

ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ SPECIAL ARTICLE

Συνδυασμός ανοσοφαινοτυπικής τυποποίησης και μοριακών τεχνικών στη διάγνωση των οξείων λευχαιμιών

Σχεδόν αμέσως μετά τη δημοσίευση των French-American-British (FAB) κριτηρίων διάγνωσης των οξείων μυελογενών λευχαιμιών (ΟΜΛ) και των οξείων λεμφοβλαστικών λευχαιμιών (ΟΛΛ), κατέστη σαφές ότι η κυτταρομορφολογία και η κυτταροχημεία δεν επαρκούν για να καλύψουν διαγνωστικά όλες τις περιπτώσεις. Το 1995 προτάθηκε από την European Group for the Immunological classification of Leukaemias (EGIL) ένα μοντέλο ανοσοφαινοτυπικής ταξινόμησης των οξείων λευχαιμιών (ΟΛ). Σχεδόν αμέσως, μετά την παρουσίαση του συγκεκριμένου μοντέλου ανοσοφαινοτυπικής ταξινόμησης των ΟΛ, έγιναν προσπάθειες για την ανάδειξη συσχετίσεων ανοσοφαινοτυπικών δεικτών με τη FAB ταξινόμηση και τα ευρήματα της κυτταρογενετικής μελέτης. Στις ταξινομήσεις των ΟΛ από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) (2001 και 2008), εκτός από τα ευρήματα της κυτταρομορφολογίας και της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης, σημαντικό ρόλο απέκτησαν και τα ευρήματα της κυτταρογενετικής και της μοριακής βιολογίας. Στην παρούσα ανασκόπηση, η οποία θα βασιστεί στην πρόσφατα αναθεωρημένη (2008) από τον WHO ταξινόμηση των ΟΛ, αναλύοντας τα δεδομένα των υποκατηγοριών των ΟΜΛ και των Β-ΟΛΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, θα παρουσιαστούν τα νεότερα δεδομένα αναφορικά με την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ αυτών των κυτταρογενετικών ανωμαλιών και συγκεκριμένων ανοσοφαινοτυπικών δεικτών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σχεδόν αμέσως μετά τη δημοσίευση των French-American-British (FAB) κριτηρίων διάγνωσης των οξείων μυελογενών λευχαιμιών (ΟΜΛ) και των οξείων λεμφοβλαστικών λευχαιμιών (ΟΛΛ), κατέστη σαφές ότι η κυτταρομορφολογία και η κυτταροχημεία δεν επαρκούν για να καλύψουν όλες τις περιπτώσεις οξείων λευχαιμιών (ΟΛ). Έτσι, στην αρχή, με τη βοήθεια της ανοσοφαινοτυπικής τυποποίησης, ορίστηκαν και προστέθηκαν στη FAB η ΟΜ₇ και η ΟΜ₆.^{1,2} Στη συνέχεια, το 1995 προτάθηκε από την European Group for the Immunological classification of Leukaemias (EGIL) ένα μοντέλο ανοσοφαινοτυπικής ταξινόμησης των ΟΛ, στο οποίο βρήκαν θέση τόσο η αδιαφοροποίητη (acute undifferentiated leukemia, AUL) όσο και η διφαινοτυπική (biphenotypic acute leukemia, BAL) ΟΛ.³⁻⁵ Η επισήμανση ότι η ανοσοφαινοτυπική τυποποίηση των ΟΛ διεκπεριώνεται στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (ΚΡ), καθώς και η απαρίθμηση των πλεονεκτημάτων της, μάλλον περιττεύουν. Τέλος, το 2001 στην πρώτη ταξινόμηση των ΟΛ από τον

Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), εκτός από τα δεδομένα της κυτταρομορφολογίας και της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης, σημαντικό ρόλο απέκτησαν η κυτταρογενετική και η μοριακή βιολογία.⁶ Η παρούσα ανασκόπηση θα στηριχθεί στην πρόσφατα αναθεωρημένη (2008) από τον WHO ταξινόμηση των ΟΛ.

2. ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Μετά την παρουσίαση του πρώτου μοντέλου ανοσοφαινοτυπικής ταξινόμησης των ΟΜΛ από την EGIL (πίν. 1), έγιναν προσπάθειες για την ανάδειξη συσχετίσεων ανοσοφαινοτυπικών δεικτών με τη FAB ταξινόμηση και τα ευρήματα της κυτταρογενετικής μελέτης.⁷ Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μιας τέτοιας προσπάθειας. Η ταξινόμηση των ΟΜΛ κατά WHO, εκτός από την κυτταρομορφολογία και τα ευρήματα της κυτταρογενετικής μελέτης, στηρίζεται και στο ιστορικό.⁸ Έτσι, η συγκεκριμένη ταξινόμηση κατηγοριοποιεί τις ΟΜΛ ως εξής: (α) ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, (β) ΟΜΛ με

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2011, 28(6):832-838
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2011, 28(6):832-838

Ι. Κάκκας

Α΄ Τμήμα Ανοσολογίας-
Ιστοσυμβατότητας,
ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα

Incorporation of
immunophenotyping and
molecular changes in the
diagnostic procedure
for acute leukemia

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανοσοφαινότυπος
Κυτταρογενετική
Κυτταρομορφολογία
Μοριακές τεχνικές
Οξεία λευχαιμία (ΟΛ)

Υποβλήθηκε 19.12.2010
Εγκρίθηκε 15.4.2011

Πίνακας 1. Από *Leukemia* 1995, 9:1783–1786.

Classification of acute myeloid leukemias (AML)	
1. Myelomonocytic lineage*	anti-MPO+, CD13+, CD33+, CDw65+ and/or CD117+
2. Erythroid lineage (pure erythroid, M6)	Early/immature: unclassifiable by markers Late/mature: anti-glycophorin A+
3. Megakaryocytic lineage (M7):	CD41+ and/or CD61+ (membrane or cytoplasmic)
4. Early myeloid (M0): (only defined by immunological markers) [†]	phenotype as other myelomonocytic AML but negative cytochemistry and lymphoid specific markers: CD3, CD79a, CD22
5. TdT+ AML	
6. AML with lymphoid antigen expression (Ly+AML) (see text)	

*Positive for at least two or more myeloid markers.
[†]References 10 and 14

δυσπλασία τουλάχιστον δύο σειρών, (γ) δευτεροπαθείς –μετά από θεραπεία για άλλη νεοπλασία– OML, (δ) OML μη ταξινομούμενες στις προαναφερθείσες υποκατηγορίες, (ε) μυελικό σάρκωμα, (στ) OML σχετιζόμενες με το σύνδρομο Down και (ζ) δενδριτικές OML. Στη συνέχεια, αναλύοντας τα δεδομένα της υποκατηγορίας των OML με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, όπου περιλαμβάνονται και οι γονιδιακές μεταλλάξεις, θα επιχειρηθεί η παράθεση τυχόν νεότερων δεδομένων αναφορικά με την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των εν λόγω ανωμαλιών και συγκεκριμένων ανοσοφαινοτυπικών δεικτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις OML, στις οποίες η κλινική εικόνα και η κυτταρομορφολογία συνηγορούν υπέρ της

παρουσίας συγκεκριμένης χρωμοσωμιακής βλάβης και η κυτταρογενετική μελέτη αποτυγχάνει να την αναδείξει, η προσφυγή στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας είναι απολύτως αναγκαία. Για παράδειγμα, η ανίχνευση μεταγράφων PML/RARα με την τεχνική της RT-PCR είναι δηλωτική της παρουσίας t(15;17).

2.1. Οξεία μυελογενής λευχαιμία με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες

t(8;21) OML

Όπως είναι γνωστό, η t(8;21) οδηγεί στο σχηματισμό του *RUNX1/RUNX1T1 (AML1/ETO)* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων t(8;21) OML μορφολογικά ταυτίζεται με την OML M₂ κατά FAB. Λίγες περιπτώσεις έχουν χαρακτηριστεί μορφολογικά OML M₁ κατά FAB. Παρομοίως, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων τα ευρήματα από την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των βλαστικών κυττάρων είναι χαρακτηριστικά. Σε αυτά περιλαμβάνεται η μερική έκφραση του CD34 και η ισχυρή θετικότητα των HLA-DR, MPO και CD13, ενώ συχνά η έκφραση του CD33 είναι ασθενής. Χαρακτηριστική επίσης είναι η συχνή απρόσφορη έκφραση του CD19, ενώ σπανιότερη είναι η κυτταροπλασματική θετικότητα των CD79α και Tdt. Τέλος, η έκφραση του CD56 στο 20–30% των περιπτώσεων φαίνεται ότι έχει αρνητική προγνωστική αξία.^{8–12}

Πίνακας 2. Από *Blood* 1997, 90:2863–2892.

