



CHARAKTERYSTYKA HISTOPATOLOGICZNA, CYTOLOGICZNA I IMMUNOFENOTYPOWA NOWOTWORÓW WYWODZĄCYCH SIĘ Z KOMÓREK PLAZMATYCZNYCH

Grzegorz Rymkiewicz
Zakład Patologii Centrum Onkologii-Instytut
Im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie
Pracownia Cytometrii Przepływowej



Klasyfikacja WHO (2008)

- **Chłoniaki nie-Hodgkina (NHL)**
 - Nowotwory z prekursorowych i obwodowych limfocytów B
 - Nowotwory z prekursorowych i obwodowych limfocytów T/NK
- **Chłoniaki Hodgkina (HL)**
- **Grey Zone Lymphoma (HL/NHL, inter BL/DLBCL)**
- **Ponad 5 tyś nowych przypadków NHL i HL rocznie w Polsce[^]**
(najprawdopodobniej 90% analizowanych przypadków)

[^] Gałązka K, Szpor J, Maryniak R, Olszewski W, Mioduszevska O, Stachura J. Incidence of lymphomas in Poland. The National Register for 2006. *Pol J Pathol* 2007, 58, 3: 199-206



Standardy diagnostyki NHL

- **Klasyfikacja WHO:**
 - Morfologia (**HP, FNAB - CYT**)
 - Fenotyp (**IH, FCM**)
 - Cytogenetyka (**GEN**)
 - klasyczna analiza prążkowa
 - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) genów i **EBV**
 - Badania molekularne (**MOL**)
 - reakcja łańcuchowa polimerazy z użyciem odwrotnej transkryptazy (RT-PCR)
 - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real time quantitative (RQ-PCR))
 - metoda multiplex PCR oraz analiza heterodupleksów
 - profil ekspresji genów, gene expression profiling (GEP)
 - Pełna dokumentacja kliniczna



Klasyfikacja WHO nowotworów z komórek plazmatycznych (PCNs)

[McKenna i wsp., 2008]

- **Gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu** (*Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS*)
- **Szpiczak plazmatcznokomórkowy (plazmocytowy)** (*Plasma cell myeloma, PCM*). **Odmiany:**
 - **Szpiczak bezobjawowy (tłący)** (*Asymptomatic, Smoldering myeloma, SMM*)
 - **Szpiczak niewydzielający** (*Non-Secretory myeloma*)
 - **Białaczka plazmatcznokomórkowa** (*Plasma cell leukemia, PCL*)
- **Plazmocytoma** (*plasmacytoma*):
 - **Odosobniona postać pozaszpikowa, forma pozakostna** (*Extraosseous, extramedullary plasmacytoma*)
 - **Odosobniona postać kostna, forma kostna, guz plazmocytowy odosobniony** (*Solitary plasmacytoma of bone*).



Klasyfikacja WHO PCNs

[McKenna i wsp., 2008]

- Choroby monoklonalnych depozytów immunoglobulinowych (*Monoclonal Immunoglobulin deposition diseases, MIDD*)
- Amyloidoza (Skrobawica) pierwotna (*Primary amyloidosis, PA*)
- Choroby łańcuchów ciężkich i lekkich (*Systemic light and heavy chain deposition diseases, LHCDD*)
- Makroglobulinemia Waldenströma - chłoniak limfoplazmocytoïdny (*Waldenström's macroglobulinemia, WM, Lymphoplasmacytic lymphoma, LPL*)

Trzeba próbować zarzucić używanie nazwy **Multiple myeloma (MM)** i ustalić polską nomenklaturę „*Plasma cell myeloma*” (szpiczak plazmatycznokomórkowy?)



Sekcja hematopatologiczna PTP / Polska Grupa badawcza Chłoniaków

	2007	2008
Plasma cell myeloma	564 (14,3 %)	573 (16,1%)
MGUS	16	25
Extraosseous plasmacytoma	9	4
Solitary plasmacytoma of bone	1	3



Diagnostyka PCNs

[San Miguel i wsp., 2006]

- **Morfologia** (znaczenie diagnostyczne, rokownicze):
 - **CYT** rozmazów
 - **FNAB - CYT** zmian pozaszpikowych
 - **Cytometryczne FSC/SCC** [Lin i wsp., 2004]
 - **HP** trepanobiopsji szpiku i tkanek pozaszpikowych
- **Immunofenotyp** (znaczenie diagnostyczne, rokownicze):
 - **IH**
 - **FCM**



Diagnostyka PCNs

- Ocena morfologii i odpowiedniego odsetka komórek plazmatycznych w szpiku oparta na ocenie rozmazu barwionego metodą May-Grünwald-Giemsa jest jednym z trzech dużych kryteriów diagnostycznych koniecznych do rozpoznania **PCNs**
- W badaniu **HP** trepanobiopsji szpiku zajęcie $>30\%$ i w zakresie 10-30% stanowią elementy dużych i małych kryteriów diagnostycznych



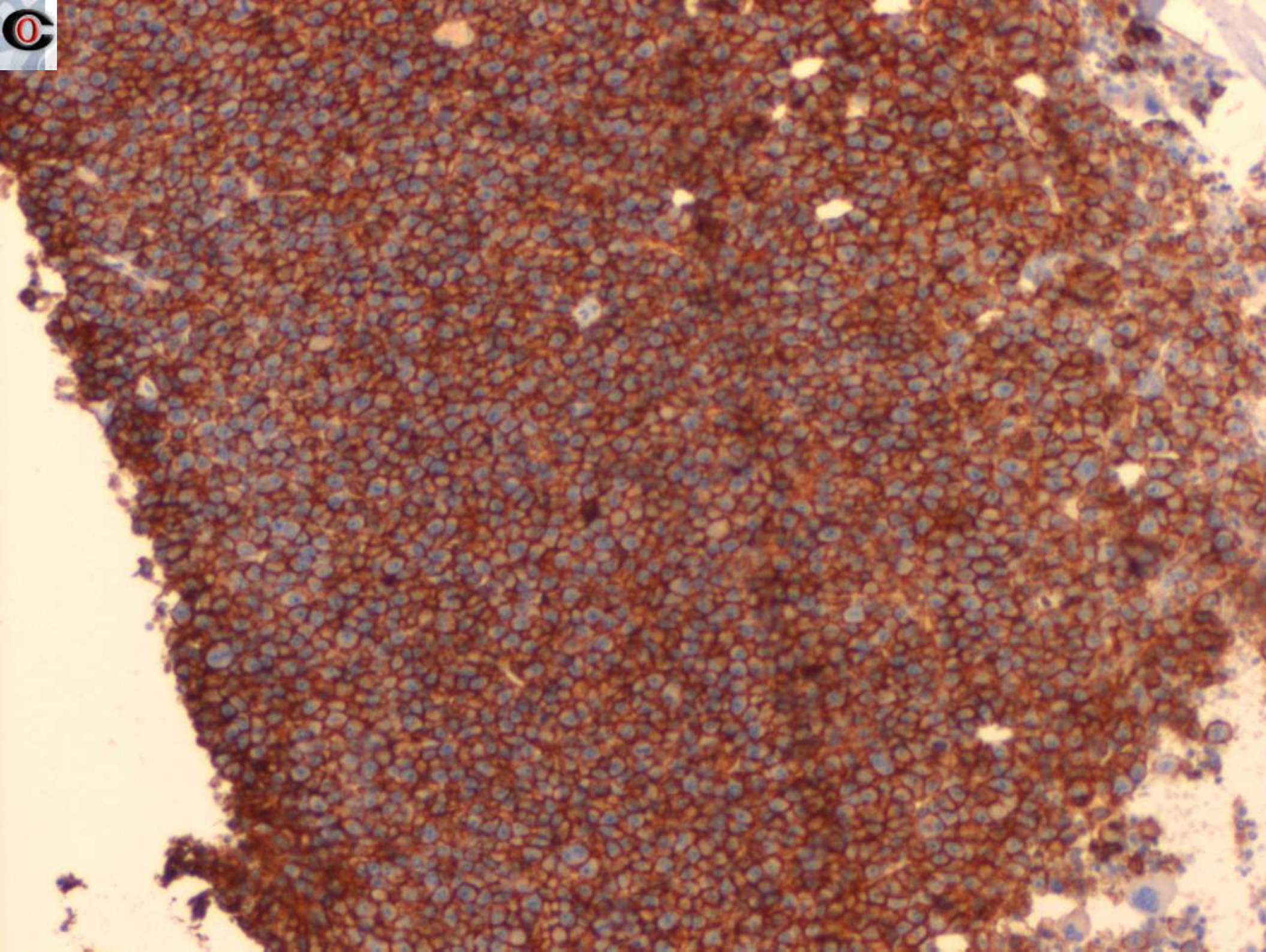
Diagnostyka PCNs

- Wydajność diagnostyczna **HP** trepanobiopsji zależy od rozmiarów i jakości pobranego materiału, który powinien zawsze być > długość 1,5cm
- Wykorzystanie **HP** trepanobiopsji (jako metody ilościowej i/lub jakościowej) jest najbardziej obiektywną metodą do oceny nacieku z komórek plazmatycznych



Diagnostyka PCMs

- W **PCMs** komórki **PCs** naciekają przestrzenie międzybeleczkowe większymi grupami, ogniskowo guzkami lub rozlanymi płatami komórek, wypełniając całe przestrzenie międzybeleczkowe
- Zajęcie szpiku (jakościowe i ilościowe) może mieć charakter:
 - ogniskowy
 - śródmiąższowy
 - rozlany





4 morfologiczne podtypy PCMs

stopień dojrzałości

[Greipp i wsp., 1985]

- dojrzały (*mature*)
- pośredni (*intermediate*)
- niedojrzały (*immature*), (zbudowany z dojrzałych plazmocytów i komórek o bardziej blastycznej morfologii; duże jądro, ekscentrycznie usytuowane, z chromatyną rozlaną z lub bez jąderka < 2 μm , z obfitą cytoplazmą)
- plazmablastyczny (*plasmablastic*), zwany też anaplastycznym



Opis szpiku w PCMs

[Greipp i wsp., 1985]

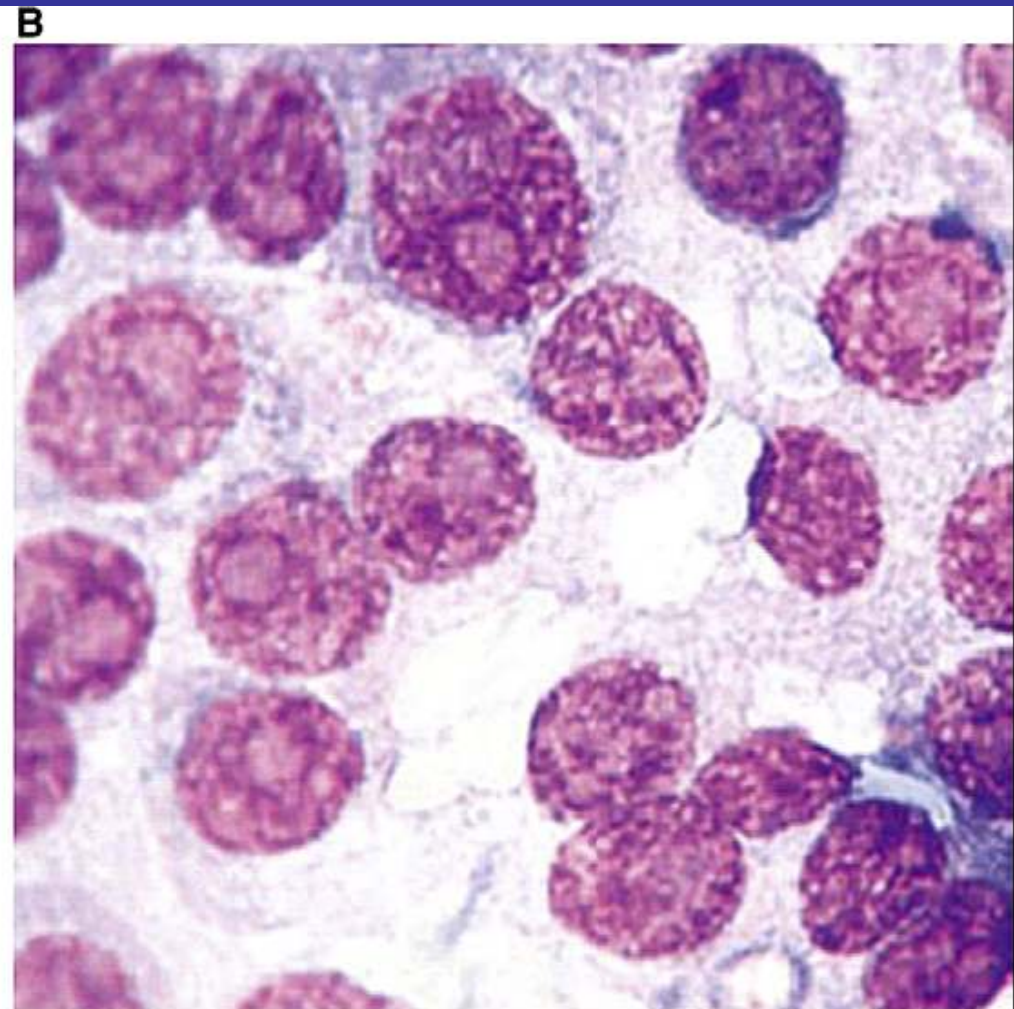
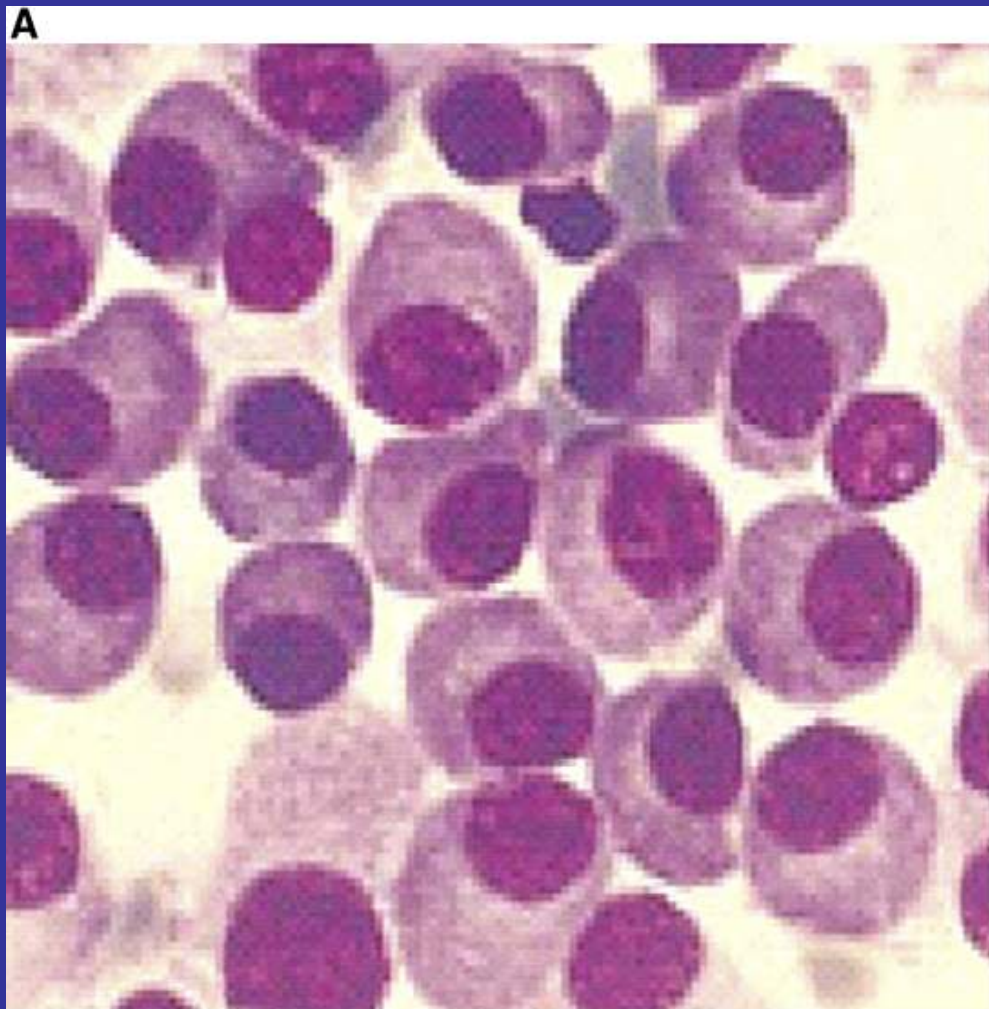
- **dojrzały PCM** (cechy cytologiczne kk szpiczakowych: >10% dojrzałych PCs, <2% plazmablastów i < 13% niedojrzałych PCs)
- **pośredni PCM** (nie spełniający kryteriów cytologicznych podtypu dojrzałego i niedojrzałego)
- **niedojrzały PCM** (cechy cytologiczne kk szpiczakowych: >12% niedojrzałych PCs, <10% dojrzałych PCs i <2% plazmablastów)
- **plazmablastyczny PCM** (cechy cytologiczne kk szpiczakowych: >2% plazmablastów)



