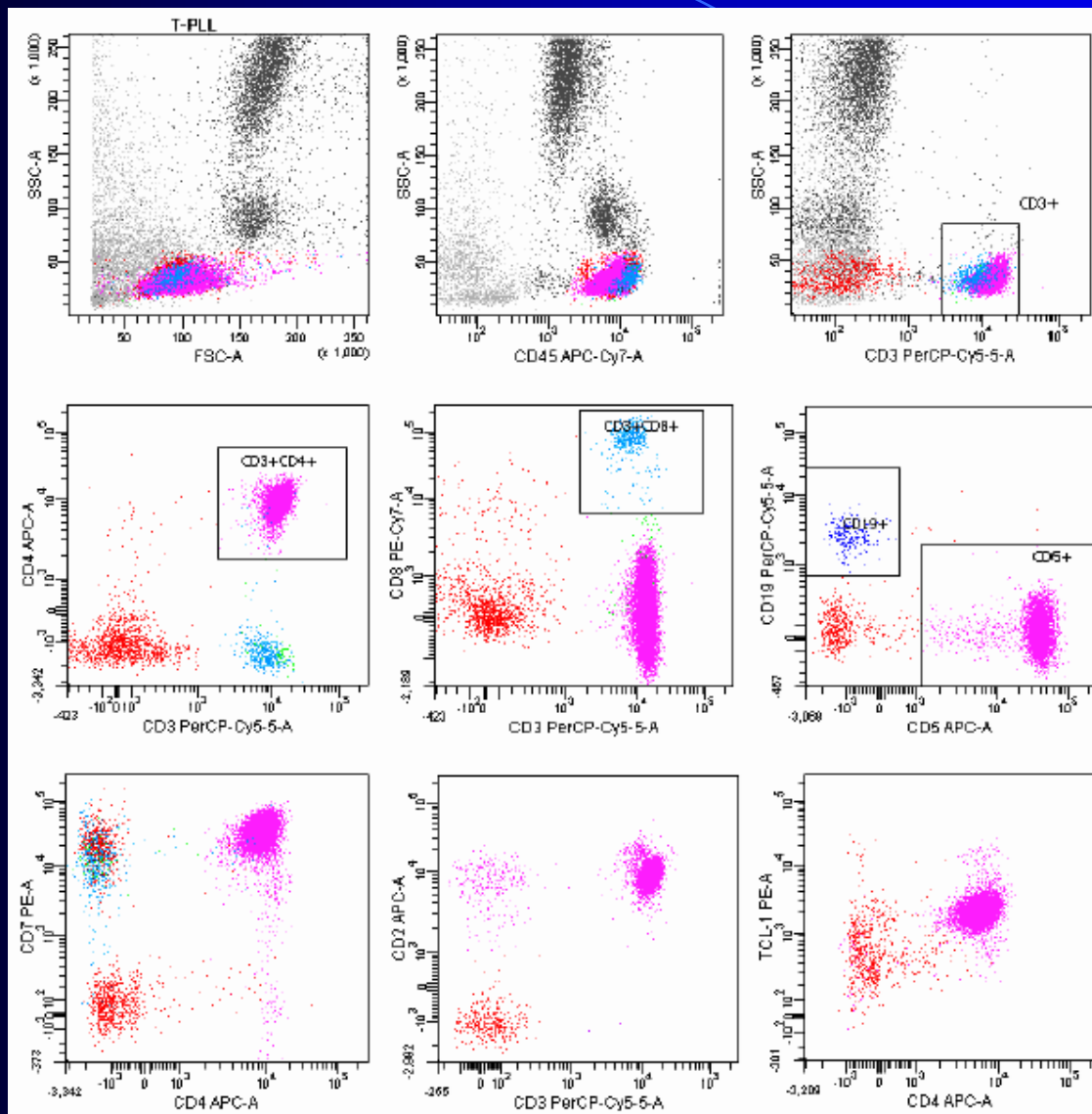
T - Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία (T-PLL)