AML			
FAB Subtype	Common Phenotype	Comments/Variations	Potentially Associated Genetic Abnormalities
M0	DR, CD13, CD33, CD34, CD7 ^{-/+} , TdT ^{-/+}	Blasts >90%	Complex changes particularly involving 5 or 7
M1	Similar to M0 except CD15 ^{-/+}	Blasts >90%	t(9;22) possible
M2	DR, CD13, CD33, more CD15 and less CD34 than M1	Blasts <90%	No consistent alteration
M3	DR(-), CD13, CD15, CD33, CD34 ^{-/+} , CD2 occasionally	Isolated CD19 in AML with maturation	t(8;21) more likely
M4, M5	DR, CD15, CD14 ^{+/-} , CD33 > CD13, CD34 ^{-/+} , CD4 weak	Strong SSC except M3v	If t(15;17) (-) cytogenetically, RAR rearrangement molecularly, consider variants, t(11;17)
M6	DR, CD13 ^{-/+} , CD33 ^{+/-} , CD34, CD45 weak	CD2(+), DR(-) in maturing AML consider M3	11q23 rearrangements in 35% Inv(16) or t(16;16) in most M4E ₀
M7	DR ^{-/+} , CD33 ^{+/-} , CD34, CD41, CD61	Mature forms express glycophorin	No consistent alteration
		Frequently in dysplastic background	-7 or del(7q) and/or -5 or del(5q)
		Phenotyping critical, beware of platelet adhesion to blasts	Most frequent FAB subtype in trisomy 21 children

Abbreviations: +/–, variable, more often positive; –/+, variable, more often negative; (–), negative; DR, HLA-DR; SSC, side scatter; RAR, retinoic acid receptor; M3v, microgranular variant.

Inv(16) OML

Η *inv(16)* οδηγεί στο σχηματισμό του *CBFB/MYH11* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων *inv(16) OML* μορφολογικά ταυτίζεται με την *OML M₄* κατά FAB, με ταυτόχρονη παρουσία σημαντικού αριθμού ηωσινοφίλων στο μυελό των οστών. Ανοσοφαινοτυπικά, η πλειοψηφία των περιπτώσεων ασθενών με *inv(16) OML* χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο τουλάχιστον πληθυσμών βλαστών: (α) Τα βλαστικά κύτταρα της πρώτης ομάδας χαρακτηρίζονται από την έντονη έκφραση των CD34 και CD117, ενώ (β) τα υπόλοιπα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την απουσία έκφρασης των προαναφερθέντων αντιγόνων, εκφράζοντας όμως αντιγόνα της μυελικής και της μονοκυτταρικής σειράς. Συχνή είναι η ασύγχρονη έκφραση αντιγόνων. Τέλος, η απρόσφορη έκφραση του CD2 είναι συχνή, αλλά όχι ειδική της *inv(16) OML*.^{8,10,11}

t(15;17) OML

Όπως είναι γνωστό, η *t(15;17)* οδηγεί στο σχηματισμό του *PML/RARα* χιμαιρικού γονιδίου με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Όλες οι περιπτώσεις *t(15;17) OML* μορφολογικά ταυτίζονται με την *OML M₃* κατά FAB είτε με την τυπική, είτε με την υποκοκκίωδη μορφή της. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων χαρακτηριστική είναι η απουσία έκφρασης των CD34 και HLA-DR από τα προμυελοκύτταρα και τους βλάστες, ενώ, αντίθετα, έντονη είναι η θετικότητα στην MPO. Σταθερή είναι η έκφραση των CD117, CD33 και CD13, ενώ τα CD15 και CD65 συνήθως είναι αρνητικά. Η απρόσφορη έκφραση του CD2 έχει συσχετιστεί με την υποκοκκίωδη μορφή, ενώ η έκφραση του CD56 στο 20–30% των περιπτώσεων φαίνεται ότι έχει αρνητική προγνωστική αξία.^{8,11,13}

t(9;11) OML

Η *t(9;11)* οδηγεί στο σχηματισμό του *MLLT3/MLL* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων *t(9;11) OML* μορφολογικά ταυτίζεται με τις *OML M₄* και *M₅* κατά FAB. Λίγες περιπτώσεις έχουν χαρακτηριστεί *M₁* κατά FAB. Ανοσοφαινοτυπικά, οι βλάστες στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ενηλίκων ασθενών με *t(9;11) OML* χαρακτηρίζονται από την υπεροχή της έκφρασης των δεικτών της μονοκυτταρικής σειράς (HLA-DR, CD11b, CD11c, CD64),