PCMs - CYT

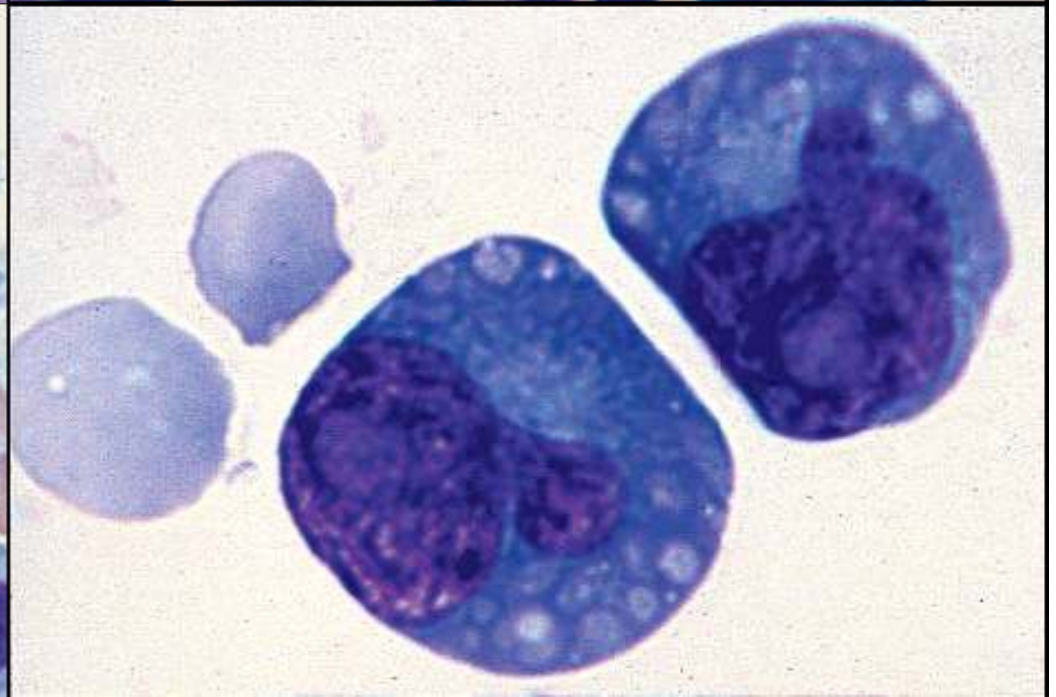
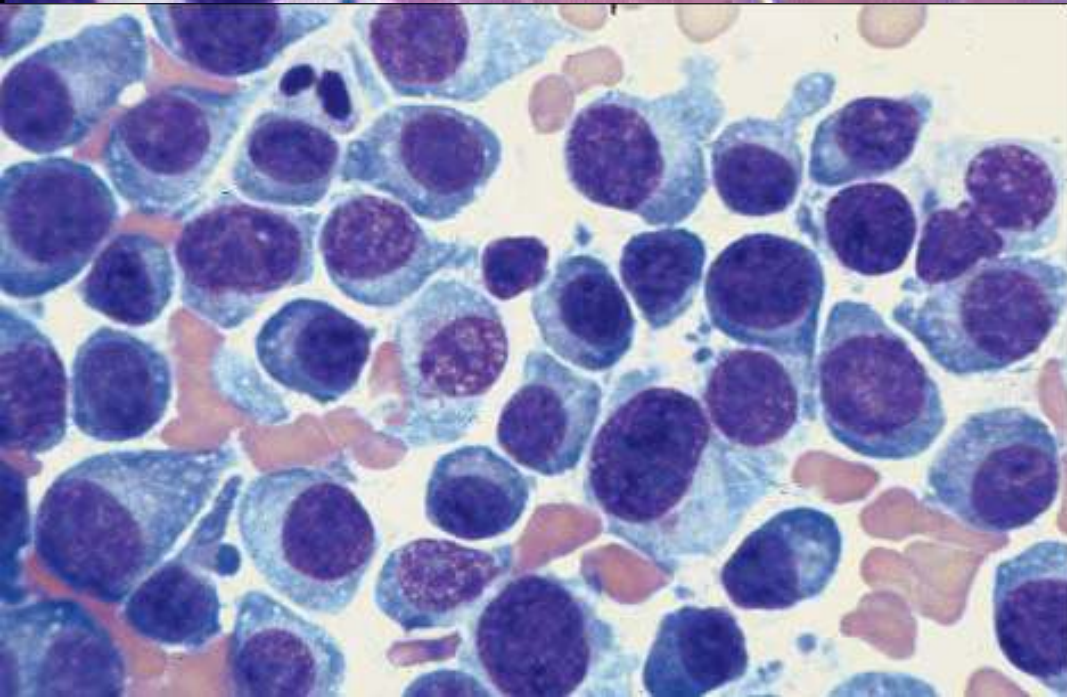
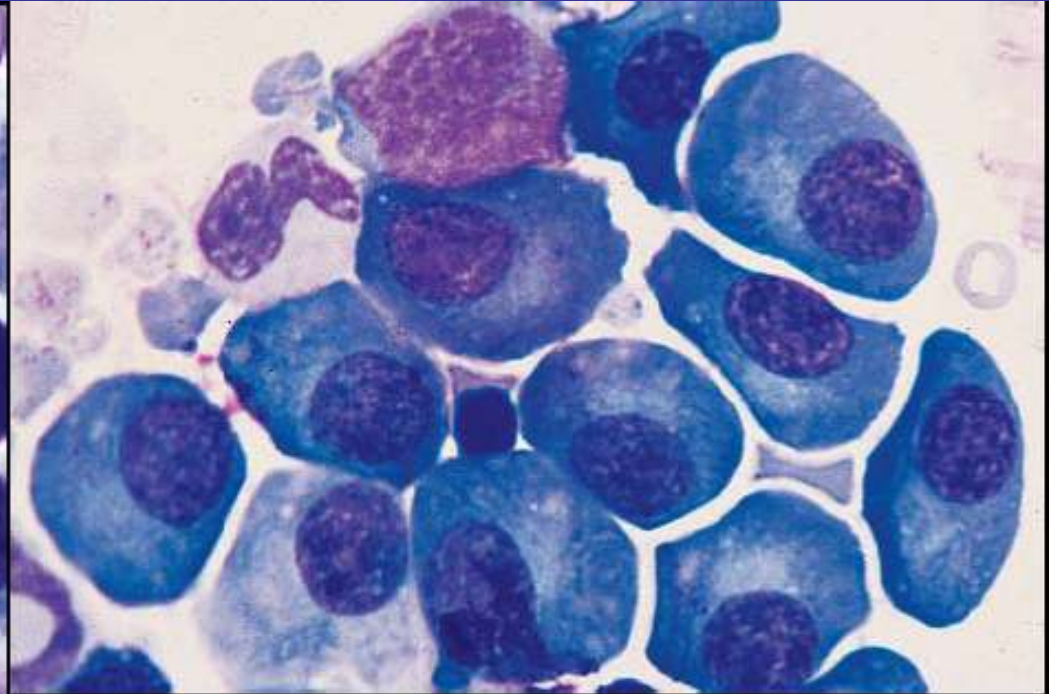
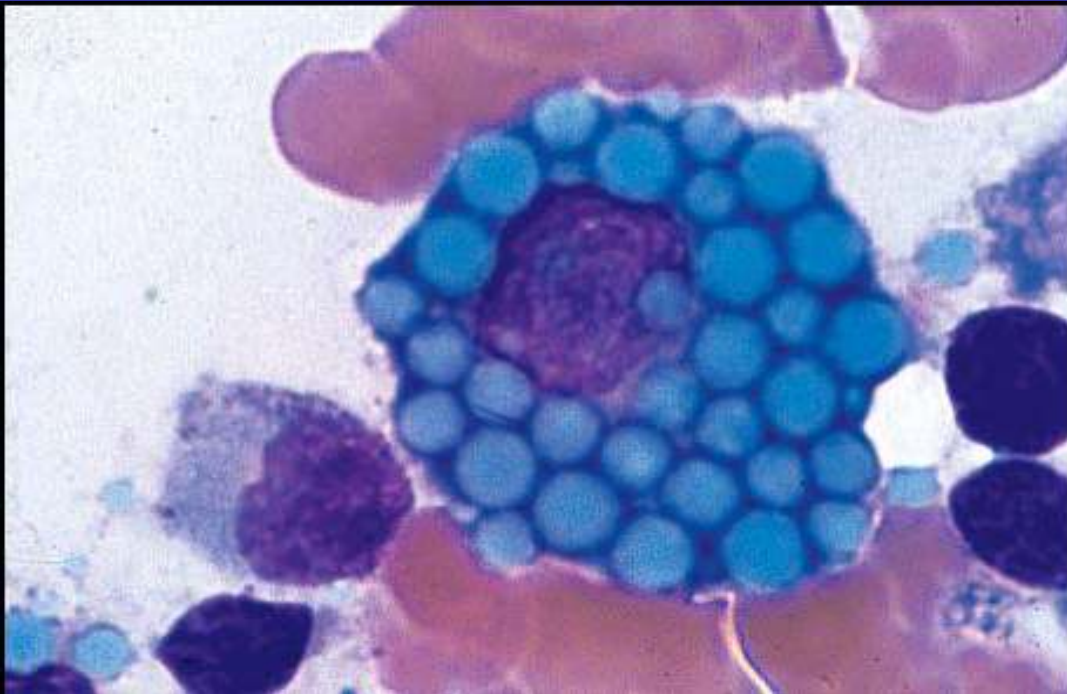
dojrzały

plazmablastyczny



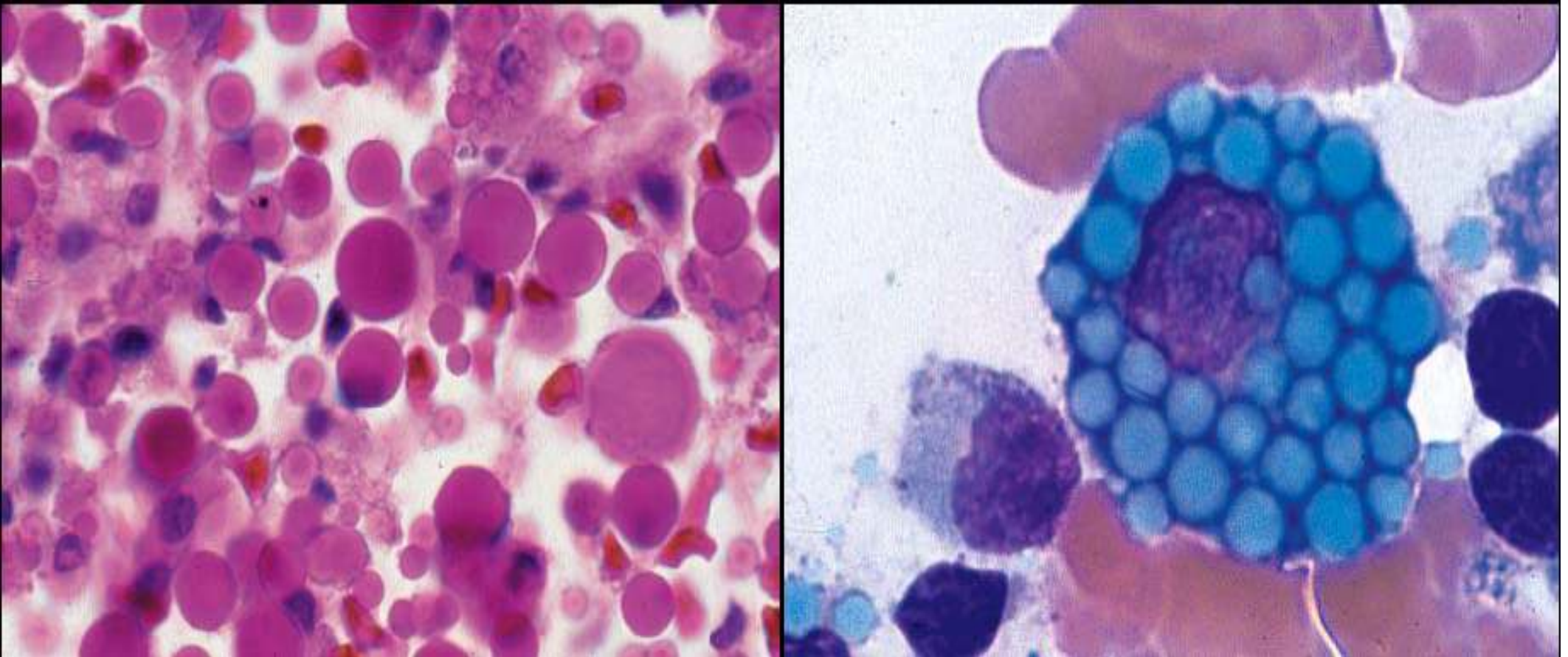


PCMs - CYT





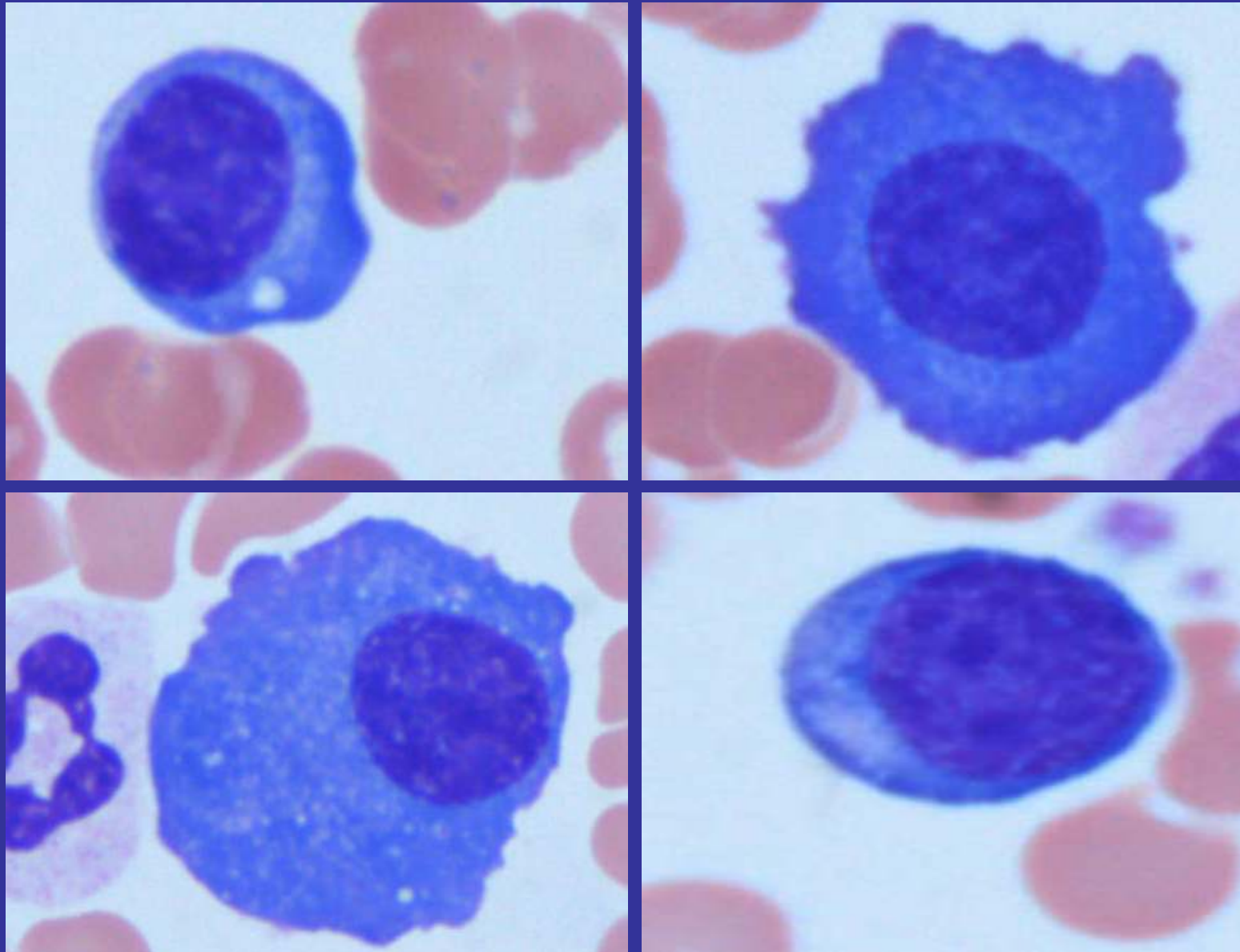
PCMs - CYT



W obrazie histopatologicznym i cytologicznym występują często złogi immunoglobulin w postaci cytoplazmatycznych lub pozakomórkowych ciałek Russela i ciałek Dutchera