Ανοσοφαινότυπος

- >80 % T-PLL ασθενείς έχουν
inv(14) (q11;q32)
t(14;14) (q11;q32)
περιλαμβάνουν TCL1 gene και TCRα/δ
locus → αύξηση TCL1

- Ανοσοφαινότυπος
CD4+ CD7+
TCL1+

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ T-PLL



CD3+ CD4+ = 68%
CD3+ CD8+ = 12%

TCL-1+

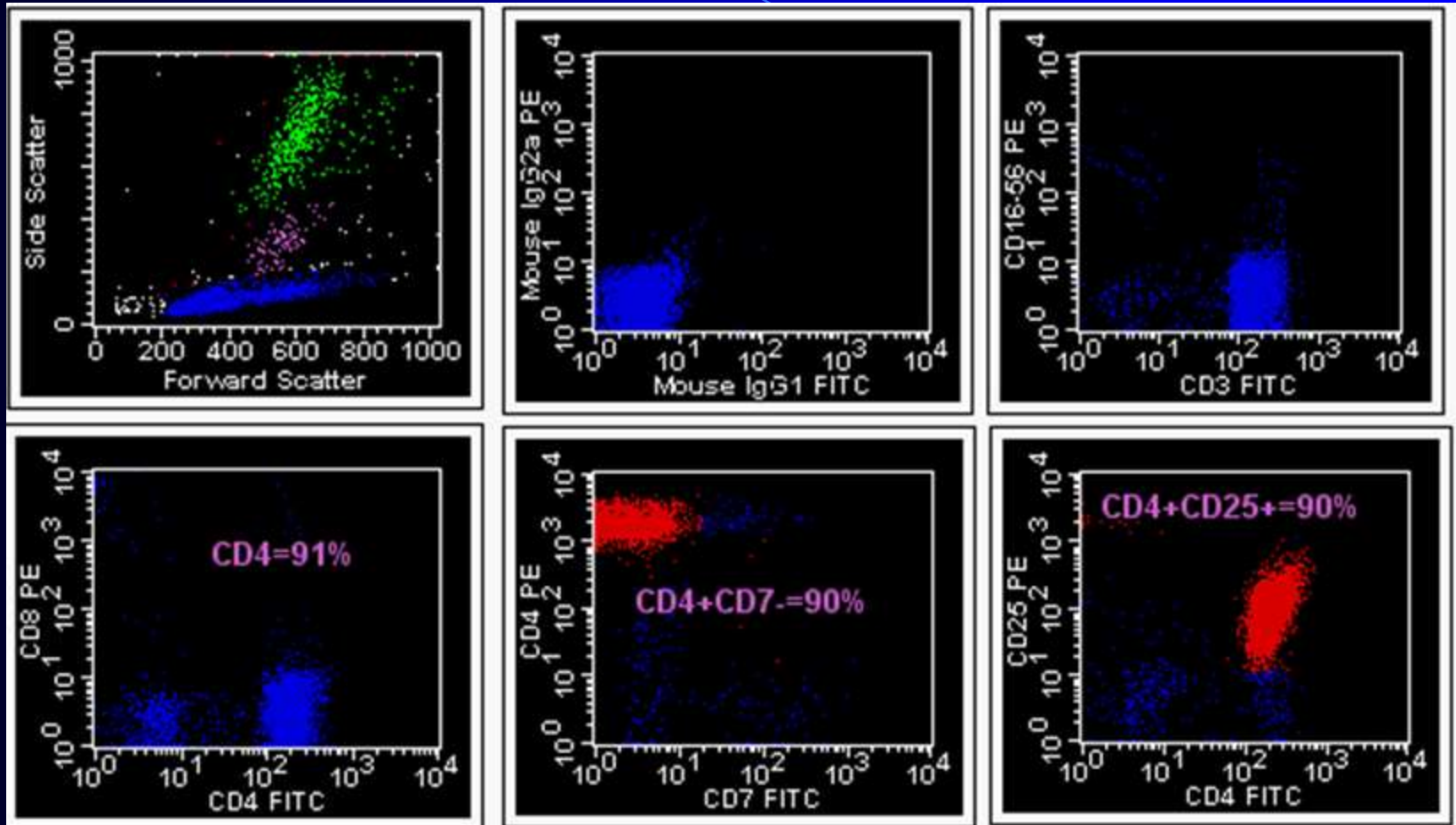
Adult T-cell Leukemia (ATLL)