έναντι αυτών της μυελικής σειράς. Τέλος, η έκφραση των CD34, CD117 και CD56 ποικίλλει τόσο σε επίπεδο ποσοστού βλαστών όσο και σε επίπεδο έντασης.^{8,10,14}

t(6;9) OML

Η *t(6;9)* οδηγεί στο σχηματισμό του *DEK/NUP214 (DEK/CAM)* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Μορφολογικά, οι περιπτώσεις *t(6;9) OML* έχουν συσχετιστεί με όλες τις FAB υποκατηγορίες της *OML*, εκτός από την *M₃* και την *M₇*. Πάντως, συχνότερη είναι η συσχέτισή τους με *OML M₂* και *M₄*. Συχνή επίσης είναι η παρουσία βασηοφιλίας και δυσπλασίας, τουλάχιστον δύο σειρών. Ανοσοφαινοτυπικά, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων παρατηρείται σταθερή έκφραση δεικτών της μυελικής και της μονοκυτταρικής σειράς (CD33, CD13, MPO, CD15, CD11b, CD64), καθώς και των CD34, CD117 και CD38. Τέλος, συχνή είναι η κυτταροπλασματική ανίχνευση της Tdt (περίπου στο 50% των περιπτώσεων).⁸

Inv(3)/t(3;3) OML

Η *inv(3)/t(3;3)* οδηγεί στο σχηματισμό του *PRN1/EV11* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Μορφολογικά, οι περιπτώσεις *inv(3)/t(3;3) OML* έχουν συσχετιστεί με όλες τις FAB υποκατηγορίες της *OML*, εκτός από την *M₃*. Πάντως, συχνότερη είναι η συσχέτισή τους με *OML M₁*, *M₄* και *M₇*. Ανοσοφαινοτυπικά, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων παρατηρείται έκφραση των δεικτών της μυελικής σειράς με ή χωρίς σύγχρονη παρουσία των δεικτών της μονοκυτταρικής σειράς, καθώς και των CD34 και CD38, ενώ σπανιότερα ανιχνεύονται οι δείκτες της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς CD41 και CD61. Τέλος, στη συγκεκριμένη μικρή ομάδα ασθενών σχετικά συχνή είναι η απρόσφορη έκφραση του CD7.⁸

t(1;22) OML

Η *t(1;22) OML* οδηγεί στο σχηματισμό του *RBM15/MKL1 (OTT/MAL)* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Όλες οι περιπτώσεις *t(1;22) OML* μορφολογικά ταυτίζονται με την *OML M₇* κατά FAB. Ανοσοφαινοτυπικά, χαρακτηριστική είναι η κυτταροπλασματική έκφραση των CD41 και CD61. Επίσης, συχνή είναι η έκφραση των CD13, CD33 και CD36, ενώ χαρακτηριστική είναι η απουσία έκφρασης της MPO. Τέλος, ασυνήθης είναι η έκφραση των CD34 και HLA-DR στη συγκεκριμένη μικρή ομάδα ασθενών.⁸

2.2. Οξεία μυελογενής λευχαιμία με γονιδιακές μεταλλάξεις

Οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*

Η μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* μορφολογικά έχει συσχετιστεί είτε με ΟΜΛ M₄ είτε με ΟΜΛ M₅ κατά FAB. Σπανιότερα, περιπτώσεις ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* έχουν συσχετιστεί με ΟΜΛ M₁, M₂ ή M₆ κατά FAB. Ανοσοφαινοτυπικά, χαρακτηρίζονται από τη συνήθως σύγχρονη παρουσία δεικτών της μυελικής και της μονοκυτταρικής σειράς, ενώ χαρακτηριστική είναι η απουσία έκφρασης του CD34 στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων.^{8,15-17}

Οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλάξεις του γονιδίου *CEBPA*