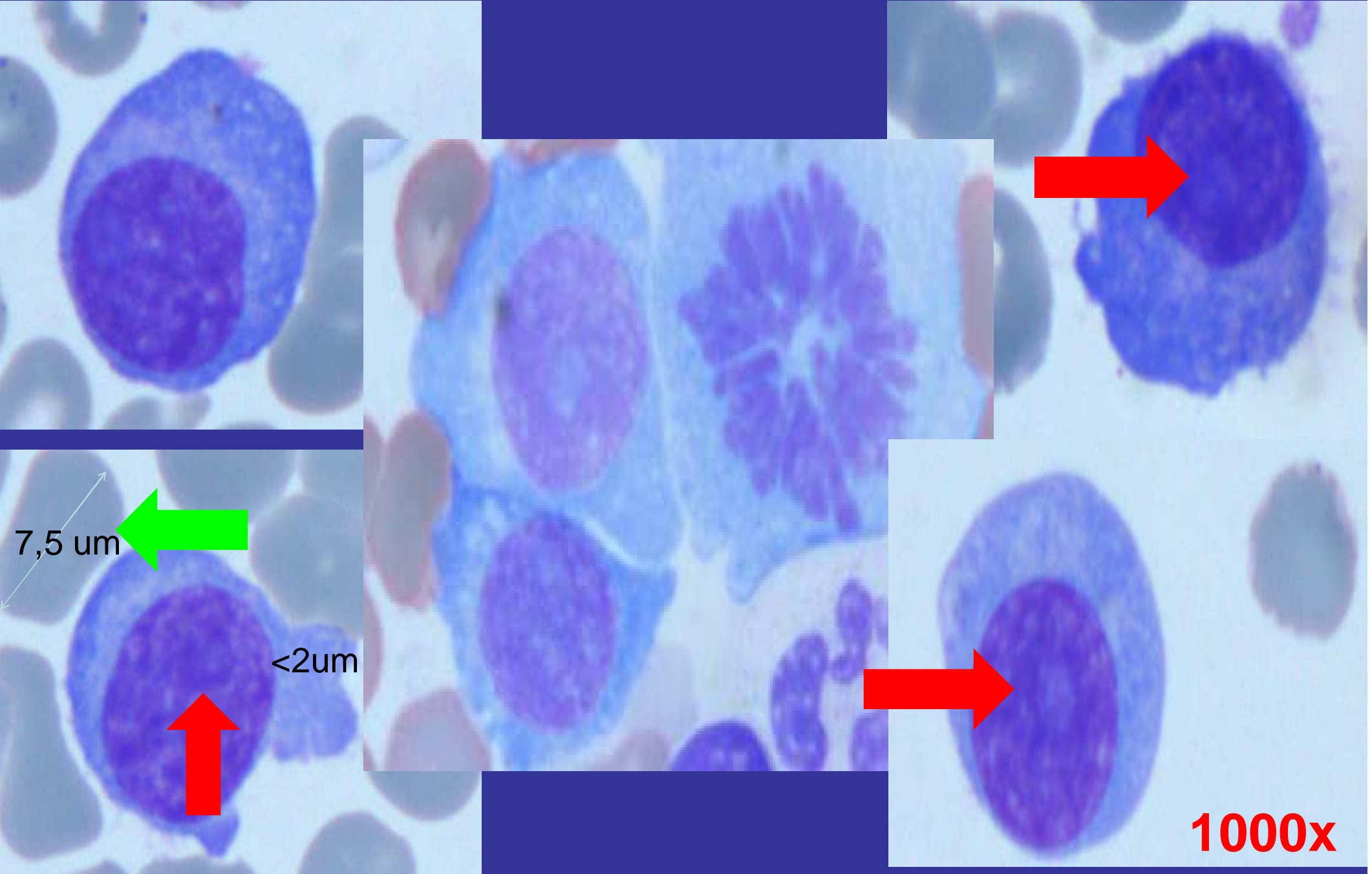
Pośredni PCMs - CYT



1000x



Niedojrzały PCMs - CYT



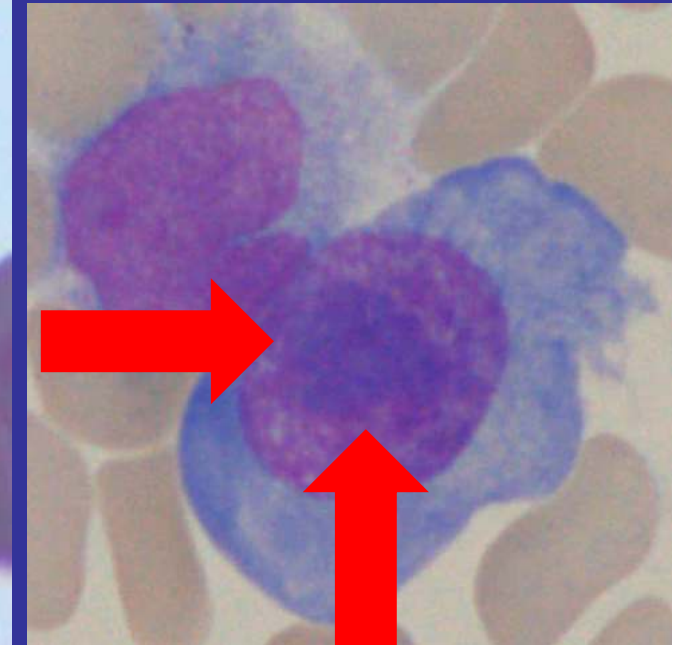
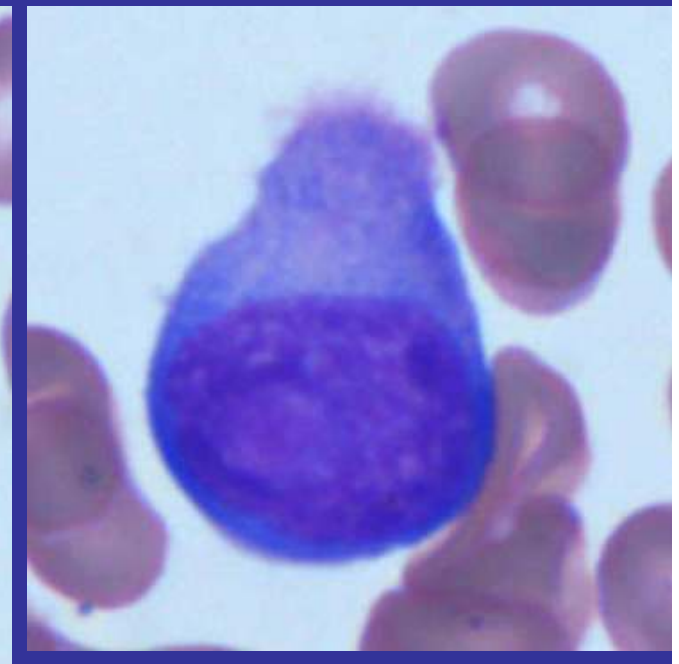
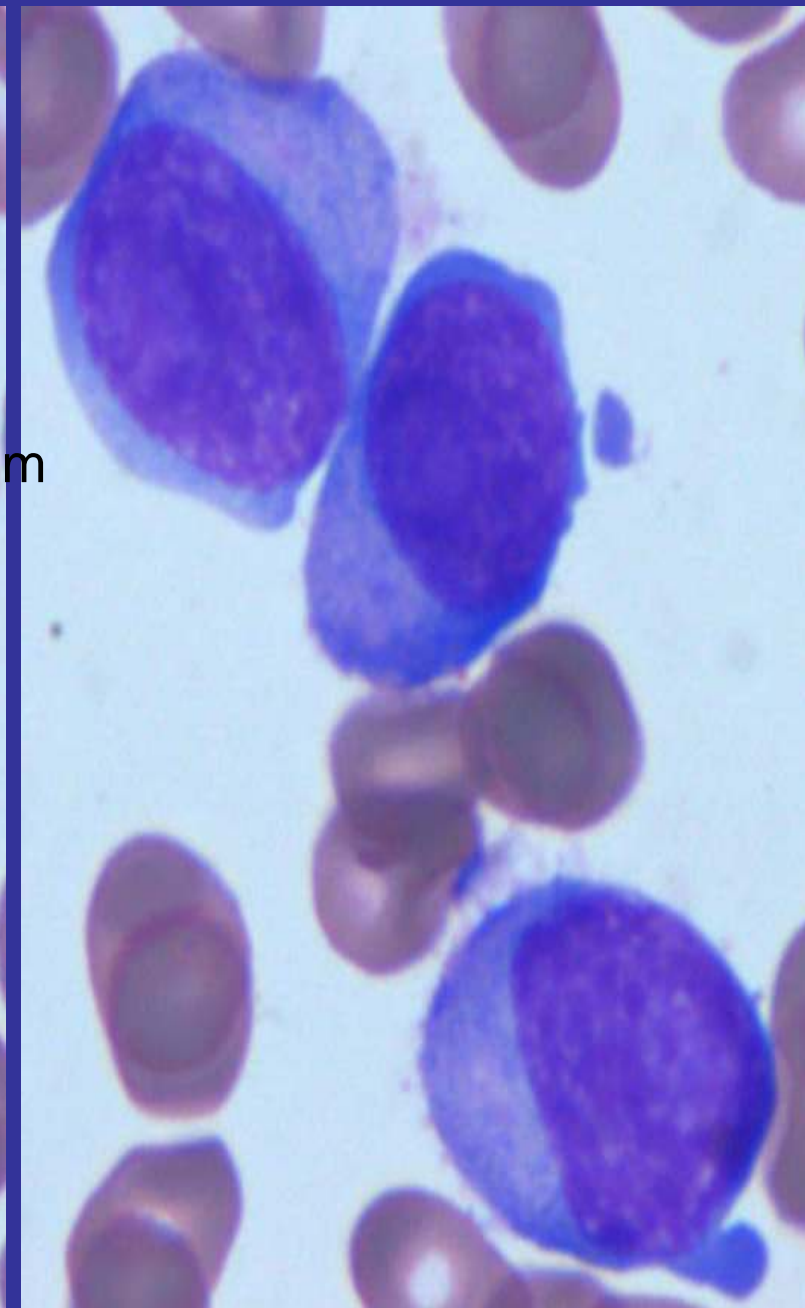
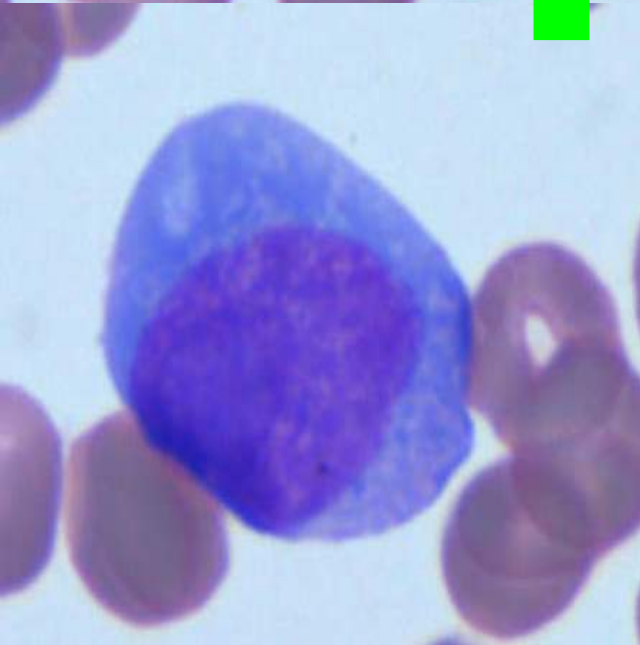
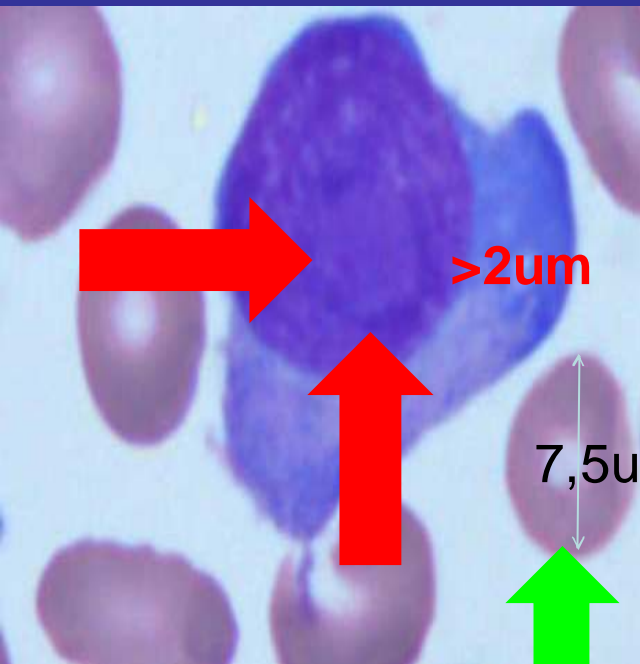
7,5 μm

<2 μm

1000x



Plazmablastyczny PCMs - CYT

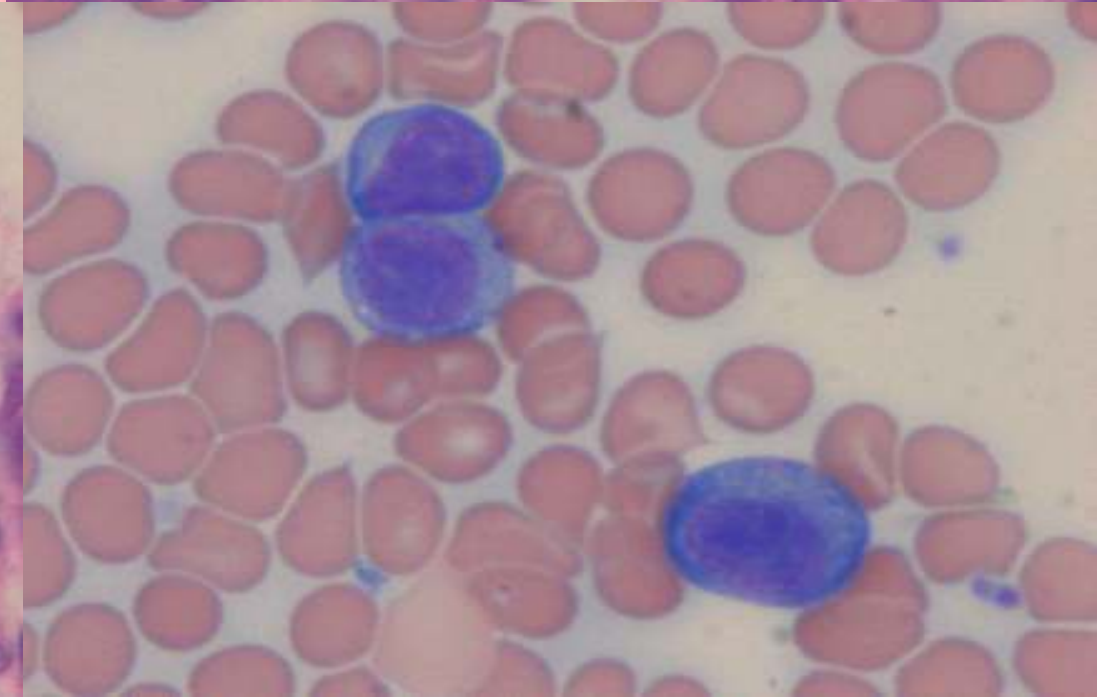
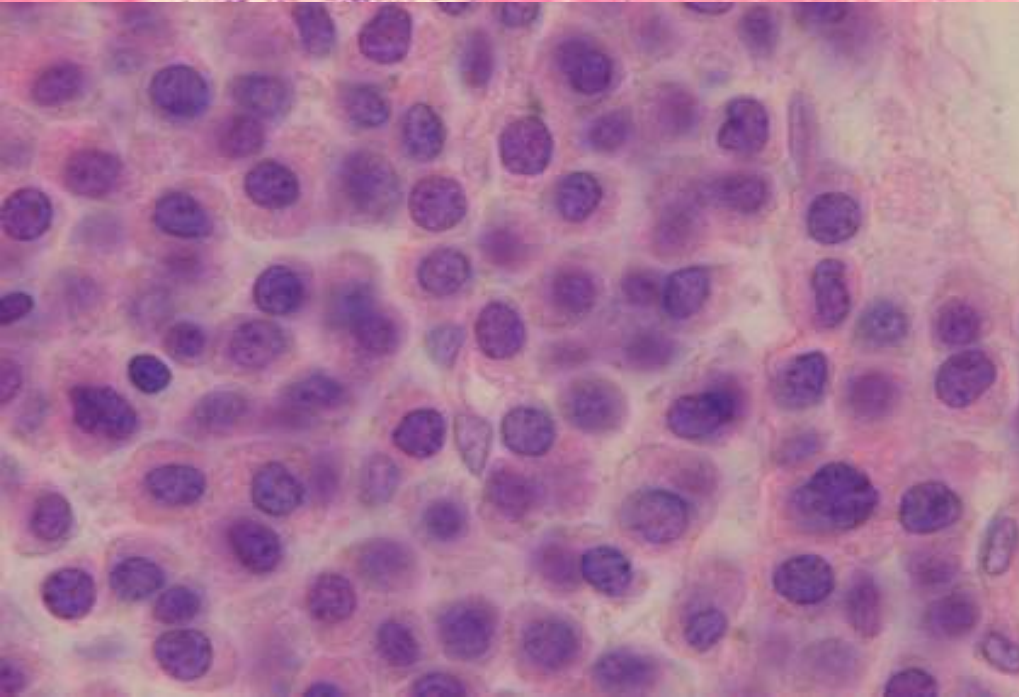
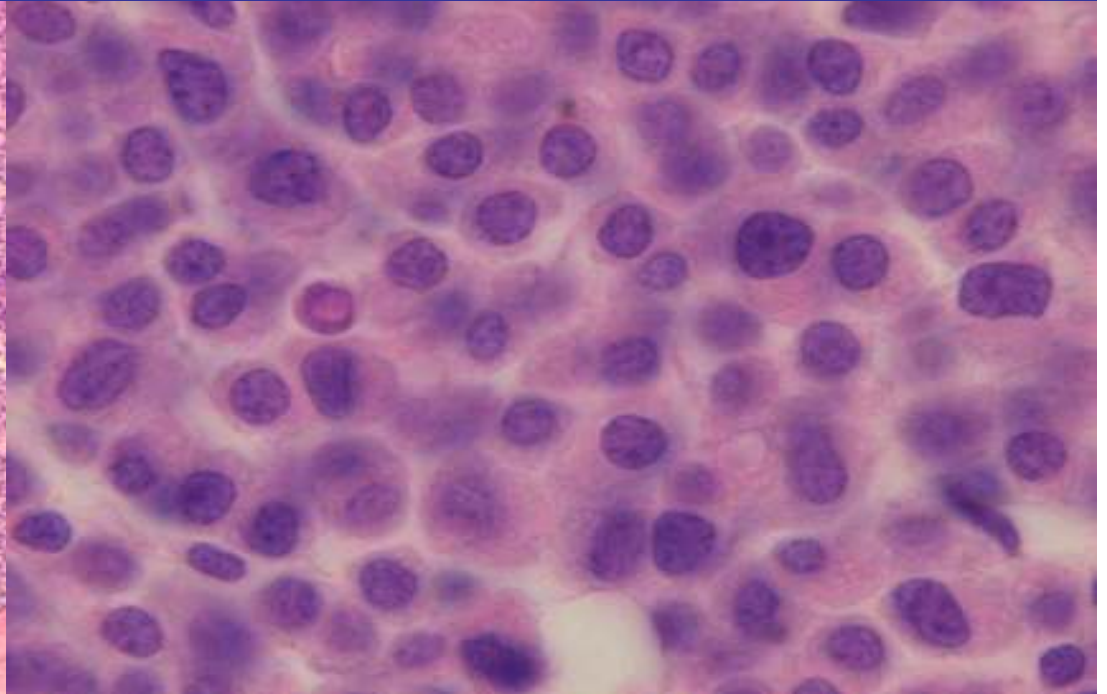
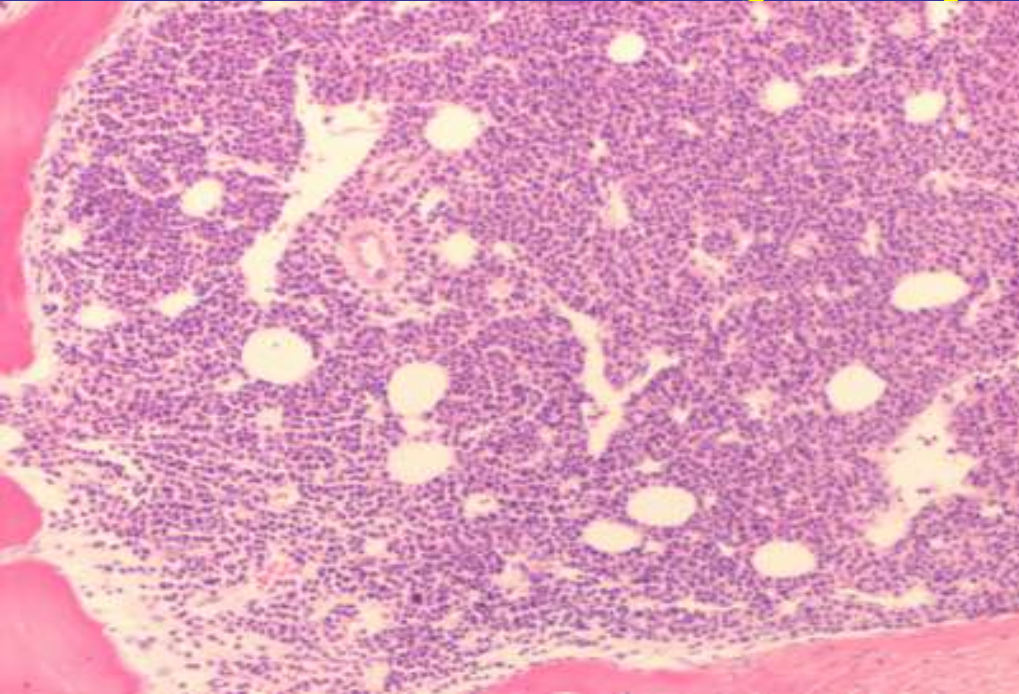


1000x



Diagnostyka PCMs

Niedojrzały PCM - HP/CYT





Diagnostyka PCMs

PCM - HP/CYT

- Znaczenie prognostyczne morfologii zostało wielokrotnie potwierdzone
- Zatem **masywne** zajęcie szpiku jak również **rozlany** typ nacieku i **plazmablastyczna** morfologia są ogólnie związane ze złą prognozą



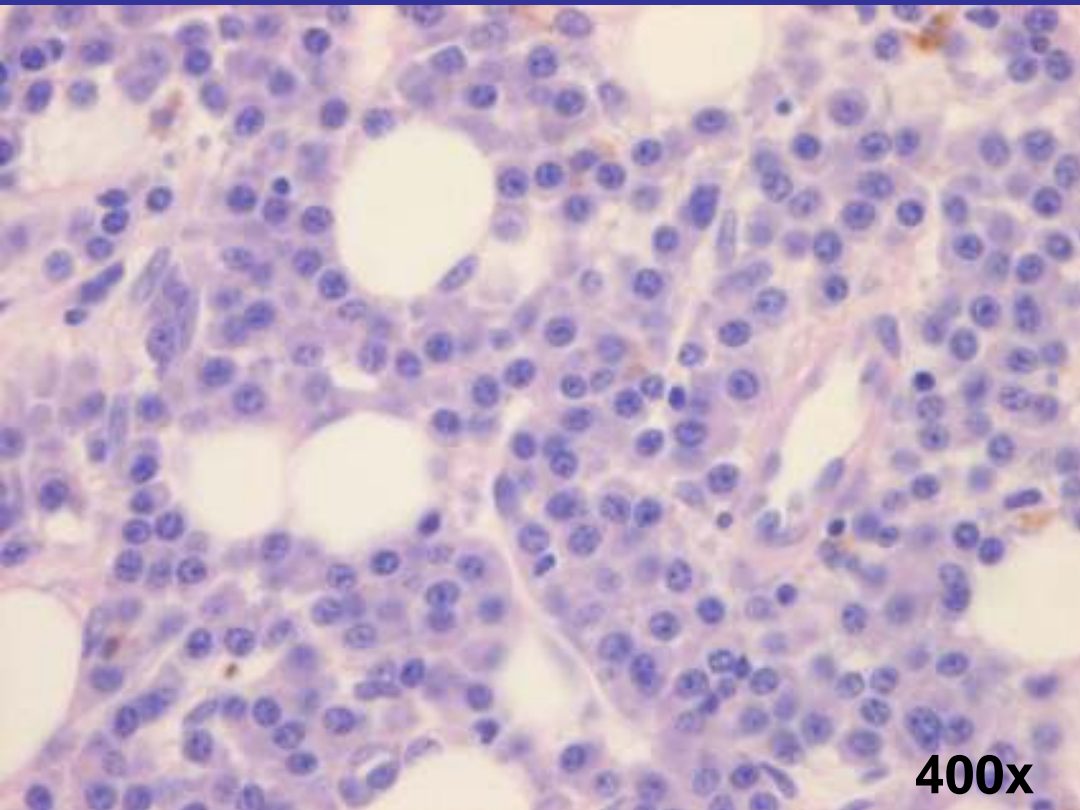
Diagnostyka PCMs

PCM - IH

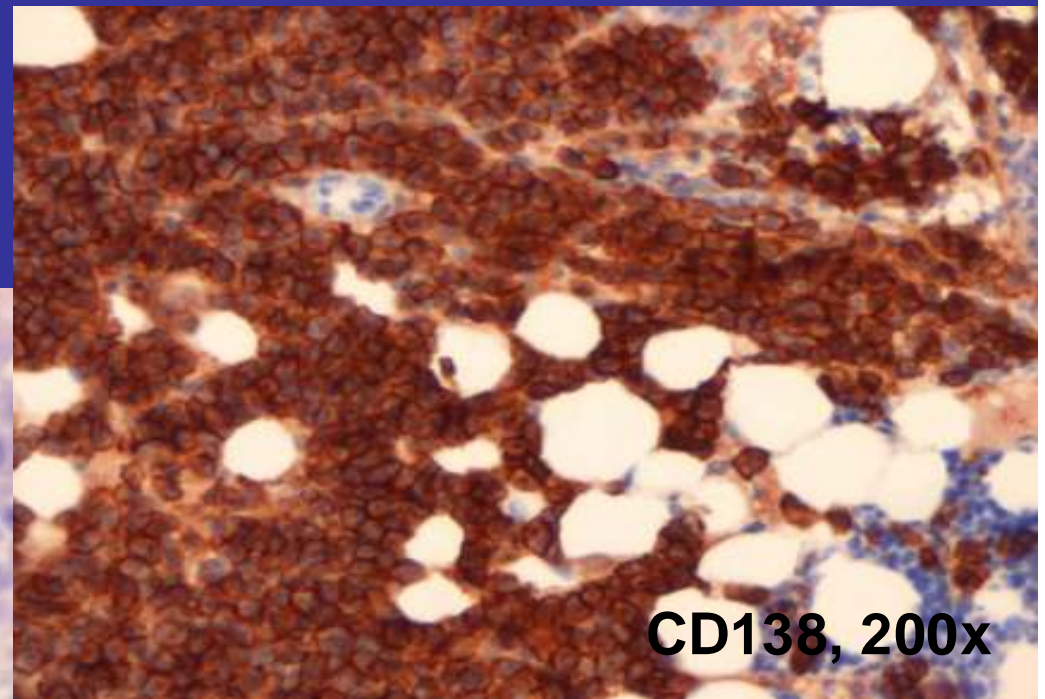
- W postaciach kostnych, ocenę cytologiczną rozmazu wraz z badaniem histopatologicznym **HP** trepanobiopsji pod kątem obecności plazmocytów uzupełnia się badaniem immunohistochemicznym **IH** zwykle z nielicznymi przeciwciałami (**vs38c, CD56, CD79a, CD138, ewentualnie CD38**)
- Ocena klonalności za pomocą oceny cytoplazmatycznej immunoglobuliny (**Ig**) w badaniu **IH** nie jest metodą polecaną do oceny odsetka **PCs**
- Kiedy próba oceny **IH** klonalności?