Ανοσοφαινότυπος

- Human T – cell Leukemia virus (HTLV-1)

- Ανοσοφαινότυπος
CD4+ CD7- CD8-
CD25+ bright

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ATLΛ(HTLV-1+)



T – Λεμφώματα - Ανοσοφαινότυπος

Η εμπειρία ενός κέντρου

- Αναλύουμε όλα τα κύτταρα και δε δουλεύουμε μόνο στην περιοχή των λεμφοκυττάρων
 - π.χ στο Αναπλαστικό Λέμφωμα τα λεμφωματικά κύτταρα εισχωρούν στην περιοχή των μονοκυττάρων – με το συνδυασμό του CD14 ξεχωρίζουμε τα παθολογικά
 - π.χ στο Αγγειονοσοβλαστικό λέμφωμα θα χάσουμε τον παθολογικό πληθυσμό αν αναλύσουμε μόνο τα CD3+ κύτταρα

T – Λεμφώματα - Ανοσοφαινότυπος

Η εμπειρία ενός κέντρου

● Ειδικός Ανοσοφαινότυπος

π.χ στο Αναπλαστικό Λέμφωμα ο δείκτης CD30 είναι πολύ εξειδικευμένος αλλά εκφράζεται και σε κύτταρα Hodgkin και Reed **ΟΠΟΤΕ** χρησιμοποιούμε **ΟΛΟΥΣ** τους ειδικούς δείκτες π.χ ALK αλλά τα κύτταρα Hodgkin είναι πάντα ALK-

● Αξιολογούμε όλους τους δείκτες

π.χ για την αναγνώριση των NK κυττάρων είναι απαραίτητη η χρήση και των 2 δεικτών CD56 και CD16

● Άθροισμα των T κυτταρικών δεικτών

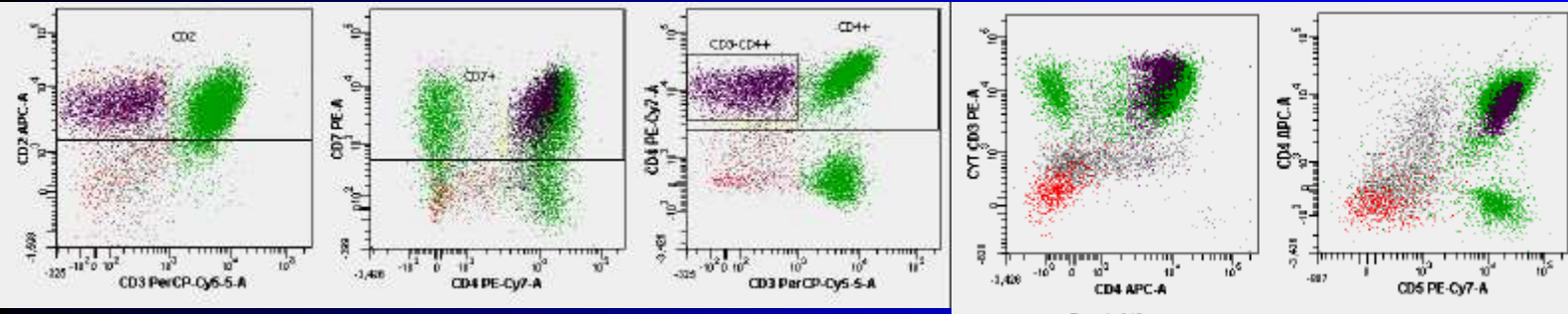
● Αναζήτηση μη φυσιολογικής έκφρασης αντιγόνων