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου *CEBPA* μορφολογικά έχει συσχετιστεί είτε με ΟΜΛ M₁ είτε με ΟΜΛ M₂ κατά FAB. Ανοσοφαινοτυπικά, χαρακτηρίζονται από τη σταθερή έκφραση των δεικτών της μυελικής σειράς, καθώς και των CD34 και HLA-DR. Τέλος, στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών φαίνεται ότι είναι συχνή η απρόσφορη έκφραση του CD7.^{8,18,19}

3. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη έχει καταστεί κεφαλαίωδους σημασίας για τη διάγνωση της ΟΛΛ και έχει συμβάλει σημαντικά στην ακριβέστερη ταξινόμησή της. Το 1995, παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από την EGIL ολοκληρωμένη ανοσοφαινοτυπική ταξινόμηση των ΟΛΛ³ (πίν. 3). Αλλά και

στην ταξινόμηση WHO, οι ΟΛΛ κατατάσσονται βάσει της κυτταρικής σειράς προέλευσής τους. Στις ταξινομήσεις WHO, τόσο στην πρόσφατη όσο και στην παλαιότερη, οι ΟΛΛ κατηγοριοποιούνται με βάση την κυτταρική σειρά προέλευσης των λεμφοβλαστών και των ευρημάτων της κυτταρογενετικής μελέτης χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψη η κατά FAB μορφολογική ταξινόμηση.^{6,20} Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόσφατη ταξινόμηση WHO χαρακτηρίζει τις ΟΛΛ «πρόδρομα λεμφικά νεοπλάσματα», εξαιρώντας από αυτές την ΟΛΛ τύπου Burkitt, θεωρώντας τη συγκεκριμένη οντότητα λέμφωμα με λευχαιμική έκφραση.²⁰ Συγκεκριμένα, οι ΟΛΛ κατηγοριοποιούνται ως εξής: (α) Β-ΟΛΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, (β) Β-ΟΛΛ μη ταξινομούμενες κυτταρογενετικά και (γ) Τ-ΟΛΛ/λεμφοβλαστικά λεμφώματα. Στη συνέχεια, αναλύοντας τα δεδομένα των Β-ΟΛΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, θα επιχειρηθεί η παράθεση τυχόν νεότερων δεδομένων αναφορικά με την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των εν λόγω κυτταρογενετικών ανωμαλιών και συγκεκριμένων ανοσοφαινοτυπικών δεικτών. Σημειώνεται ότι στις περιπτώσεις Β-ΟΛΛ όπου ο ανοσοφαινότυπος, η ηλικία και πιθανόν η κλινική εικόνα συνηγορούν υπέρ της παρουσίας συγκεκριμένης χρωμοσωμιακής βλάβης και η κυτταρογενετική μελέτη αποτυγχάνει να την αναδείξει, η προσφυγή στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας είναι απολύτως αναγκαία. Για παράδειγμα, η ανίχνευση μεταγράφων BCR/ABL με την τεχνική της RT-PCR είναι δηλωτική της παρουσίας t(9;22).

3.1. Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες

Οι ασθενείς της συγκεκριμένης ομάδας κατηγοριοποιούνται βάσει της κυτταρογενετικής ή και της μοριακής μελέτης ως εξής: (α) t(9;22) Β-ΟΛΛ, (β) t(v;11) Β-ΟΛΛ, (γ) t(12;21) Β-ΟΛΛ, (δ) Β-ΟΛΛ με υπερδιπλοειδία, (ε) Β-ΟΛΛ με υποδιπλοειδία, (στ) t(5;14) Β-ΟΛΛ και (ζ) t(1;19) Β-ΟΛΛ.

Πίνακας 3. Από *Leukemia* 1995, 9:1783-1786.

Classification of acute lymphoblastic leukemia (ALL)	
1. B lineage ALL* (CD19+ and/or CD79a+ and/or CD22+):	
pro-B-ALL (B-I) (no expression of other differentiation B-cell antigens)	CD10+
common all (B-II)	CD10+
pre-B-ALL (B-III)	Cytoplasmic IgM+
mature B-ALL (B-IV)	Cytoplasmic or surface kappa or lambda+
2. T lineage ALL [‡] (cytoplasmic/membrane CD3+):	
pro-T-ALL (T-I)	CD7+
pre-T-ALL (T-II)	CD2+ and/or CD5+ and/or CD8+
cortical-T-ALL (T-III)	CD1a+
mature-T-ALL (T-IV)	membrane CD3+, CD1a-
α/β + T-ALL (group a)	anti-TCR α/β+
γ/δ + T-ALL (group b)	anti-TCR γ/δ+
3. ALL with myeloid antigen expression (My + ALL) (see text)	