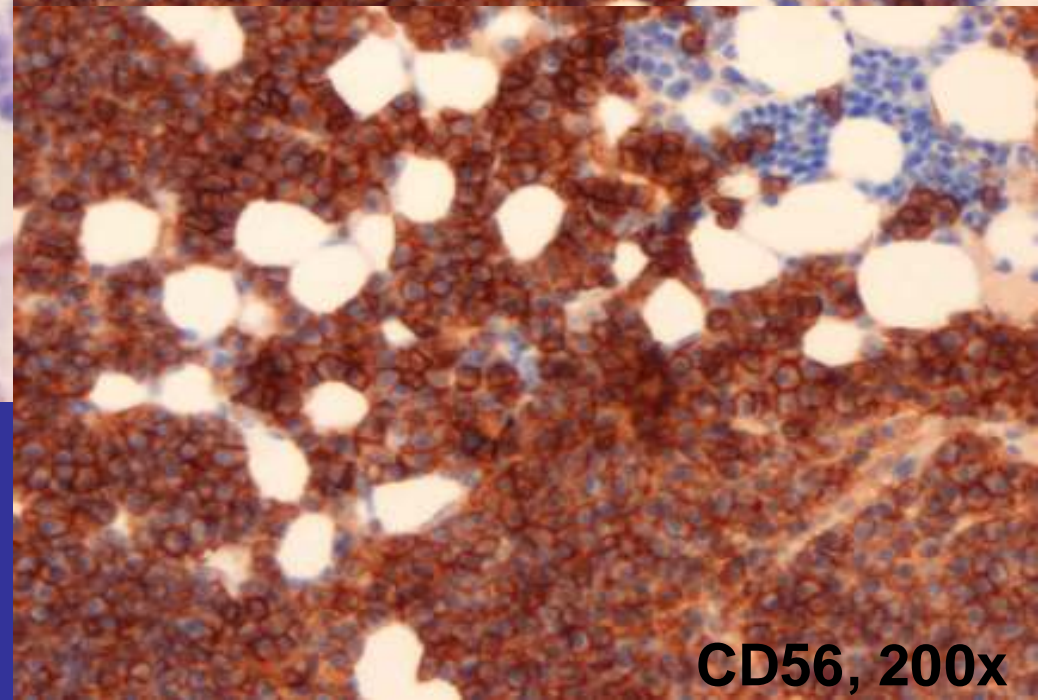
PCM - HP/1H



400x



CD138, 200x

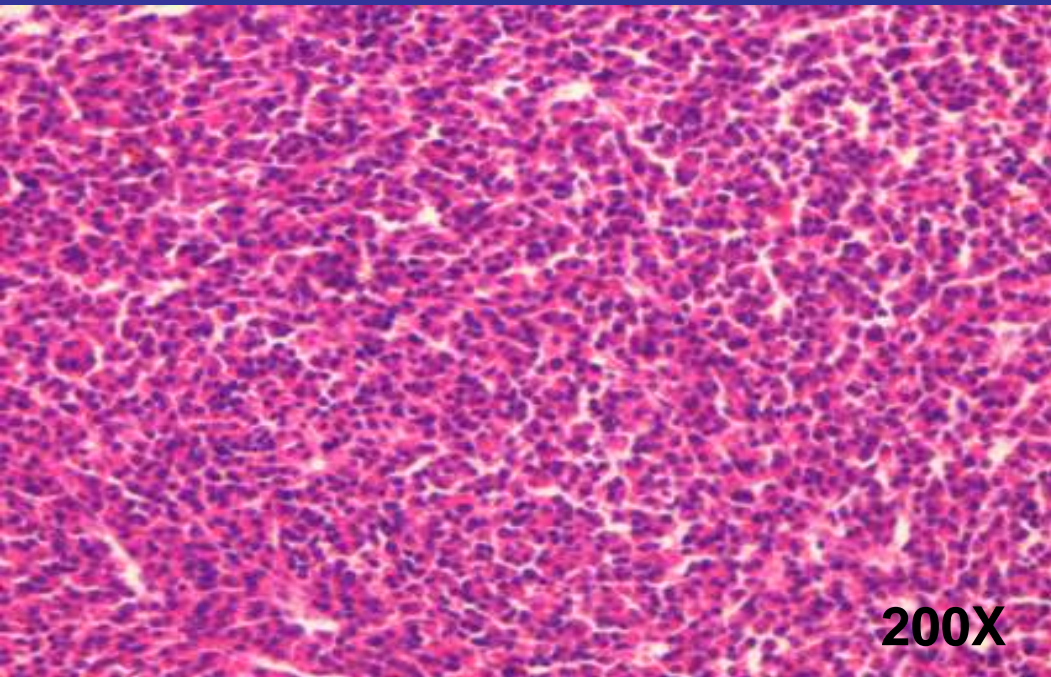


CD56, 200x

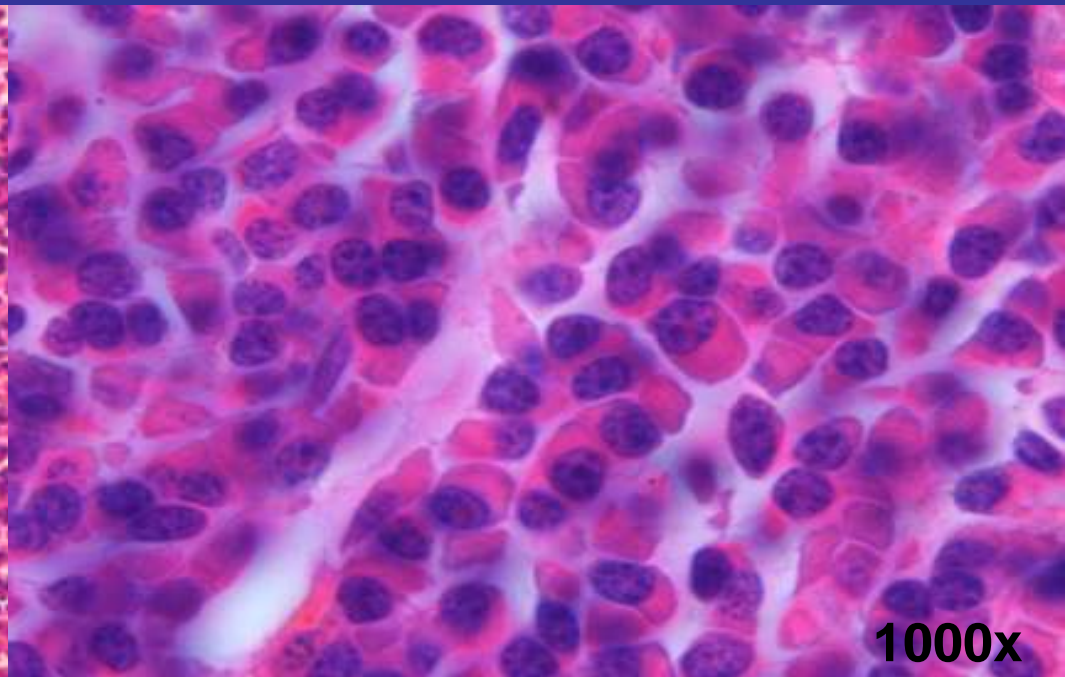


PCM - HP/IH

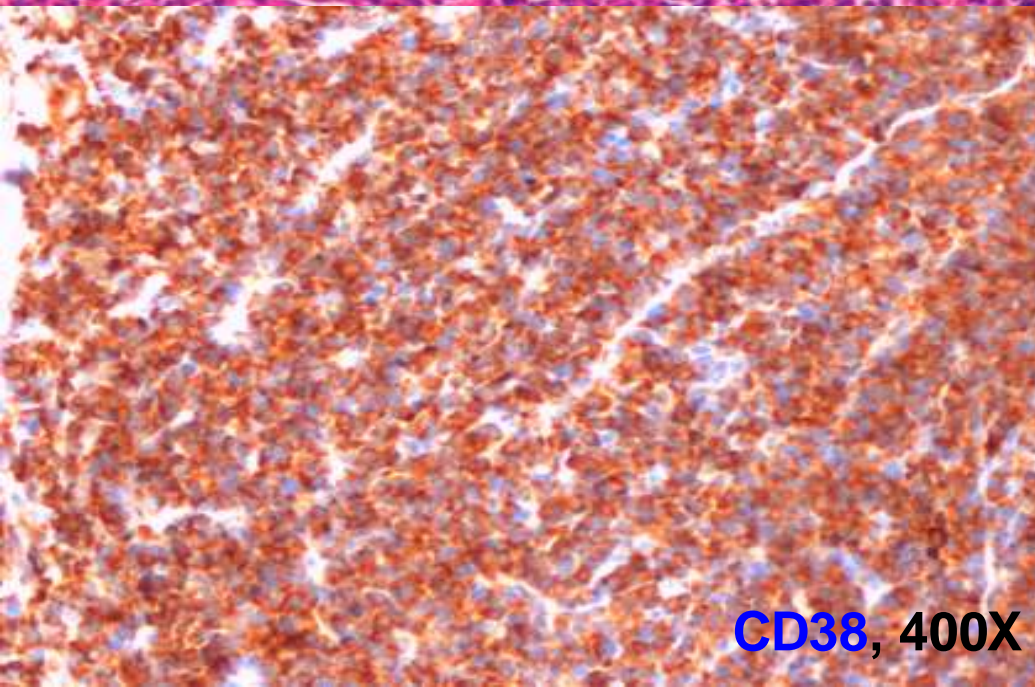
postać wysoko dojrzała ale CD56-/+



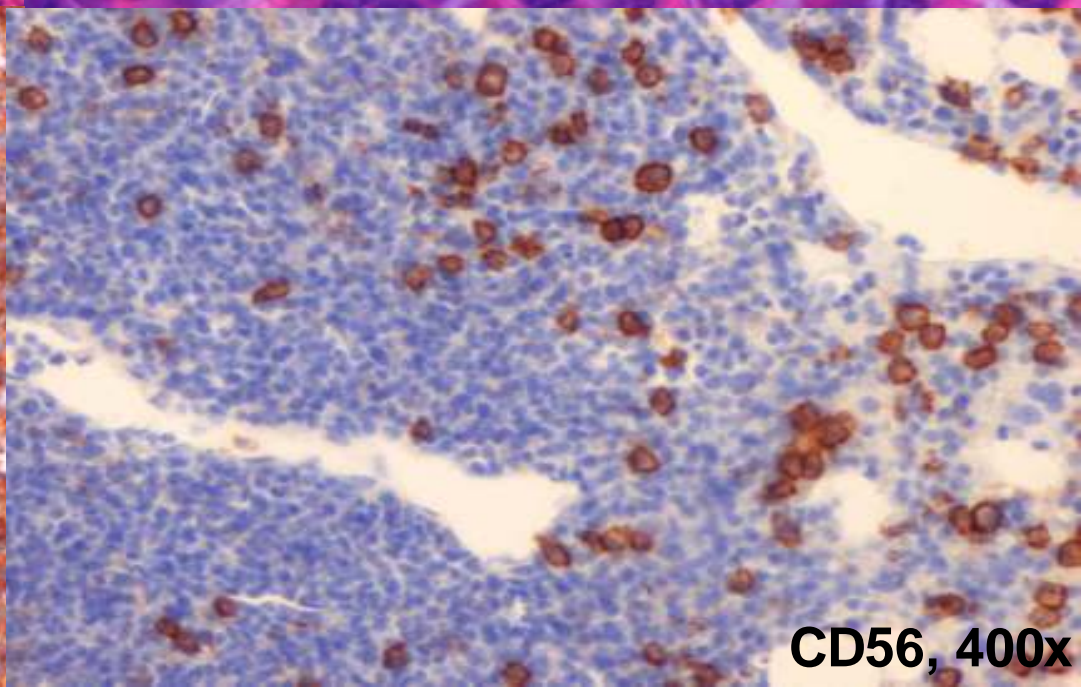
200X



1000x



CD38, 400X

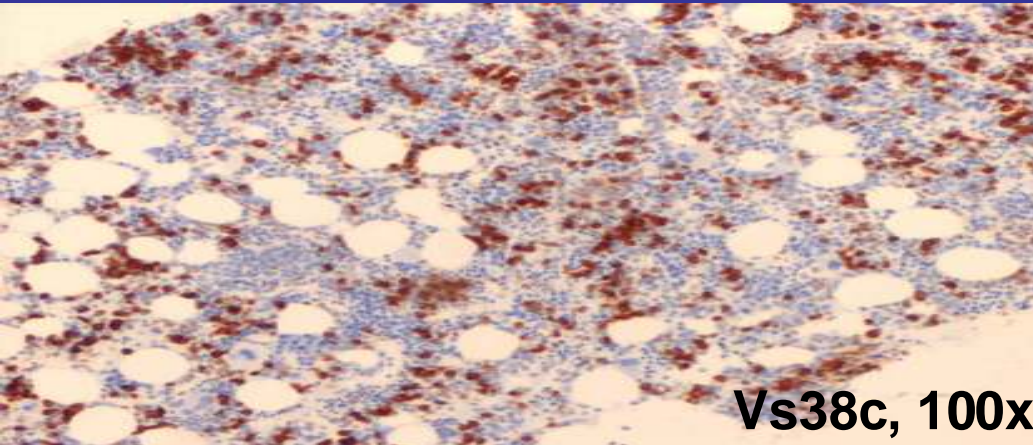


CD56, 400x

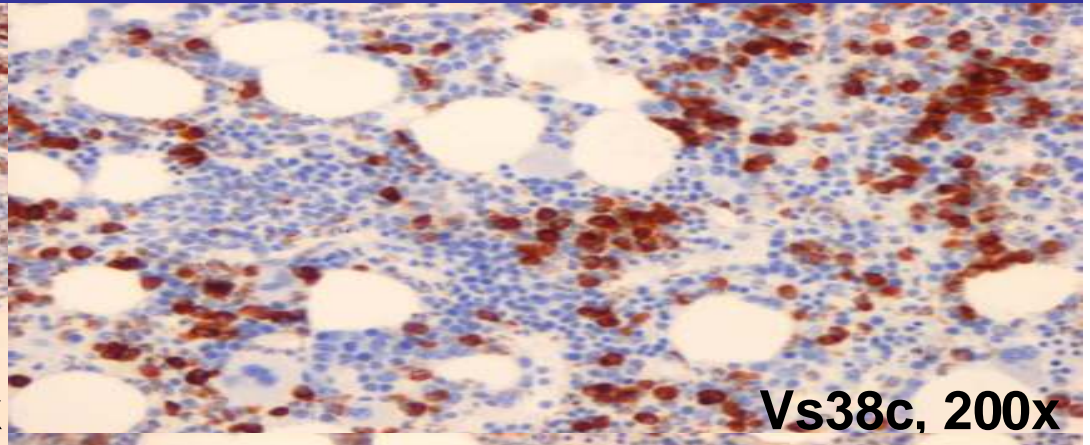


PCM - HP/IH

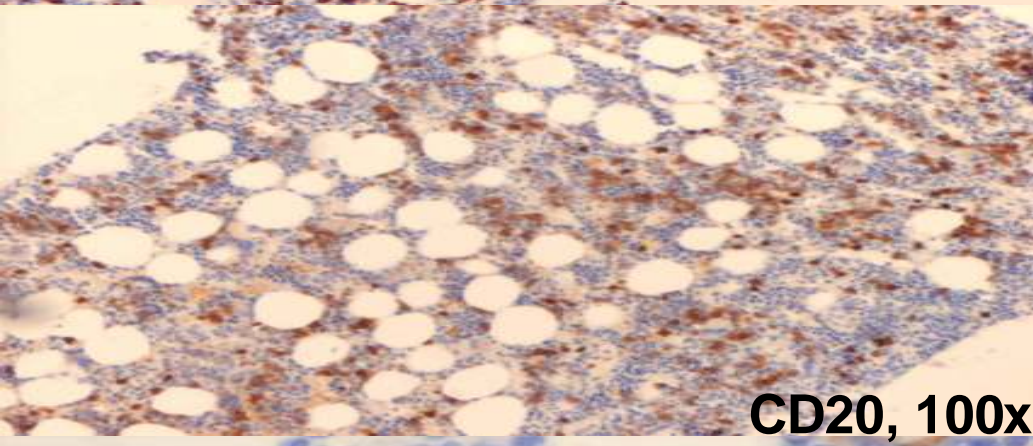
postać wysoko dojrzała CD20+/cyklina d1+