● Η ανεύρεση κλωνικού πληθυσμού **ΔΕΝ** τεκμηριώνει πάντα τη διάγνωση T-NHL

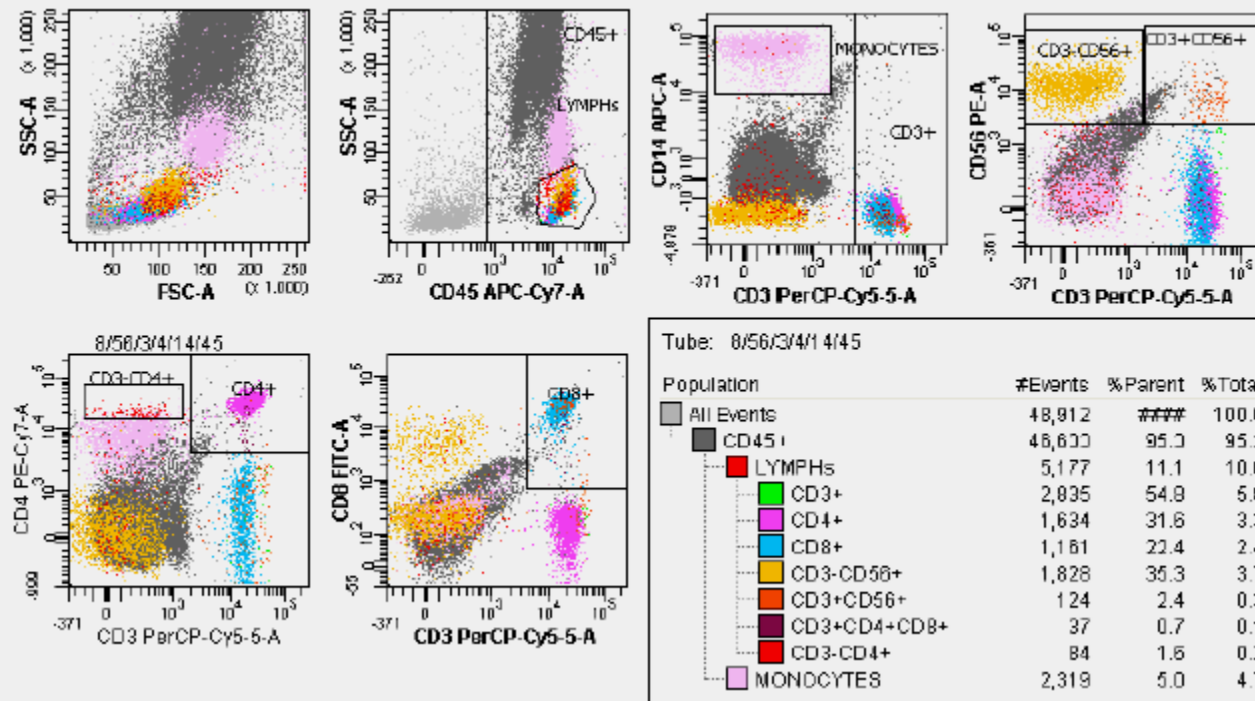
Ανίχνευση ελαχίστης υπολεμματικής νόσου (MRD) στα T λεμφώματα

- Απαραίτητη η γνώση του ανοσοφαινότυπου της διάγνωσης
- Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπάρχουν ειδικοί δείκτες που να επιτρέπουν την αναγνώριση μικρών παθολογικών πληθυσμών που μπορεί να βρίσκονται ανάμεσα σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα.
- Ακόμα και όταν εκφράζονται στην διάγνωση ειδικοί δείκτες όπως το CD10 η έκφραση τους μπορεί να χαθεί μετά την θεραπεία.
- Η δυνατότητα ταυτόχρονης αναζήτησης του επικρατούντος Vb επιτόπου στον συγκεκριμένο παθολογικό πληθυσμό που είχε βρεθεί στην διάγνωση αυξάνει την ευαισθησία ανίχνευσης MRD.
- Μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με την χρησιμοποίηση των νέων δεικτών (CD158k , ICOS, CCR5, PD-1) που χαρακτηρίζουν κάποια T λεμφώματα είναι απαραίτητες για την αξιολόγηση της χρησιμότητάς τους στην ανίχνευση MRD.