*Positive at least with two of the three markers. Most cases are TdT+, HLA-DR+ except B-IV which often is TdT-.
[‡]Most cases are TdT+, HLA-DR-, CD34- but these markers are not considered for diagnosis or disease classification

t(9;22) Β-ΟΛΛ

Όπως είναι γνωστό, η t(9;22) οδηγεί στο σχηματισμό του *BCR/ABL* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομώνυμων μεταγράφων. Η επίπτωση της προαναφερθείσας αντιμετάθεσης είναι πολύ μεγαλύτερη στη Β-ΟΛΛ των ενηλίκων συγκριτικά με αυτή των παιδιών. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οι λεμφοβλάστες είναι CD19(+), CD10(+) και Tdt(+), δηλαδή pre-B/common ALL κατά EGIL φαινοτύπου. Σχετικά συχνή είναι η απρόσφορη έκφραση αντιγόνων της μυελικής σειράς (CD33 και CD13). Τέλος, συχνή είναι η έκφραση του CD25 στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών.²⁰⁻²³

t(ν;11) B-ΟΛΛ

Οι B-ΟΛΛ που συνοδεύονται από αντιμεταθέσεις του *MLL* γονιδίου (χρωμόσωμα 11q23) και ειδικότερα οι t(4;11) B-ΟΛΛ, στις οποίες σχηματίζεται το *AF4/MLL* χιμαιρικό γονίδιο, έχουν συσχετιστεί με τον CD10(-) pro-B ALL κατά EGIL φαινότυπο. Σχετικά συχνή είναι η απρόσφορη έκφραση του CD15. Τέλος, συχνή και με υψηλή ειδικότητα είναι η έκφραση του NG-2 αντιγόνου στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών.^{20,22,24}

t(12;21) B-ΟΛΛ

Η t(12;21) οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *ETV6/RUNX1 (TEL/AML1)*, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Η επίπτωση της προαναφερθείσας αντιμετάθεσης είναι πολύ μεγαλύτερη στη B-ΟΛΛ των παιδιών συγκριτικά με αυτή των ενηλίκων. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οι λεμφοβλάστες είναι CD34(+), CD19(+) και CD10(+). Συχνή αλλά όχι ειδική είναι η απουσία έκφρασης του CD20. Τέλος, συχνή είναι η απρόσφορη έκφραση του CD13.^{20,22,25}

B-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με υπερδιπλοειδία

Οι B-ΟΛΛ με υπερδιπλοειδία χαρακτηρίζονται από την παρουσία >50 χρωμοσωμάτων στους λεμφοβλάστες. Η επίπτωση της υπερδιπλοειδίας είναι πολύ μεγαλύτερη στη B-ΟΛΛ των παιδιών συγκριτικά με αυτή των ενηλίκων. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι λεμφοβλάστες είναι CD34(+), CD19(+) και CD10(+).^{20,22,25}

B-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με υποδιπλοειδία

Οι B-ΟΛΛ με υποδιπλοειδία χαρακτηρίζονται από την παρουσία <46 χρωμοσωμάτων στους λεμφοβλάστες. Η επίπτωση της υποδιπλοειδίας είναι οριακά μεγαλύτερη στη B-ΟΛΛ των ενηλίκων συγκριτικά με αυτή των παιδιών. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι λεμφοβλάστες είναι CD19(+) και CD10(+), χωρίς να αναφέρονται ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα με ειδικότητα για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών.^{20,22,25}

t(5;14) B-ΟΛΛ

Η t(5;14) οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *IL3/IGH*. Και εδώ, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οι λεμφοβλάστες είναι CD19(+) και CD10(+),

χωρίς να αναφέρονται ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα με ειδικότητα για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Αξίζει να σημειωθεί ότι συχνή είναι η παρουσία ηωσινοφιλίας στους ασθενείς με t(5;14) B-ΟΛΛ.^{20,25}

t(1;19) B-ΟΛΛ

Η t(1;19) οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *E2A/PBX1*, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομωνύμων μεταγράφων. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οι λεμφοβλάστες είναι CD19(+), CD10(+) και Cμ(+), δηλαδή pre-B ALL κατά EGIL φαινότυπου. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων απουσιάζει η έκφραση του CD34.^{20,22,25}