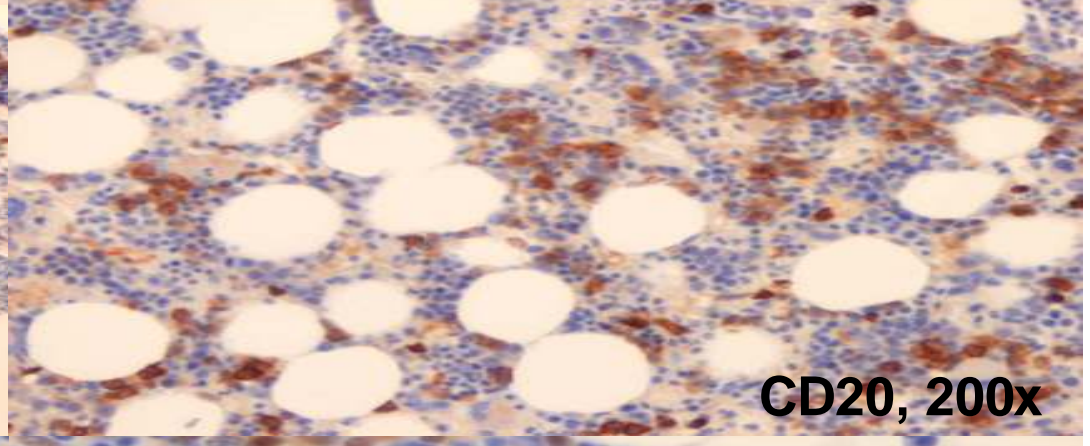
Vs38c, 100x



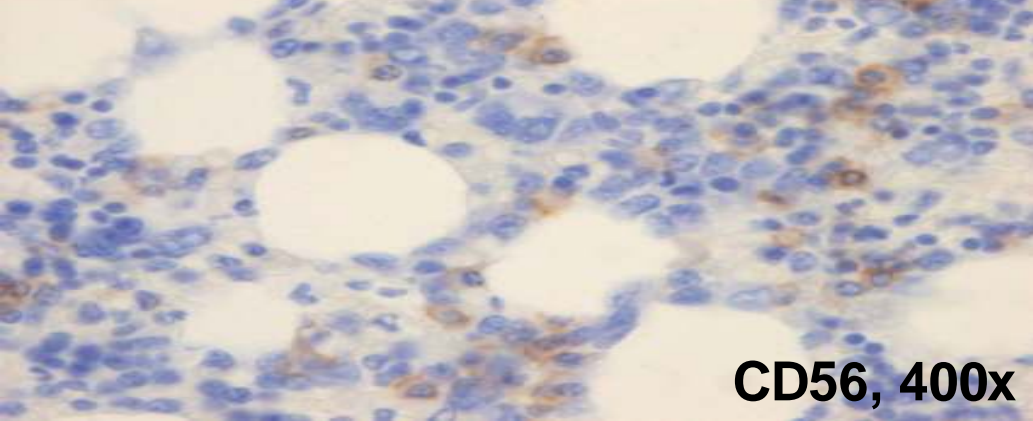
Vs38c, 200x



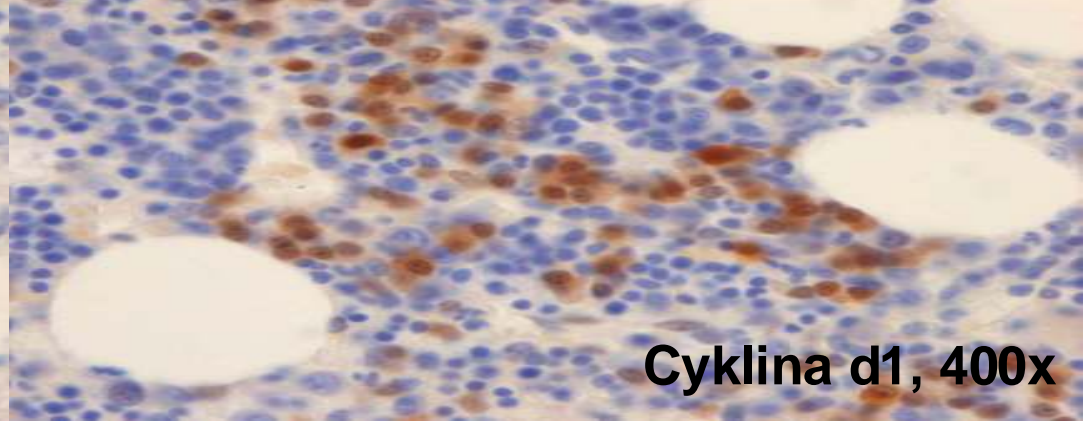
CD20, 100x



CD20, 200x



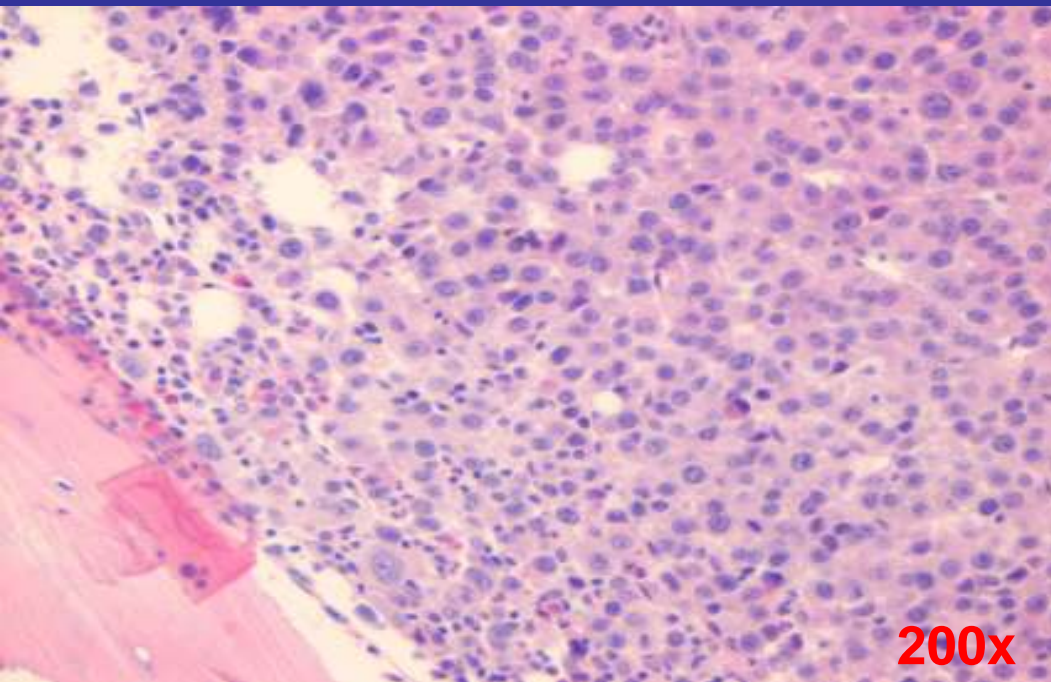
CD56, 400x



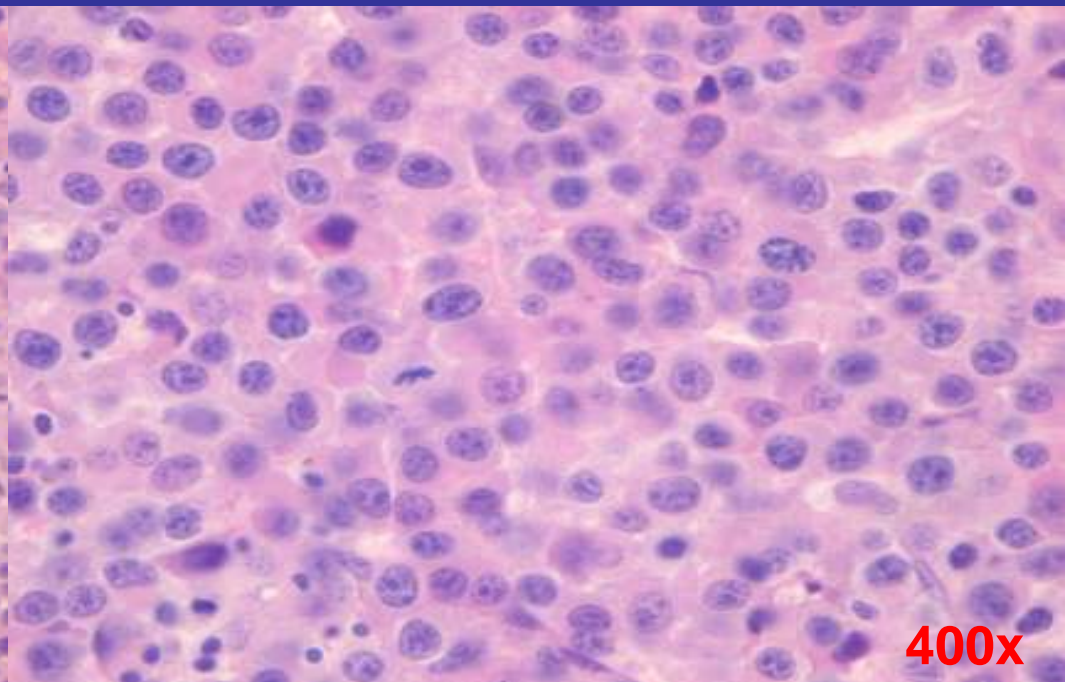
Cyklina d1, 400x



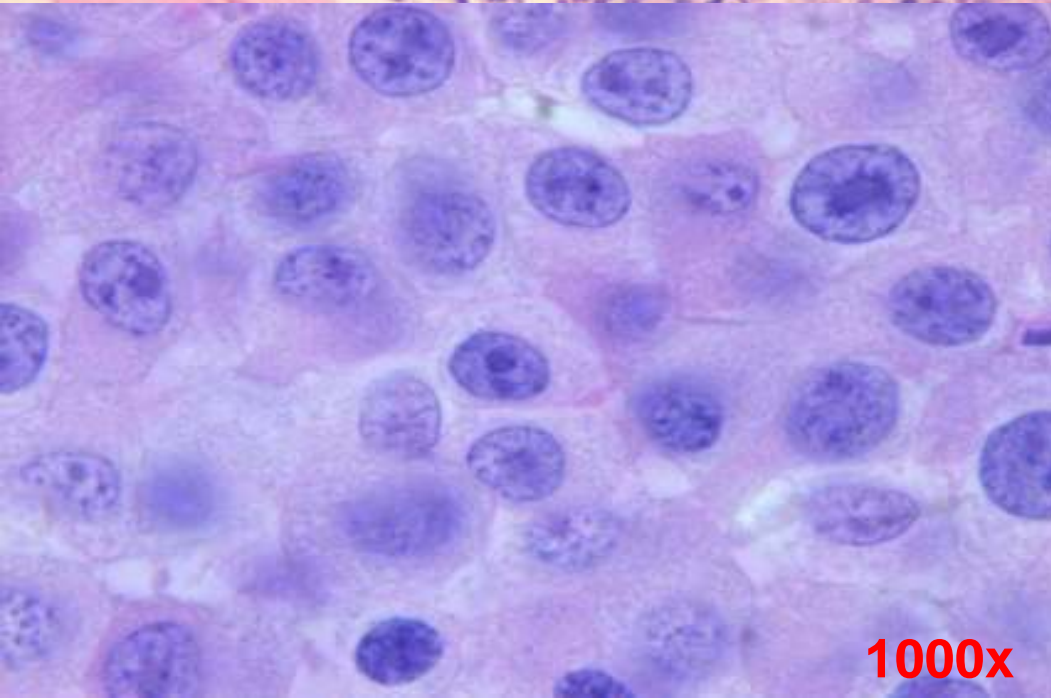
Plasmablastic PCM - HP



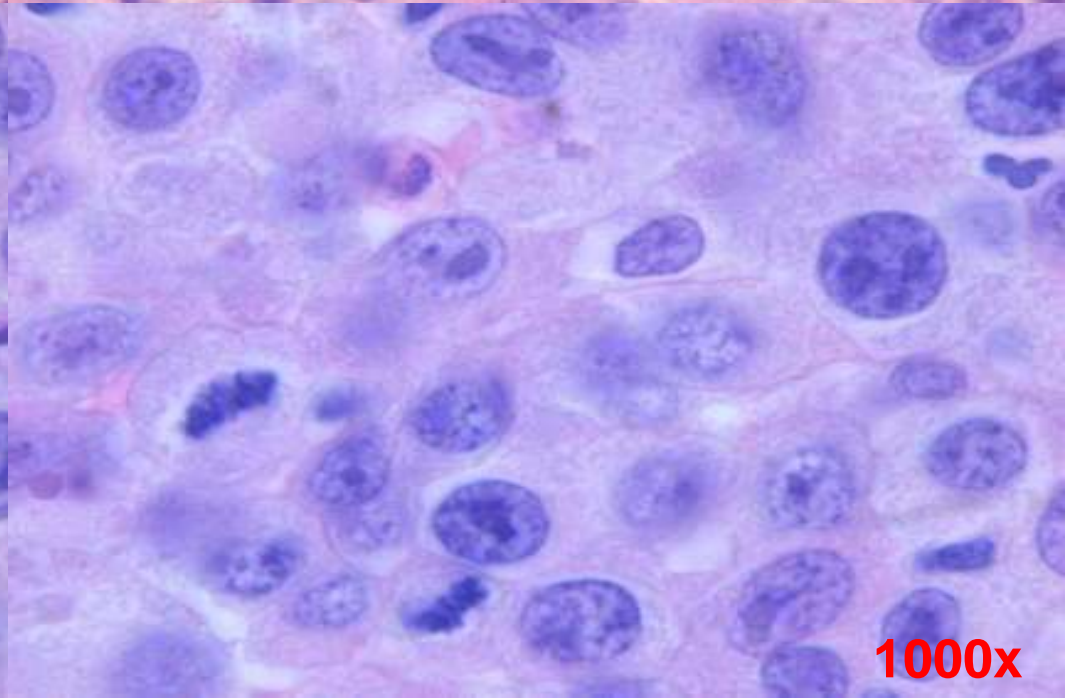
200x



400x



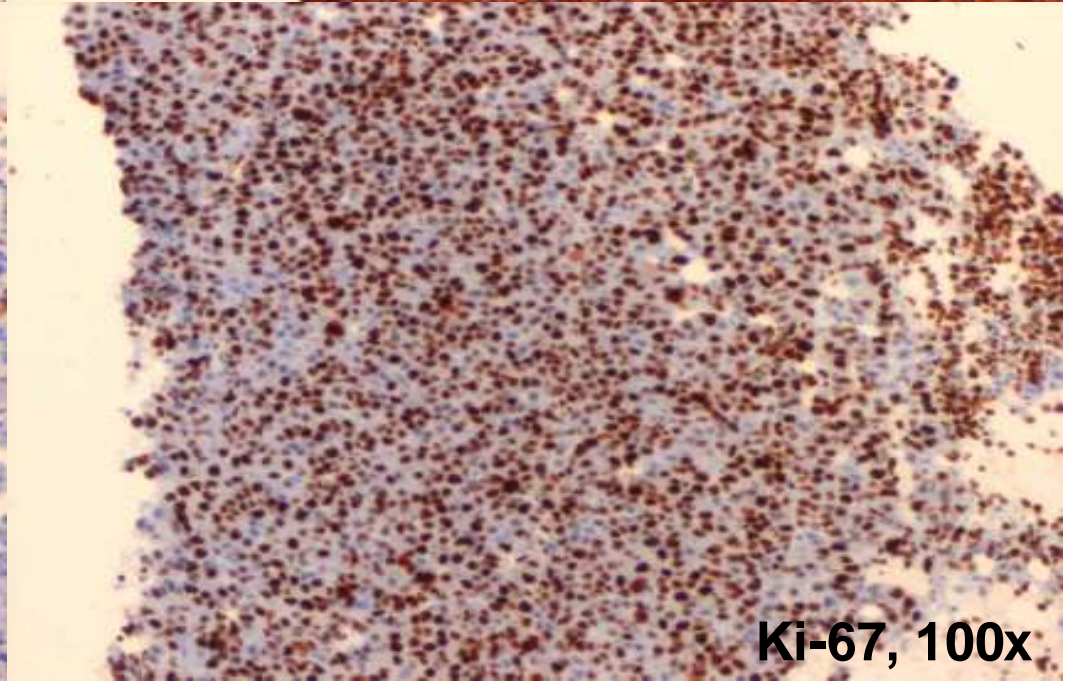
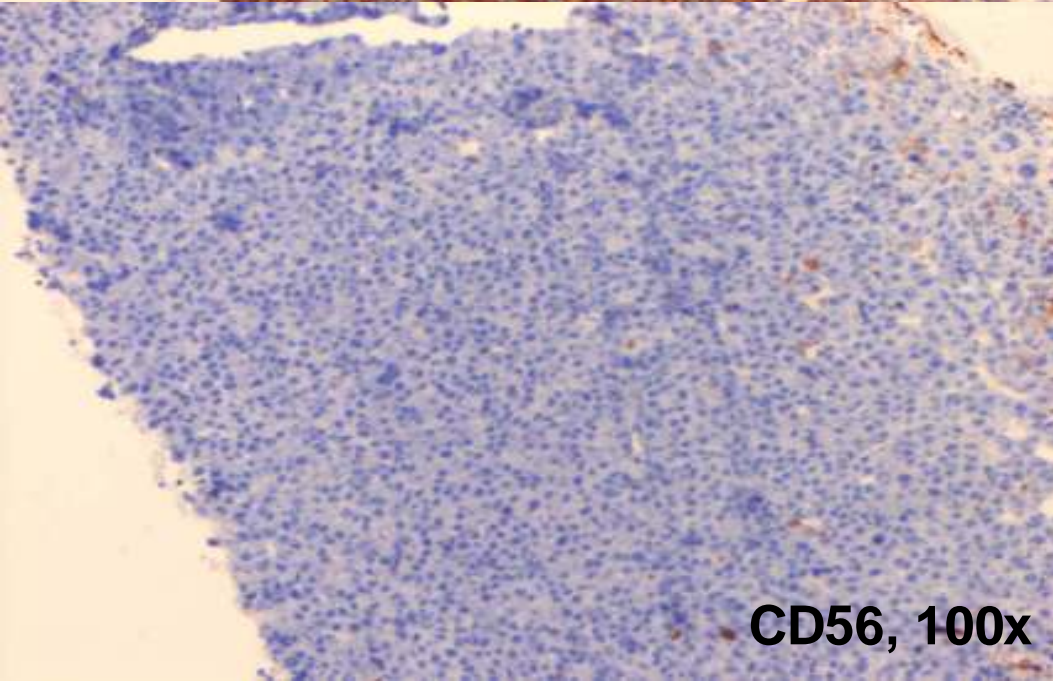
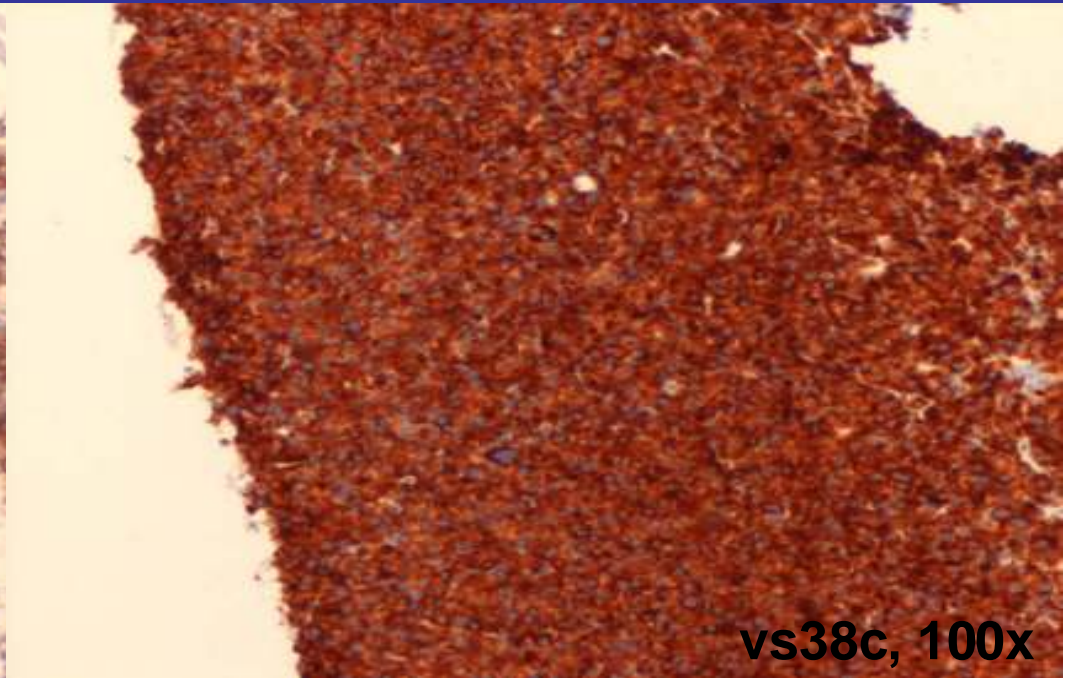
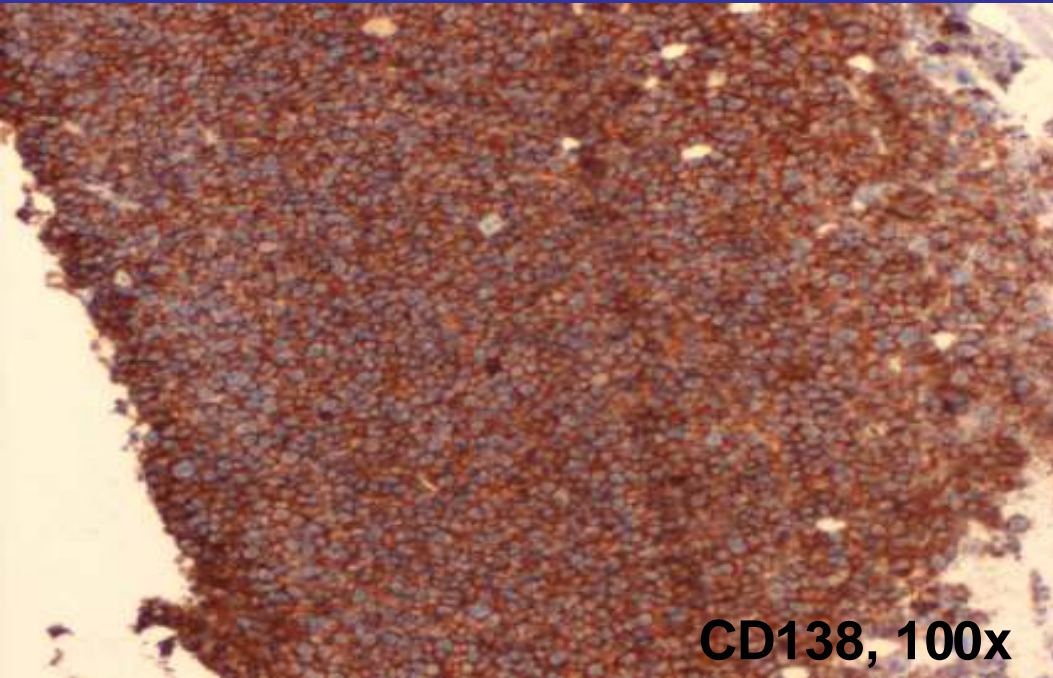
1000x