sCD3- cytCD3+
CD4+
CD5+CD2+CD7+

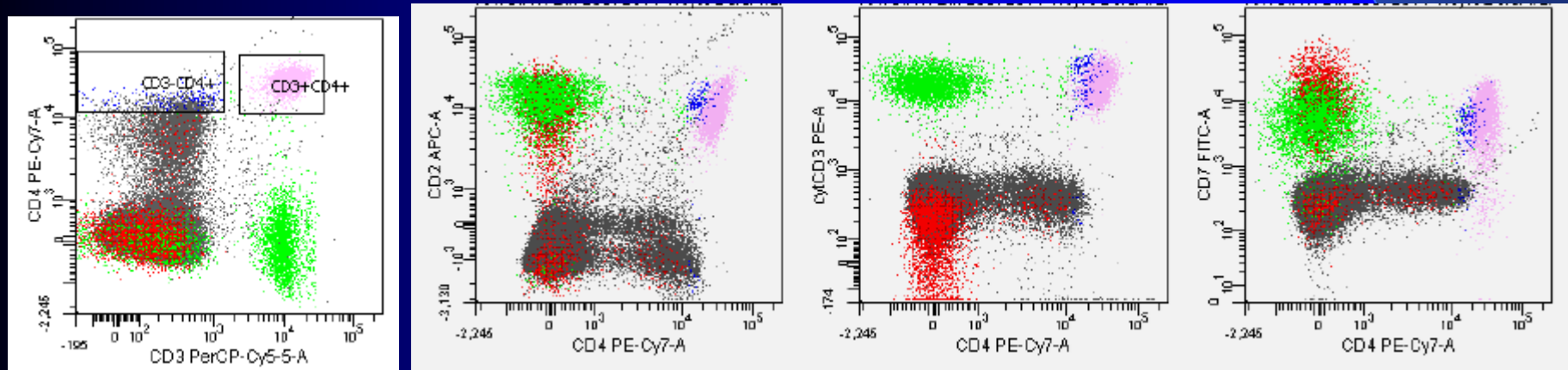


MRD

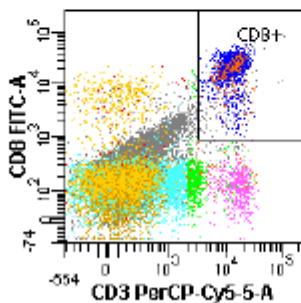
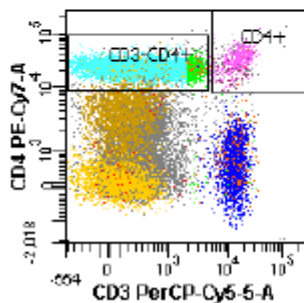
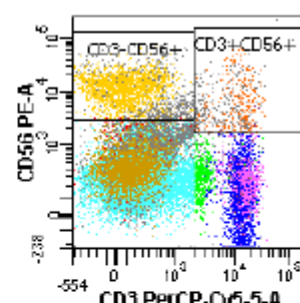
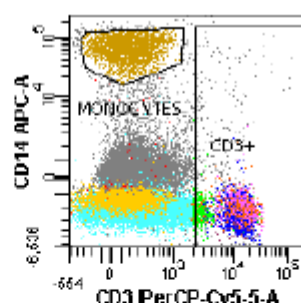
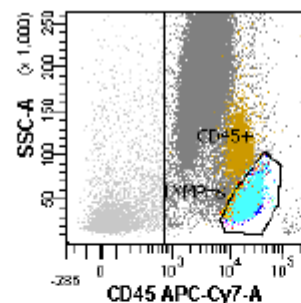
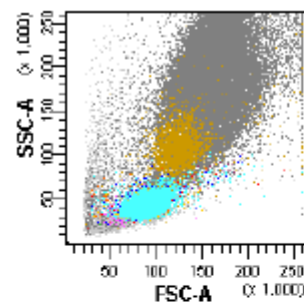