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παράθεση των δεδομένων που αφορούν στις ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, ένα σημείο χρειάζεται ιδιαίτερη επισήμανση. Είναι κεφαλαϊδούς σημασίας η άμεση διάγνωση της t(15;17) ΟΜΛ και η άμεση έναρξη συνδυασμένης θεραπείας, προκειμένου να περιοριστούν οι πιθανότητες εμφάνισης απειλητικών για τη ζωή του ασθενούς διαταραχών της πήξης. Έτσι, ένας «υπόποτος» για t(15;17) ΟΜΛ ανοσοφαινότυπος (HLA/DR-, CD34-, MPO+++), συνδυαζόμενος με ΟΜΛ M₃ κατά FAB μορφολογία του μυελικού επιχρίσματος και συμβατά κλινικά ή άλλα εργαστηριακά ευρήματα, καθιστά αναγκαίο τον επείγοντα έλεγχο για τυχόν παρουσία PML/RARα μεταγράφων με την τεχνική της RT-PCR.

Από την παράθεση των δεδομένων που αφορούν στις B-ΟΛΛ των ενηλίκων με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, δύο σημεία χρειάζονται ιδιαίτερη επισήμανση, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι η αρνητική προγνωστική αξία της t(9;22) και της t(4;11) για τους προαναφερθέντες ασθενείς είναι απόλυτα τεκμηριωμένη. (α) Σε περιπτώσεις ασθενών με CD10(+) (pre-B/common) B-ΟΛΛ φαινότυπους, θα πρέπει να ελέγχεται με την τεχνική της RT-PCR η τυχόν παρουσία BCR/ABL μεταγράφων, εάν η κλασική κυτταρογενετική μελέτη δεν αναδείξει την παρουσία της t(9;22) και (β) σε περιπτώσεις ασθενών με CD10(-) pro-B-ΟΛΛ φαινότυπους θα πρέπει να ελέγχεται η τυχόν παρουσία της t(4;11) με την τεχνική του FISH, είτε η τυχόν παρουσία των *AF4/MLL* μεταγράφων με την τεχνική της RT-PCR, εάν η κλασική κυτταρογενετική μελέτη δεν αναδείξει την παρουσία της προαναφερθείσας αντιμετάθεσης.

ABSTRACT

Incorporation of immunophenotyping and molecular changes in the diagnostic procedure for acute leukemia

I. KAKKAS

*Department of Immunology and Histocompatibility, "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece**Archives of Hellenic Medicine 2011, 28(6):832–838*

The French-American-British (FAB) classification system for acute leukemia (AL) was based on cytomorphological and cytochemical criteria. The classification of AL proposed by the European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) was based on immunophenotyping, targeting a more precise delineation of the hematological lineage and differentiation stage of specific types of leukemia. Immunophenotyping, performed mainly by flow cytometry (FC) has become fundamental for the classification of AL and essential for the recognition of the various subtypes of AL. Publication of the EGIL classification generated intense interest in the investigation of consistent relationships between cytomorphology, immunophenotype and cytogenetic changes. The earlier (2001) and current (2008) WHO classifications of AL have now incorporated cytomorphology, immunophenotyping and cytogenetic and molecular changes. Based on the current WHO classification of AL, relationships (both consistent and unstable) between cytogenetic or molecular changes and immunophenotype will be considered.

Key words: Acute leukemia, Cytogenetic changes, Cytomorphology, Immunophenotype, Molecular changes