1000x

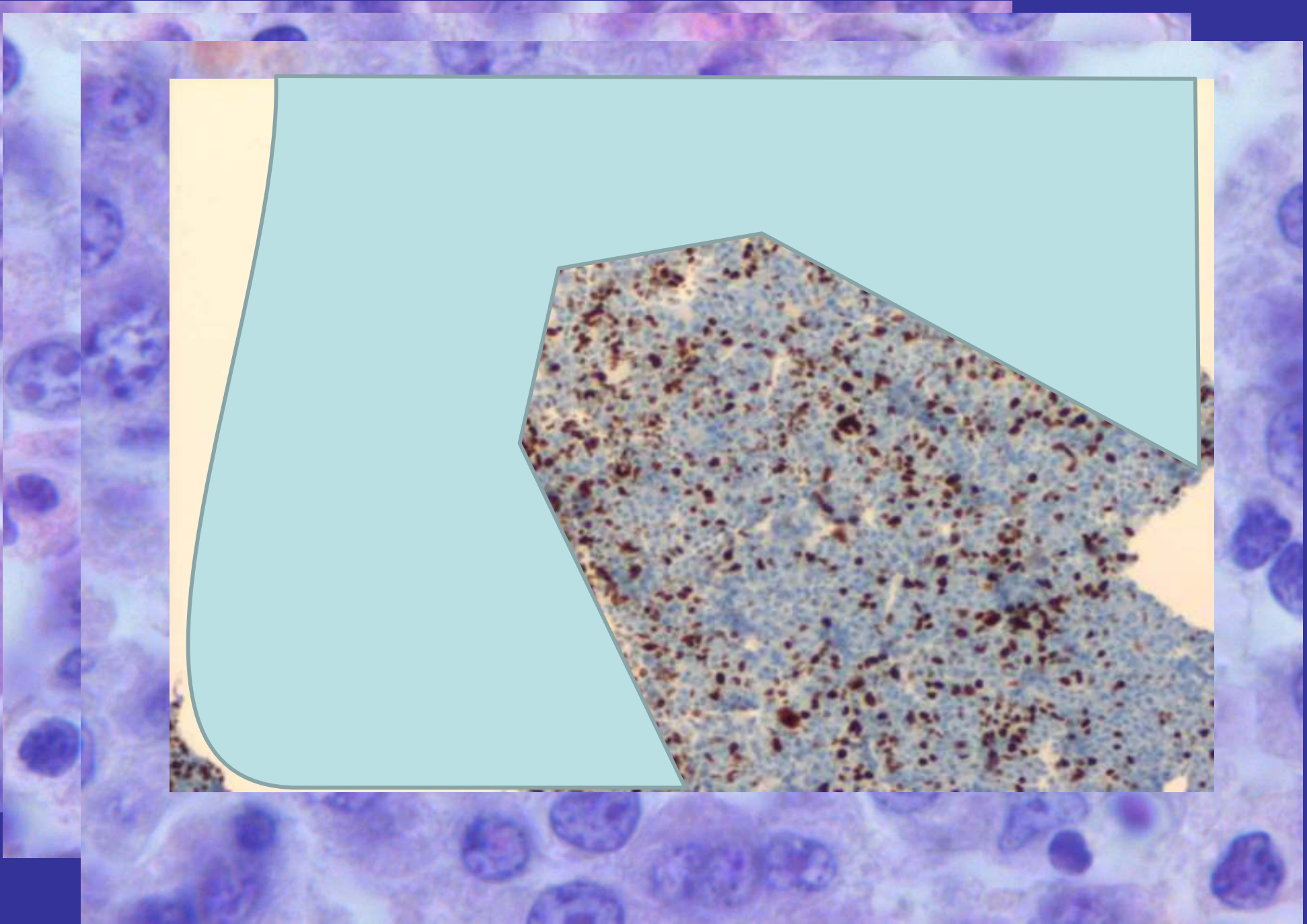


Plasmablastic PCM - IH (cd)





Plasmablastic PCM - HP/IH





Diagnostyka różnicowa PCNs

- W diagnostyce różnicowej należy zawsze uwzględnić:
 - pozawęłowego chłoniaka strefy brzeżnej systemu **MALT** z wybitnym różnicowaniem plazmatycznokomórkowym (lokalizacja pozaszpikowa - **plasmocytoma**)
 - chłoniaka limfoplazmocytoidego **LPL** (lokalizacja szpikowa)
 - W prezentacji pozakostnej nowotworu o wysokiej aktywności proliferacyjnej z cechami różnicowania plazmatycznokomórkowego, w algorytmie diagnostycznym, wykorzystuje się negatywne odczyny **IH: CD20(-) i PAX5(-)** i obecność dodatniego odczynu **CD138(+)** na nowotworowych komórkach plazmatycznych.



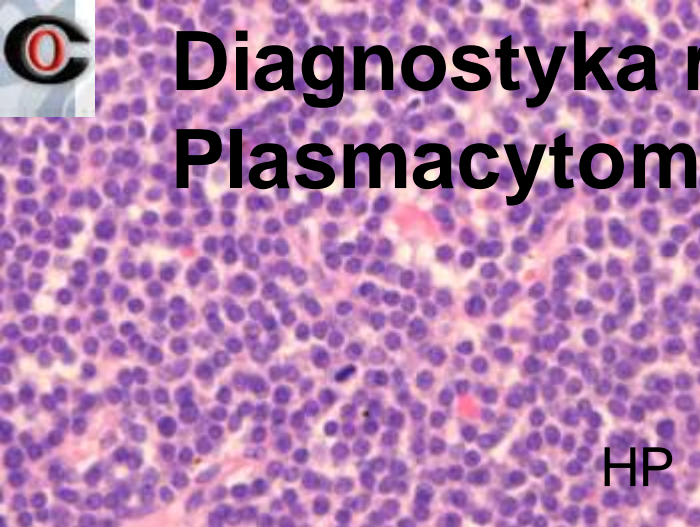
Diagnostyka różnicowa PCNs MW

- Fenotyp **PCs** w makroglobulinemii Waldenströma różni się od innych **PCNs** obecnością licznych antygenów limfoidalnych i pan-B:
 - **CD45(+)**
 - **CD19(+)/CD20(+/-)/FMIC7(+)/CD22(+)/CD23(-)/CD10(-)**
 - **CD38(+/-)/CD138(+/-)/CD56(-)**
 - **slg(+)** typowo z restrykcją kappa [Swerdlow i wsp., 2008]
 - **CD5(-)**

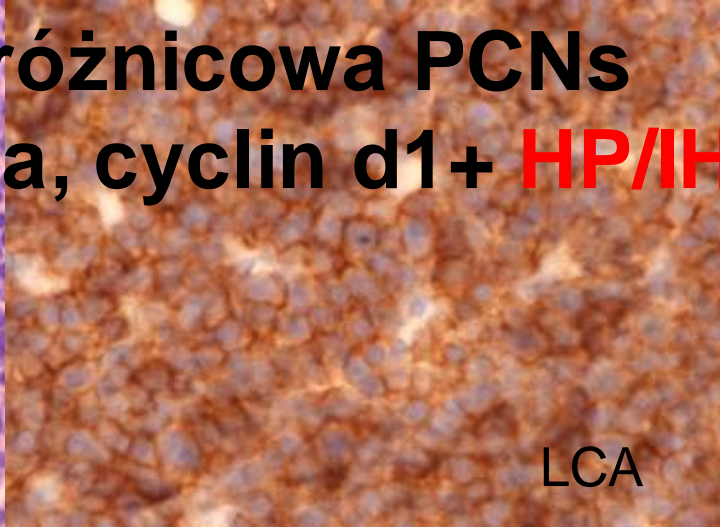


Diagnostyka różnicowa PCNs

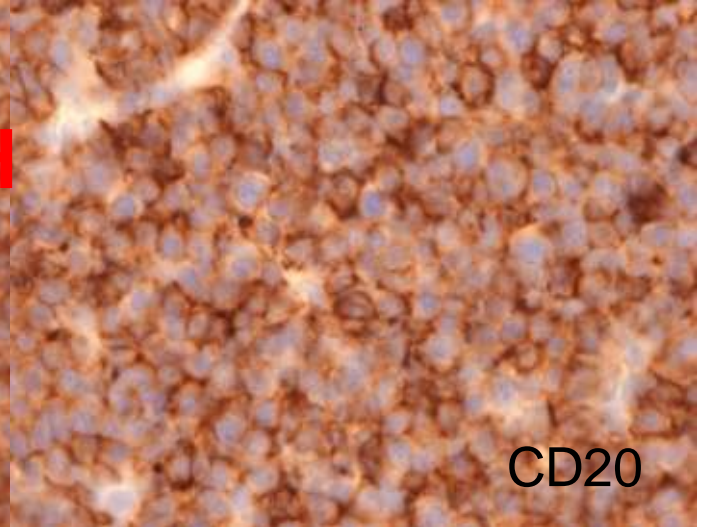
Plasmacytoma, cyclin d1+ **HP/IH**



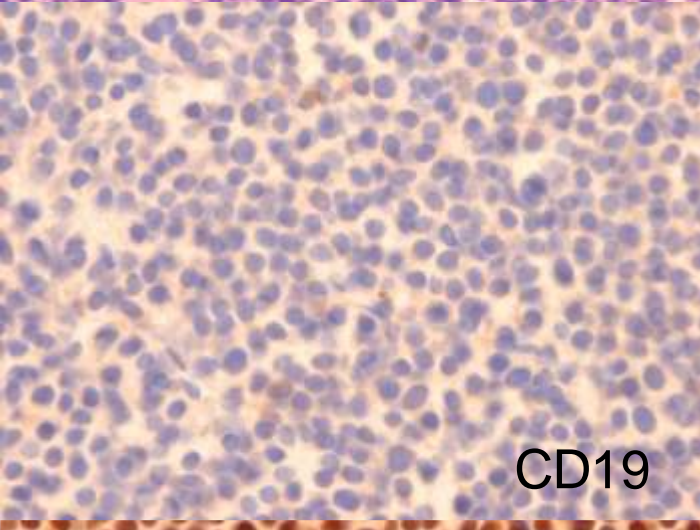
HP



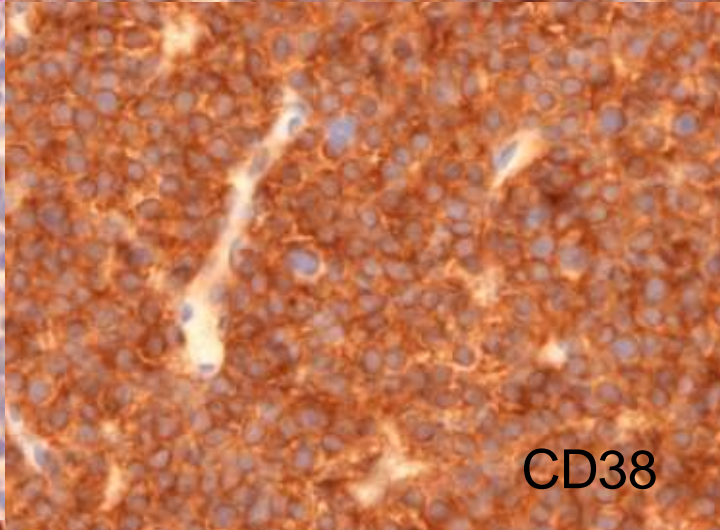
LCA



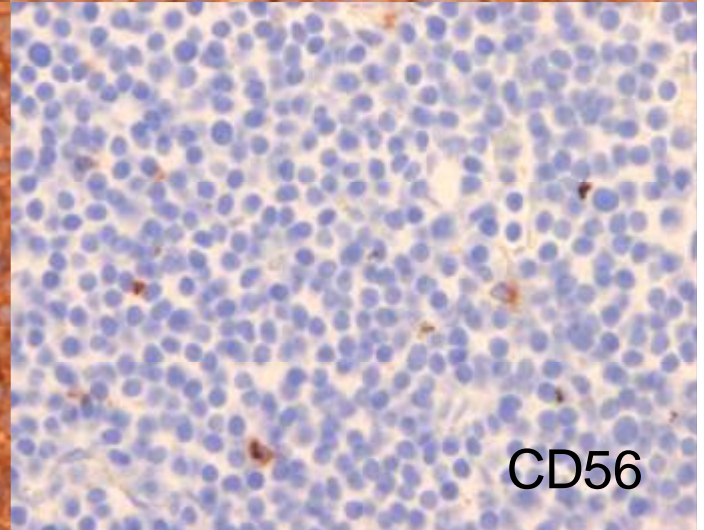
CD20



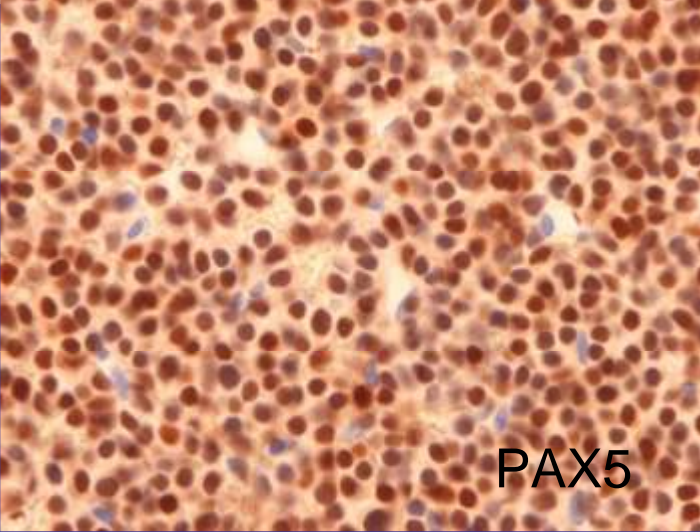
CD19



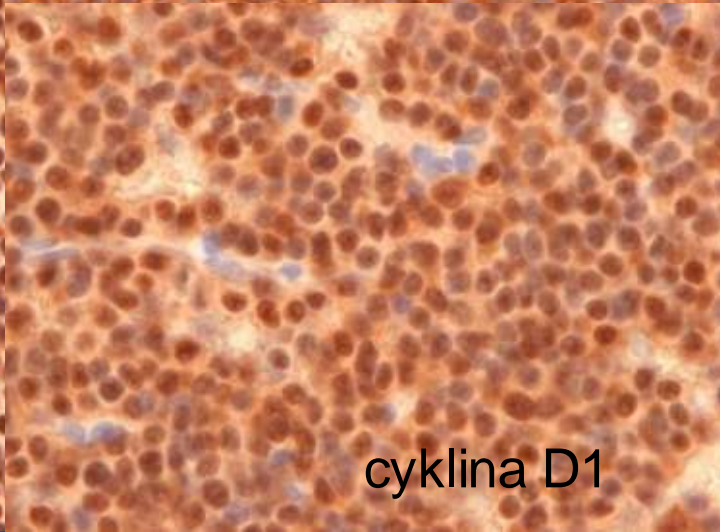
CD38



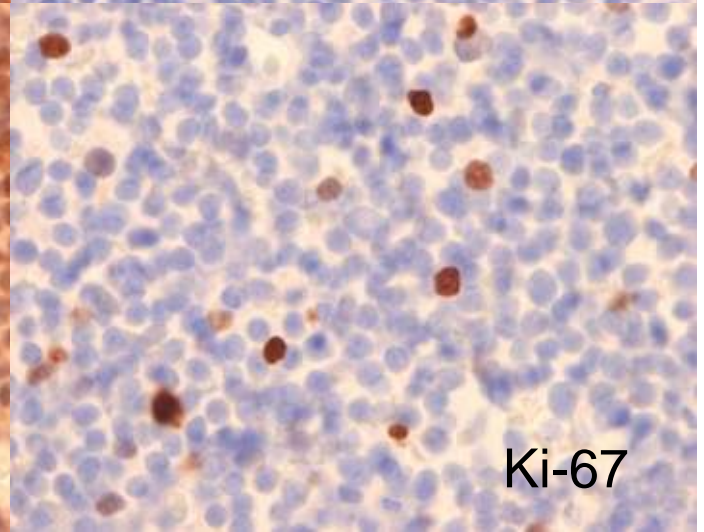
CD56



PAX5



cyklina D1



Ki-67



Diagnostyka różnicowa Plasmablastic PCM

- Przypadki takie wymagają różnicowania między :
 - *plasmablastic plasma cell myeloma*
 - *plasmablastic lymphoma*
 - innymi chłoniakami nie-Hodgkina o dużej agresywności klinicznej
- Przypadki takie: **CD20(-),PAX5(-),CD138(+)** często mają lokalizacje pozaszpikową, ale naciekają destrukcyjnie elementy kostne



Diagnostyka różnicowa rozrostów CD20 (-)/PAX5(-) /CD138(+)

www.nccn.org

- EBV(+)/HHV8(-) chłoniak plazmablastyczny
- EBV(+/-)/HHV8(+) pierwotny chłoniak wysiękowy CD30(+)
- EBV(-)/ALK(+) chłoniaka z dużych komórek B, ALK pozytywny (ALK(+))DLBCL): IgA(+)/lambda(+) /EMA(+)
- EBV(-)/ALK(-)/HHV8(-) plazmablastyczny szpiczak plazmatycznokomórkowy / plazmablastyczny plasmocytoma: IgG(+) lub A(+), kappa (+) lub lambda (+)



FCM

[Perez-Persona i wsp., 2007]

- umożliwia różnicowanie **B-NHLs** z cechami różnicowania plazmatycznokomórkowego z **PCNs**
- Immunofenotypowanie z dużo szerszym panelem przeciwciał niż w **IH**, bardziej wiarygodna interpretacja niż w **IH**
- pozwala na ocenę czynników prognostycznych w **PCNs**
- w badaniu **FCM** komórek plazmatycznych jest mniej niż w **HP/IH** z powodu:
 - ✓ różnic w typach materiałów do badań **HP** i **FCM**
 - ✓ utraty części **PCs** w trakcie preparatyki cytometrycznej [Smock i wsp., 2007, Lin i wsp., 2004, Rawstron i wsp., 1997]



FCM

- większa czułość **FCM** w stosunku do badań **HP/IH**, w diagnostyce **MGUS**, wynika z ilościowego wykrywania obu subpopulacji PCs: prawidłowej i patologicznej
- Najważniejszą cechą różniącą **MGUS** od innych **PCNs** jest identyfikacja znaczącego odsetka prawidłowych **PCs** wymieszanych z komórkami patologicznymi (w przypadkach innych **PCNs** może występować mały odsetek prawidłowych **PCs** < 3%)



Prawidłowe vs patologiczne PCs

[Mc Kenna i wsp., 2008, Rawstron i wsp., 2008, Perez-Persona i wsp., 2007, Perez-Persona i wsp., 2009, Ocqueteau i wsp., 1998].