sCD3- cytCD3+
CD4+ CD2+CD7+

MRD = 1% στα λεμφοκ.
0,2% στα CD45+

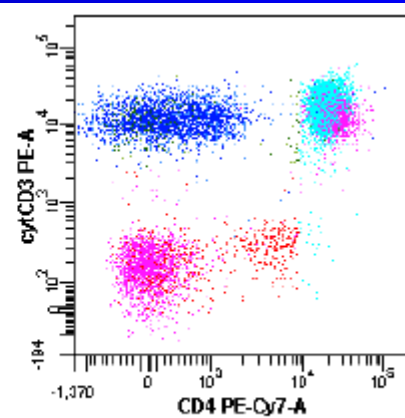
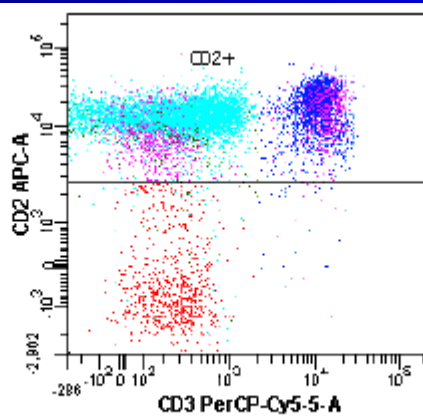
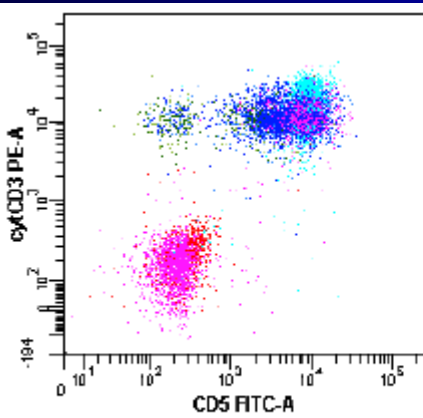


ΥΠΟΤΡΟΠΗ



Tube: 0/56/3/4/1 4/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	62,213	###	100.0
CD45+	48,087	92.1	92.1
LYMPHS	10,000	20.8	19.2
CD3+	3,323	33.2	6.4
CD4+	676	6.8	1.1
CD8+	2,156	21.5	4.1
CD3-CD56+	1,681	16.8	3.2
CD3+CD56+	262	2.6	0.5
CD3+CD4+CD8+	57	0.6	0.1
CD3-CD4+	5,270	52.7	10.1
MONOCYTES	2,370	4.9	4.5



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διάγνωση των T λεμφωμάτων βασίζεται στον συνδυασμό των κλινικών πληροφοριών , της μορφολογίας , της ανοσοιστοχημείας , της μοριακής μελέτης , του καρυότυπου και του ανοσοφαινότυπου.

Η αναγνώριση των ειδικών ανοσοφαινοτυπικών προφίλ που χαρακτηρίζουν τα T λεμφώματα συμβάλλει στην έγκαιρη και σωστή διάγνωση τους, στην ταξινόμηση τους, στην πρόγνωση και στην παρακολούθηση τους.

“Από τις κατευθυντήριες γραμμές στην Ελληνική πραγματικότητα...”

● Έχουμε την πολυτέλεια σήμερα να βάζουμε ένα πάνελ μονοκλωνικών αντισωμάτων με όλους αυτούς τους πολλούς και εξειδικευμένους δείκτες?

ΟΧΙ

● Ξεκινάμε λοιπόν με ένα πάνελ βασικών T, B, NK δεικτών καθώς και κάποιων μονοκυτταρικών και μυελικών δεικτών

● Κάνουμε προσεκτική ανάλυση όλων των κυττάρων για τυχόν παθολογικό πληθυσμό

● Και προσθέτουμε δείκτες αν χρειαστεί!!!