Βιβλιογραφία

- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR ET AL. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M₇). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985, 103:460–462
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR ET AL. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-Mo). *Br J Haematol* 1991, 78:325–329
- BENE MC, CASTOLDI G, KNAPP W, LUDWIG WD, MATUTES E, ORFAO A ET AL. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995, 9:1783–1786
- CAMPANA D, HANSEN-HAGGE TE, MATUTES E, COUSTAN-SMITH E, YOKOTA S, SHETTY V ET AL. Phenotypic, genotypic, cytochemical and ultrastructural characterization of acute undifferentiated leukemia. *Leukemia* 1990, 4:620–624
- MATUTES E, MORILLA R, FARAHAT N, CARBONELL F, SWANSBURY J, DYER M ET AL. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997, 82:64–66
- HARRIS NL, JAFFE ES, VARDIMAN JW, STEIN H, DIEBOLD J, MULLER-HERMELINK HK ET AL. Summary of the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds) *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press, Lyon, 2001:10–13
- JENNINGS CD, FOON KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997, 90:2863–2892
- ARBER DA, VARDIMAN JW, BRUNNING RD, PORWIT A, LE BEAU MM, THILE J ET AL. Acute myeloid leukaemia and related precursor neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al (eds) *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press, Lyon, 2008:110–147
- PORWIT-MACDONALD A, JANOSSY G, IVORY K, SWIRSKY D, PETERS R, WHEATLEY K ET AL. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. CD34 over-expression in acute myelogenous leukemia (M₂) with t(8;21). *Blood* 1996, 87:1162–1169
- SOLARY E, CASASNOVAS RO, CAMPOS L, BENE MC, FAURE G, MAINGON P ET AL. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia AML: Correlation of CD19⁺, CD34⁺ and CD14⁺/DR-phenotypes with shorter survival. *Leukemia* 1992, 6:393–399
- LEGRAND O, PERROT JY, BAUDARD M, CORDIER A, LAUTIER R, SIMONIN G ET AL. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukaemia: Proposal of a prognostic score. *Blood* 2000, 96:870–877
- BAER MR, STEWART CC, LAWRENCE D, ARTHUR DC, BYRD JC, DAVEY FR ET AL. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21). *Blood* 1997, 90:1643–1648
- MURRAY CK, ESTEY E, PAIETTA E, HOWARD RS, EDENFIELD WJ, PIERCE S ET AL. CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: A possible indicator of poor treatment outcome? *J Clin Oncol* 1999, 17:293–297
- BAER MR, STEWART CC, LAWRENCE D, ARTHUR DC, MROZEK K, STROUT MP ET AL. Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations:

- Myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 1998, 12:317–325
15. FALINI B, MECUCCI C, TIACCI E, ALCALAY M, ROSATI R, PASQUA-LUCCI L ET AL. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005, 352:254–266
 16. SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, MECUCCI C, TSCHULIK C, MARTELLI MF ET AL. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005, 106:3733–3739
 17. THIEDE C, KOCH S, CREUTZIG E, STENDEL C, ILLMER T, SCHAICH M ET AL. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006, 107:4011–4020
 18. PREUDHOMME C, SAGOT C, BOISSEL N, CAYUELA JM, TIGAUD I, DE BOTTON S ET AL. Favorable prognostic significance of *CEBPA* mutations in patients with *de novo* acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002, 100:2717–2723
 19. FRÖHLING S, SCHLENK RF, STOLZE I, BIHLMAYR J, BENNER A, KREITMEIER S ET AL. *CEBPA* mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004, 22:624–633
 20. BOROWITZ MJ, CHAN JKC. Precursor lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al (eds) *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press, Lyon, 2008:168–178
 21. TABERNERO MD, BORTOLUCI AM, ALAEJOS I, LÓPEZ-BERGES MC, RASILLO A, GARCIA-SANZ R ET AL. Adult precursor B-ALL with *bcr/abl* gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 2001, 15:406–414
 22. LUDWIG WD, RIEDER H, BARTRAM CR, HEINZE B, SCHWARTZ S, GASSMANN W ET AL. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: Results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood* 1998, 92:1898–1909
 23. UCKUN FM, SATHER H, GAYNON P, ARTHUR D, NACHMAN J, SENSELMEYER ET AL. Prognostic significance of the CD10+CD19+CD34+B-progenitor immunophenotype in children with ALL: A report from the Children's Cancer Group. *Leuk Lymphoma* 1997, 27:445–457
 24. LENORMAND B, BÉNÉ MC, LESESVE JF, BASTARD C, TILLY H, LEFRANC MP ET AL. PreB1 (CD10-) acute lymphoblastic leukemia: Immunophenotypic and genomic characteristics, clinical features and outcome in 38 adults and 26 children. The Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies. *Leuk Lymphoma* 1998, 28:329–342
 25. PUI CH, RELLING MV, DOWNING JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004, 350:1535–1548

Corresponding author:

J. Kakkas, Department of Immunology and Histocompatibility, "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece
e-mail: ioankakkas@hol.gr