- **Prawidłowe PCs:** CD38(+)^{higher}/CD19(+)/CD56(-)
- **Patologicznymi PCs:** CD38(+)^{weaker}/CD19(-)/CD56 (+/-)



European Myeloma Network

Rawstron i wsp., 2008

- pierwsza próba: CD38, CD138 i CD45
- pierwsze bramkowanie powinno obejmować populację komórek CD38(+) vs. CD138(+)
- do oceny patologicznych PCs minimalny panel: CD19 i CD56
- preferowany panel powinien obejmować również ocenę ekspresji: CD20, CD117, CD28 i CD27 o znaczeniu prognostycznym



Patologiczne PCs - FCM

[San Miguel i wsp., 1986]

- PCNs traci ekspresję antygenów pan-B to jednak < niż 15% nowotworów z komórek plazmatycznych posiada ekspresję antygenów: CD19, CD20, CD22 i rzadko CD10
- ekspresja CD20 w PCNs jest związana z bardziej limfoidną morfologią i obecnością translokacji t(11;14)
- obecność slg >1/3 przypadków PCNs
- bardziej charakterystyczna dla nowotworowych komórek plazmatycznych jest nieprawidłowa ekspresja antygenów niż ocena monoklonalności



Patologiczne PCs - FCM

- CD117 (33%)
- CD13 i CD33 (25%)
- CD40 (70%) i CD28 (40%)
- CD20, CD45, slg korelują ze złą prognozą
- CD56 występuje na większości przypadków PCNs (zasiedlanie)
 - w zaawansowanej fazie choroby - CD56(-)
- Utrata ekspresji CD56 i wyższa ekspresja CD44 są związane, na przykład, z pozaszpikową prezentacją nowotworu
- Utratę ekspresji CD27 obserwuje się często podczas progresji choroby



Immunofenotypowe cech prognostyczne

- Ekspresja **CD28** jest związana z wysoką aktywnością proliferacyjną co **pogarsza rokowanie** (skrócenie przeżyć wolnych od zdarzeń niepożądanych, EFS) a ekspresja **CD117** jest związana z **lepszim rokowaniem**
- Fenotypy komórek nowotworowych:
 - **CD56(-) / CD117(-) lub CD56(-) /CD28(+)** gorsze rokowanie



PETHEMA

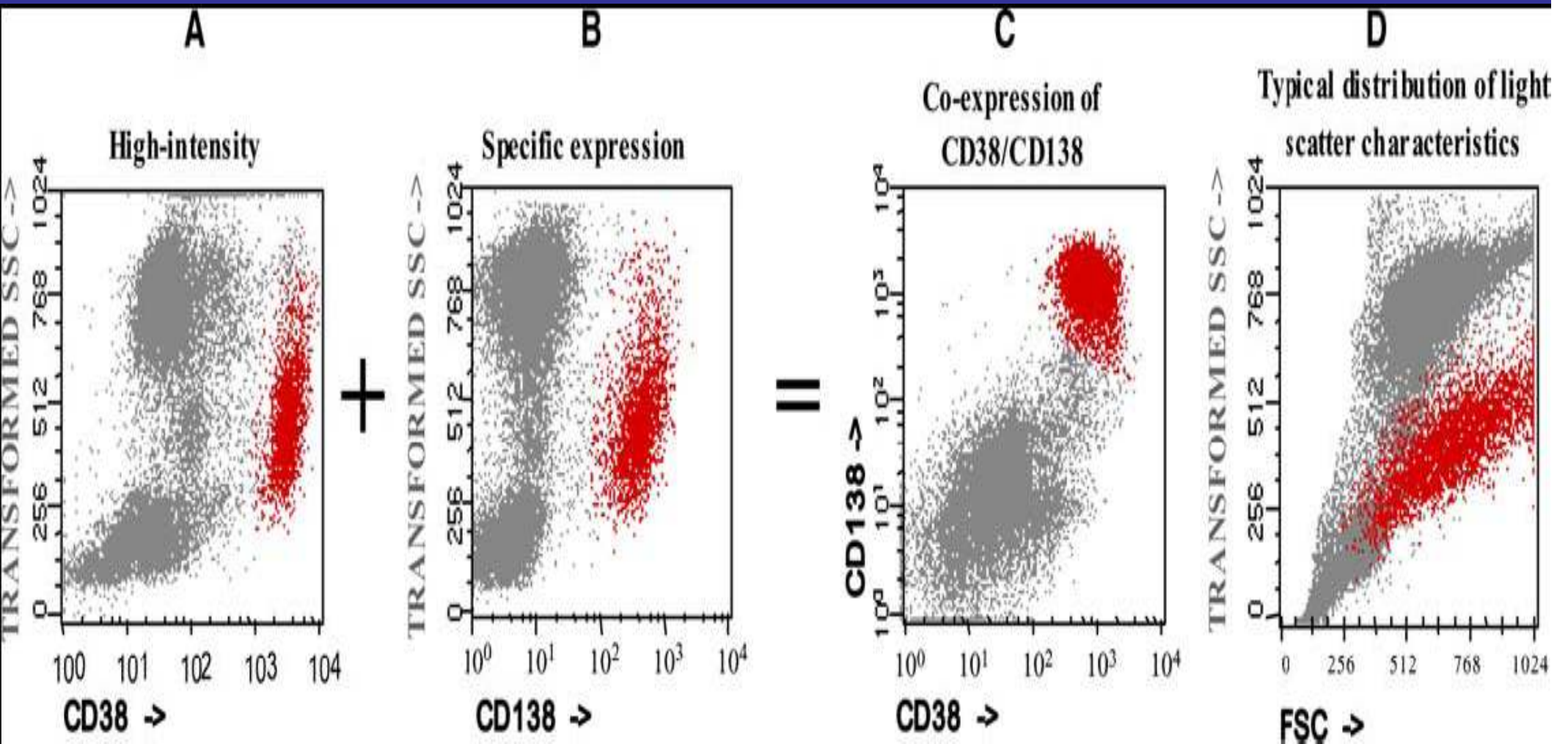
[Mateo i wsp., 2008]

- klasyfikacja prognostyczna:
 - I grupa złego rokowania: **CD28(+)/CD117(-)** (PFS 30 mo)
 - II grupa pośredniego ryzyka: **CD28(-)/CD117(-)** (PFS 37 mo)
 - III grupa dobrego rokowania: **CD28(-)/CD117(+)** (PFS 45 mo)

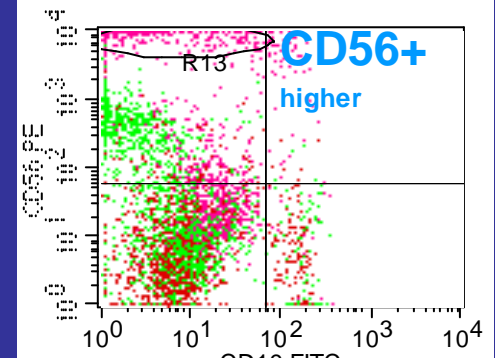
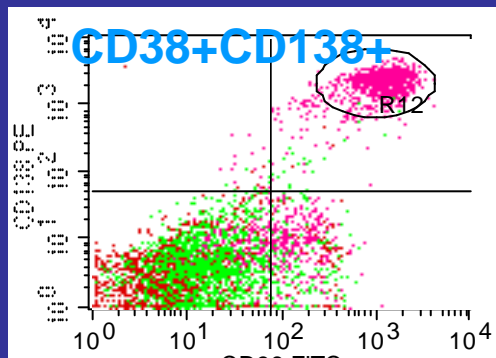
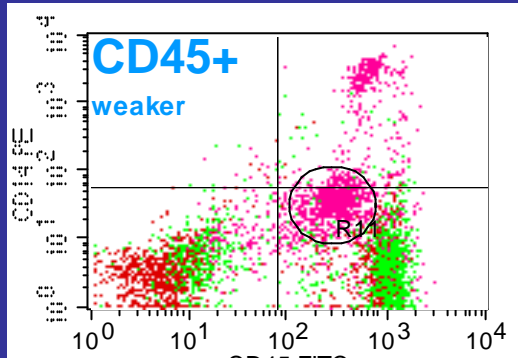
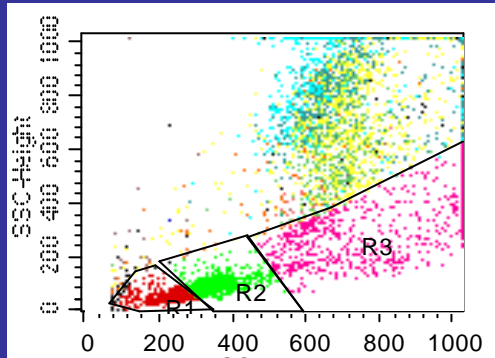
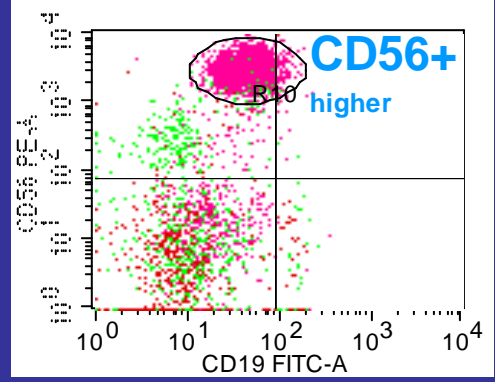
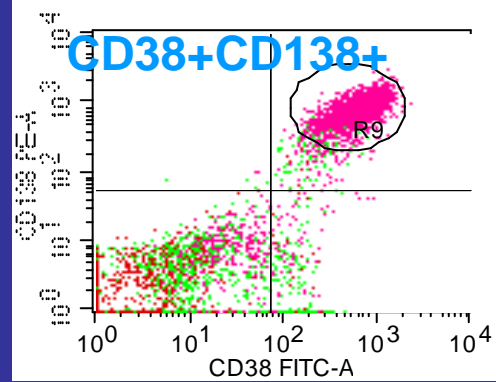
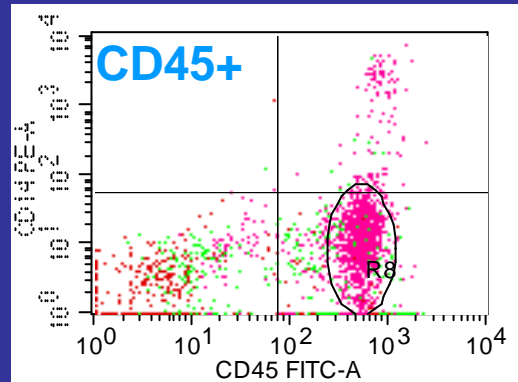
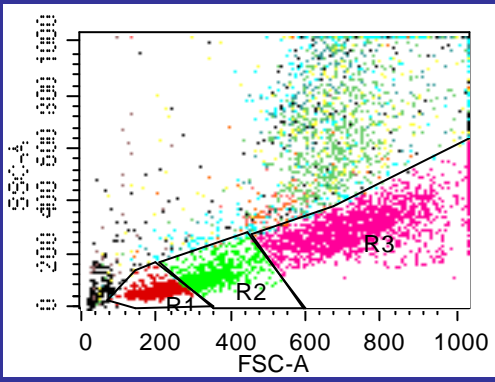
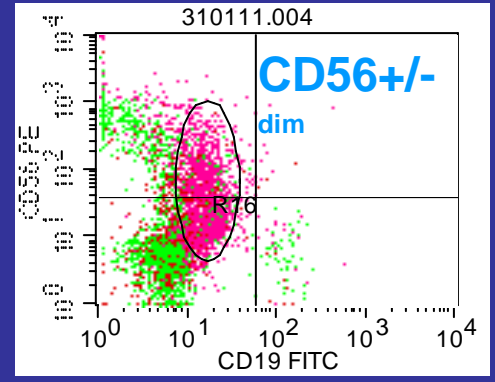
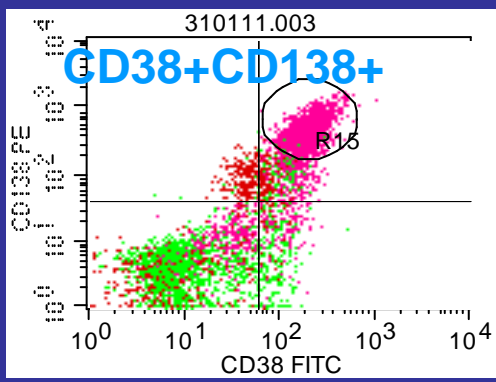
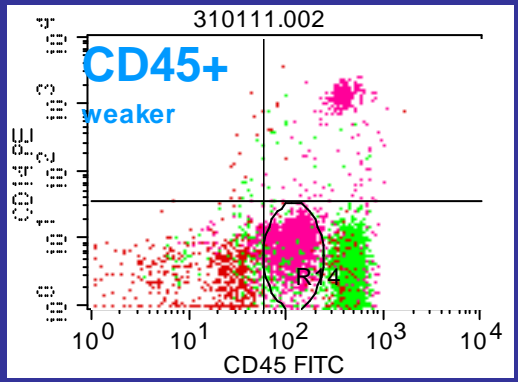
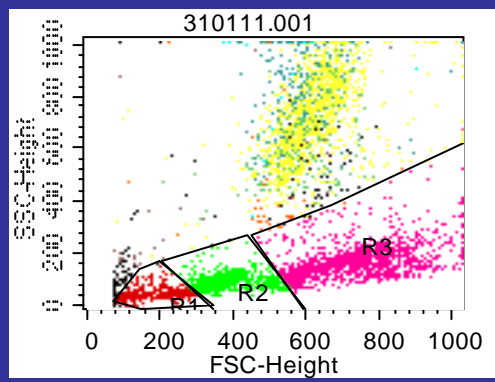
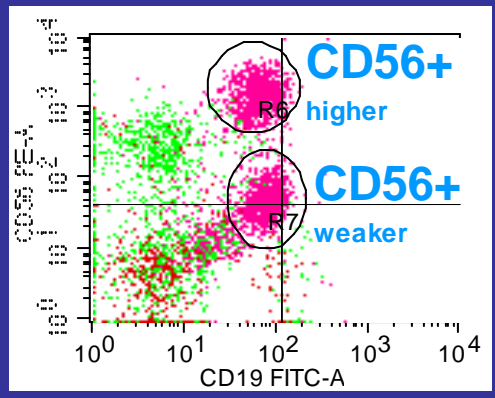
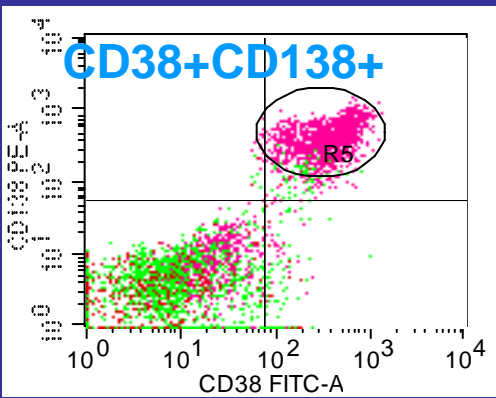
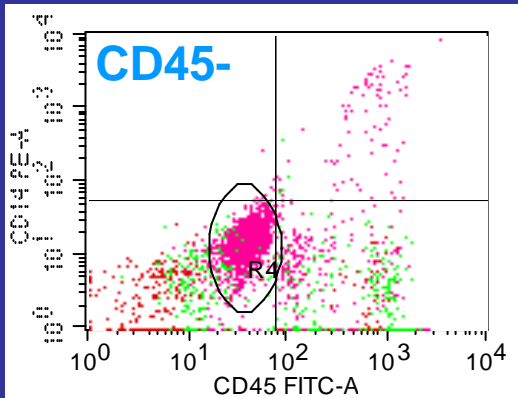
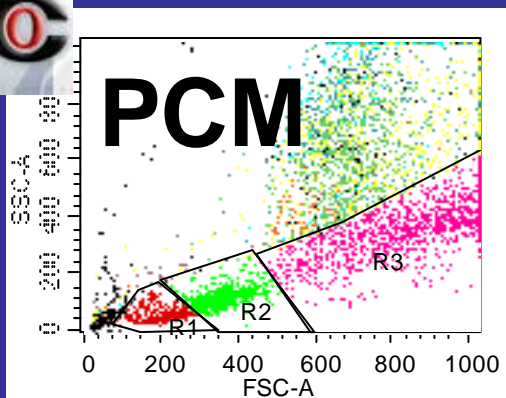


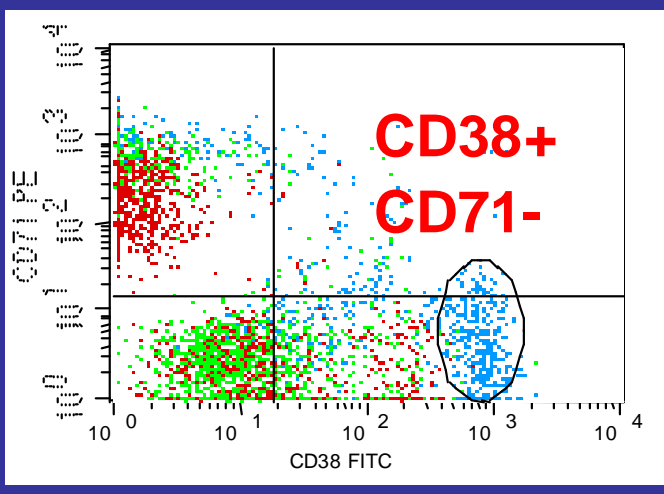
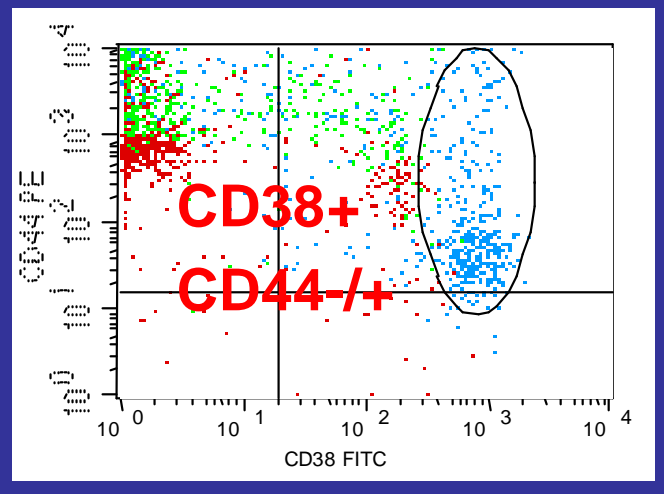
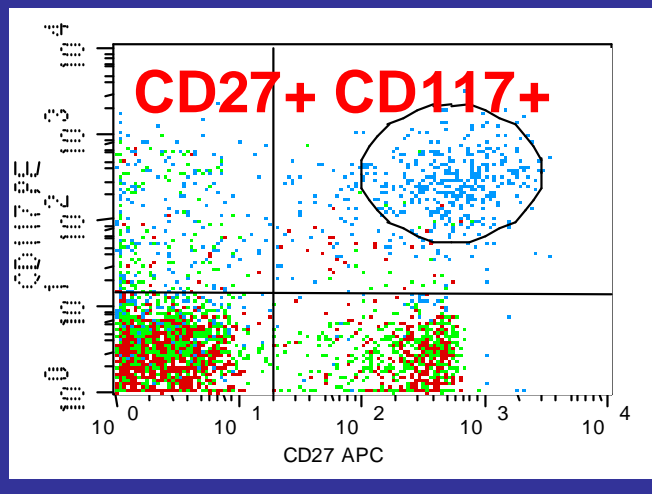
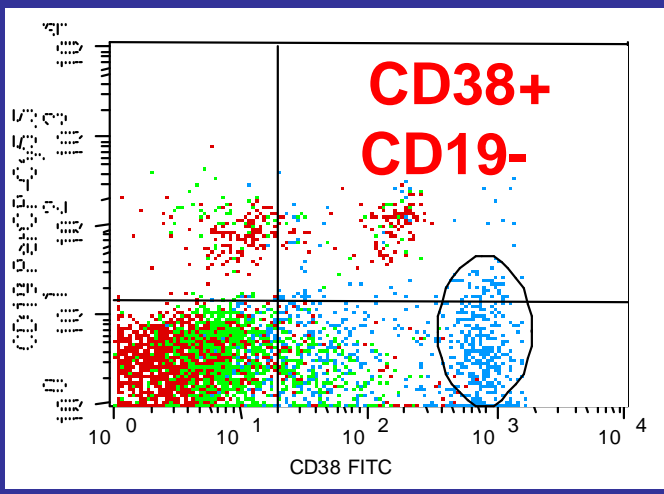
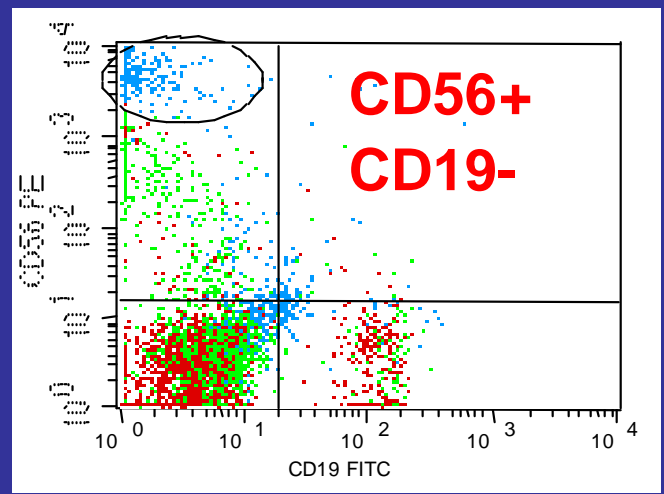
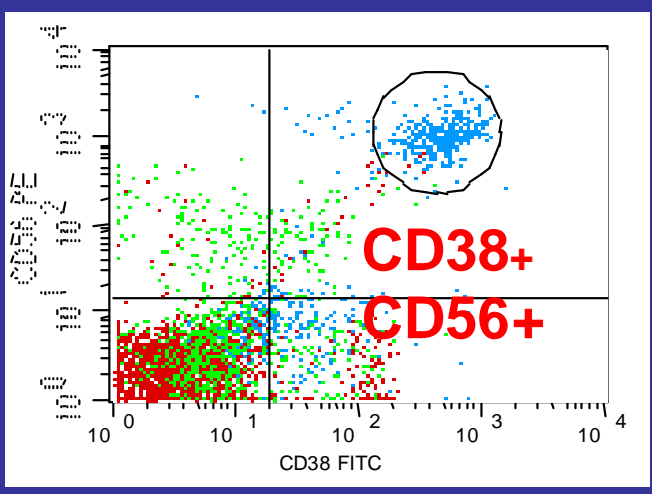
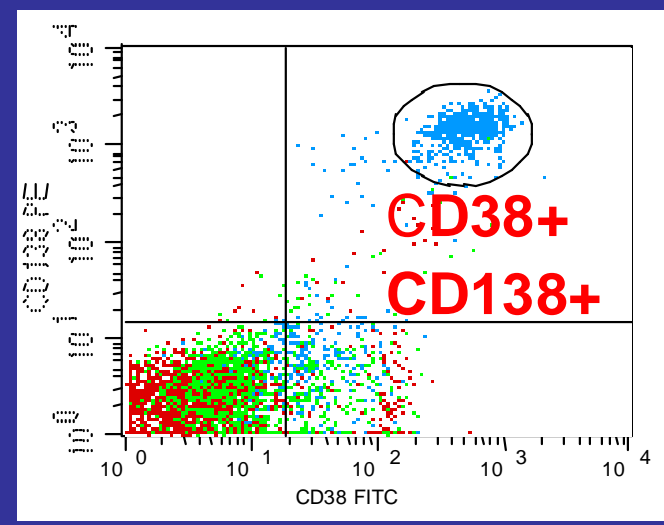
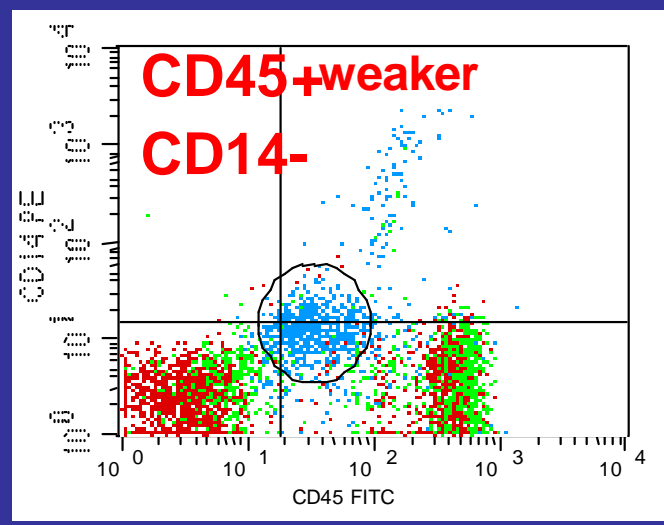
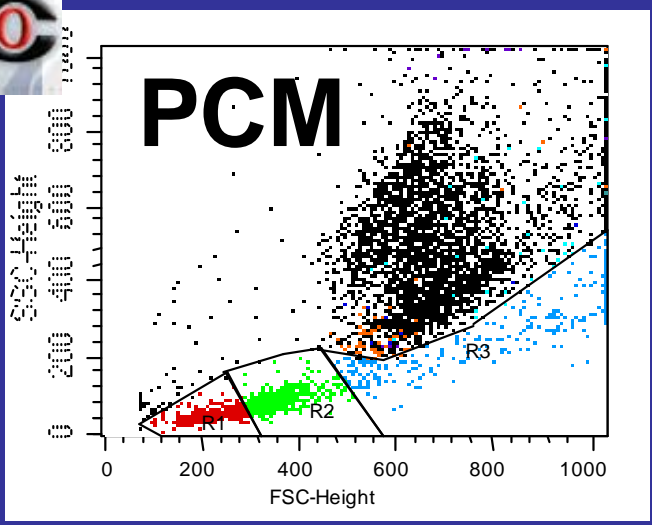
FCM

[San Miguel i wsp., 2006, Rawstron i wsp., 2008]



Ocena CD138 bardziej swoista niż CD38 ale jest mniej czuła

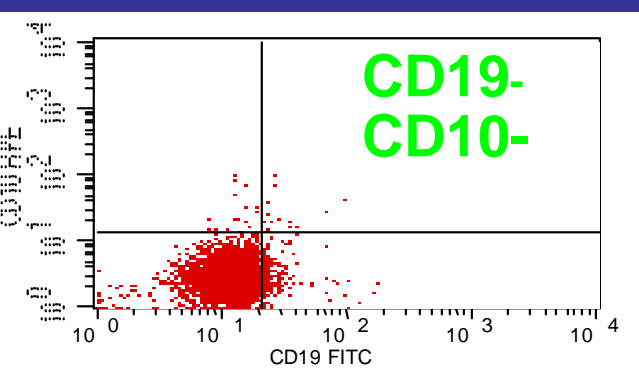
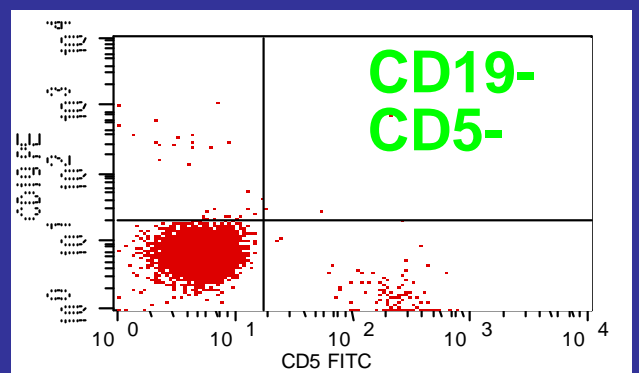
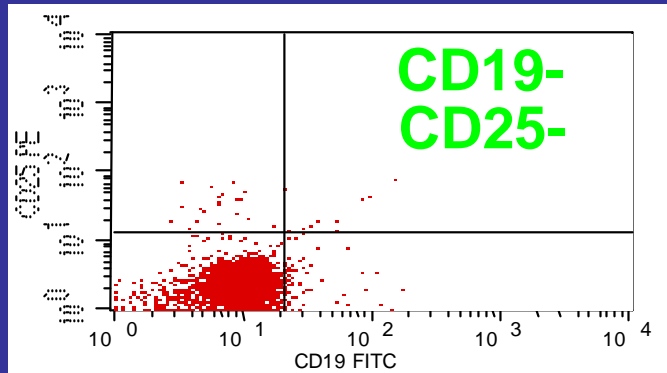
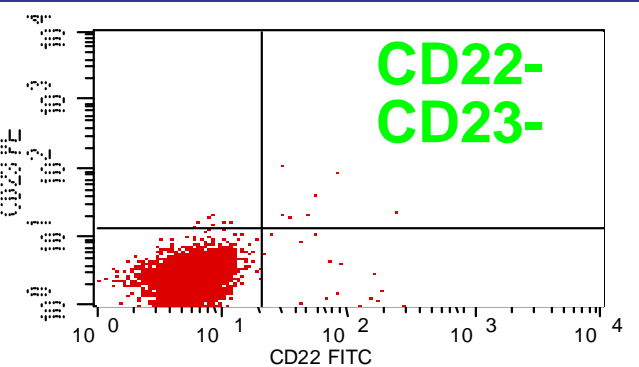
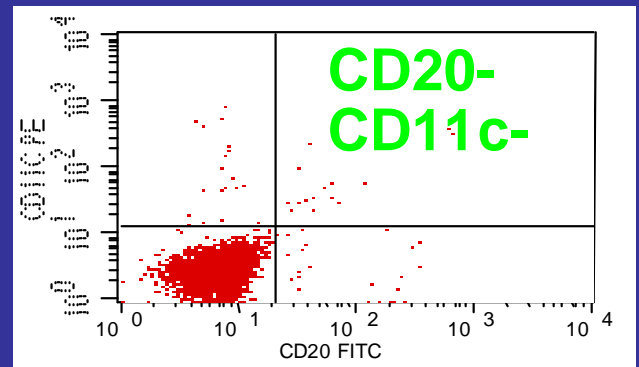
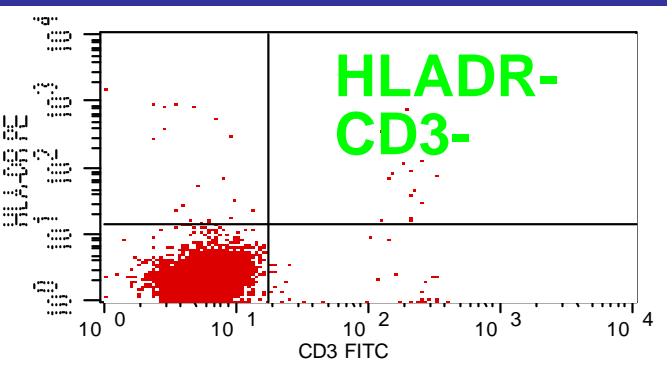
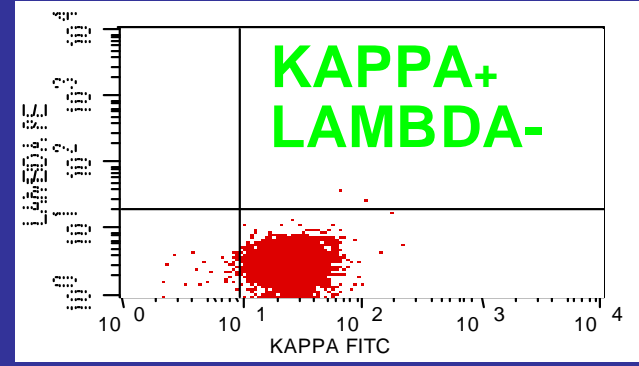
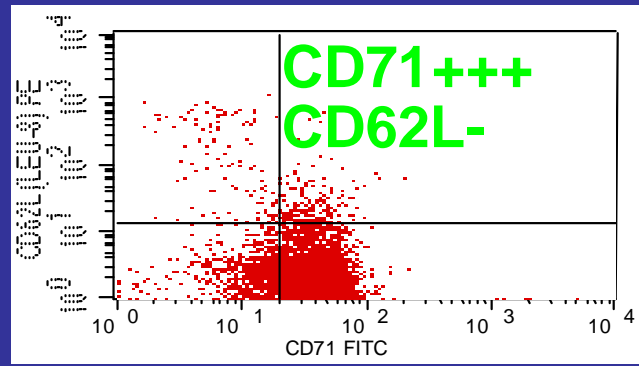
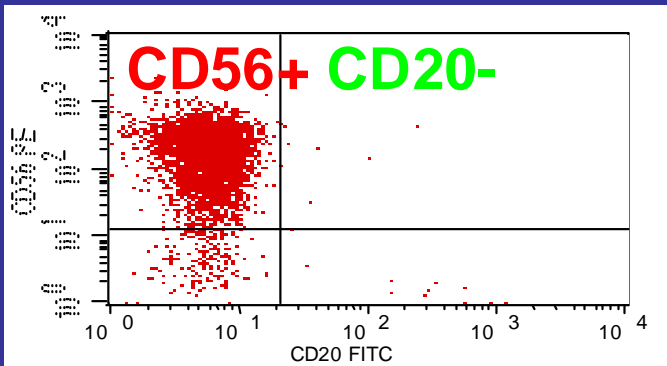
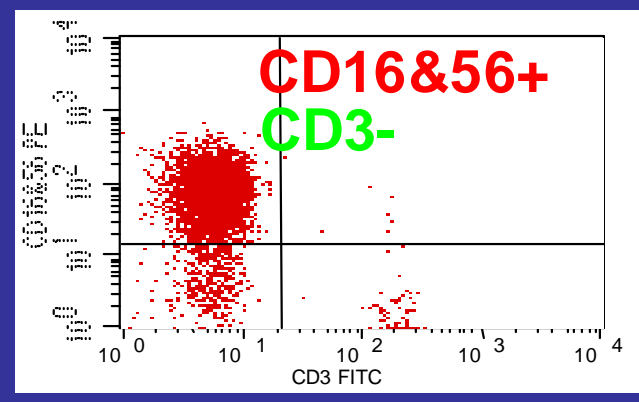
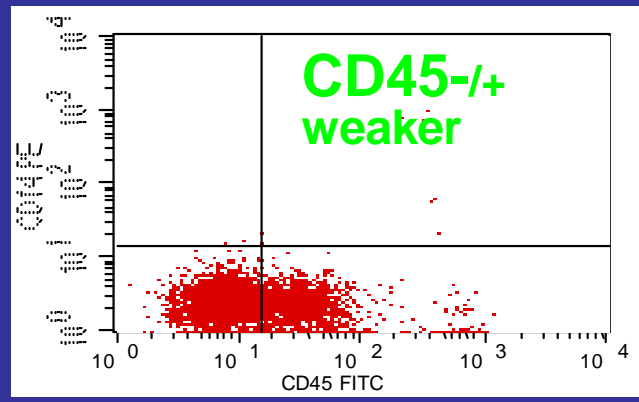
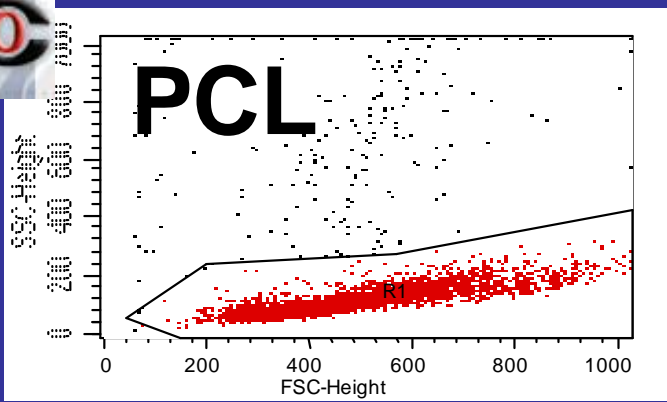






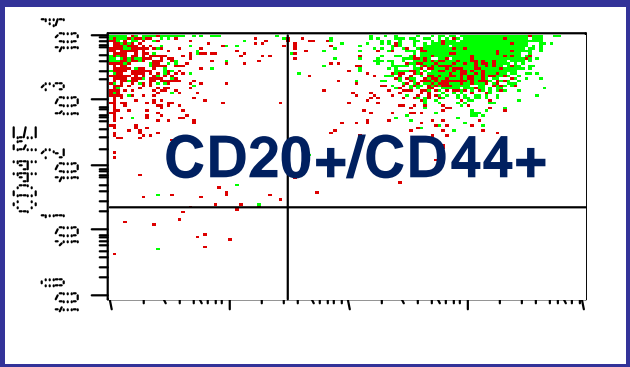
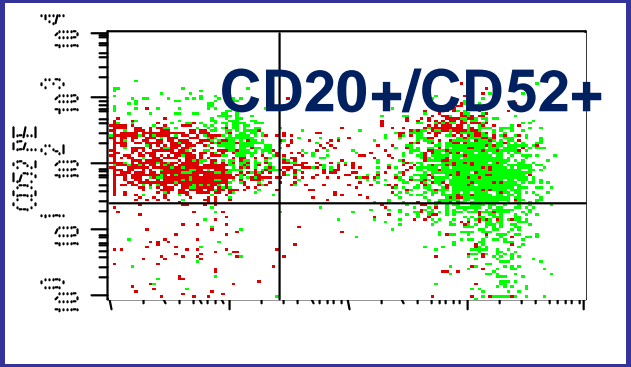
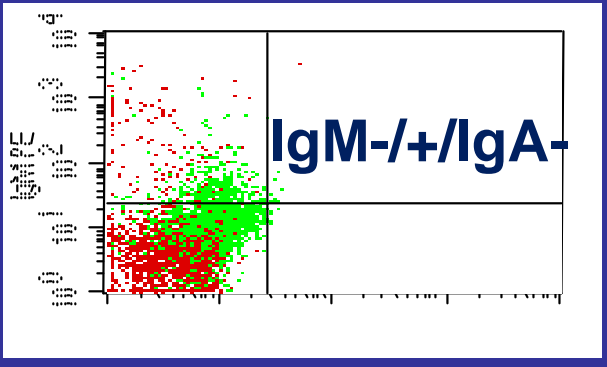
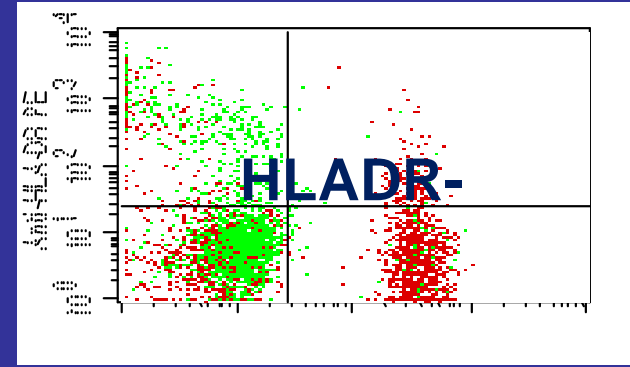
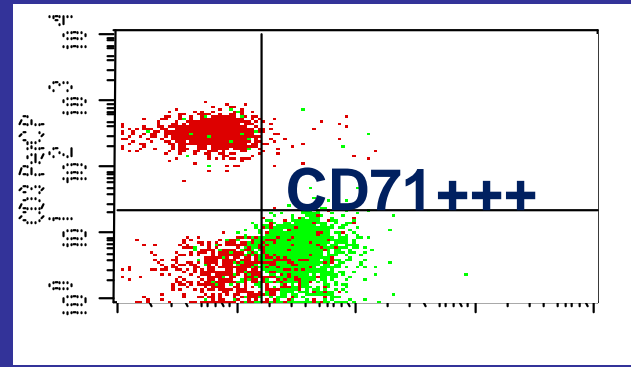
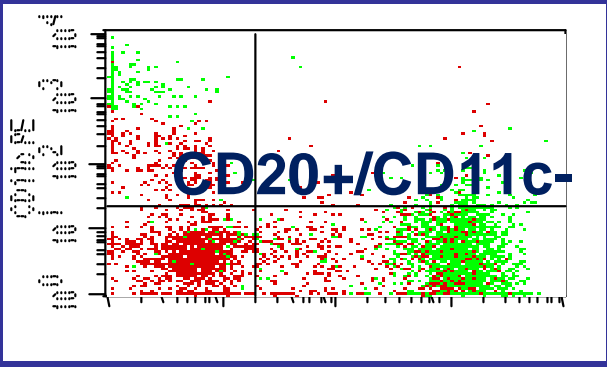
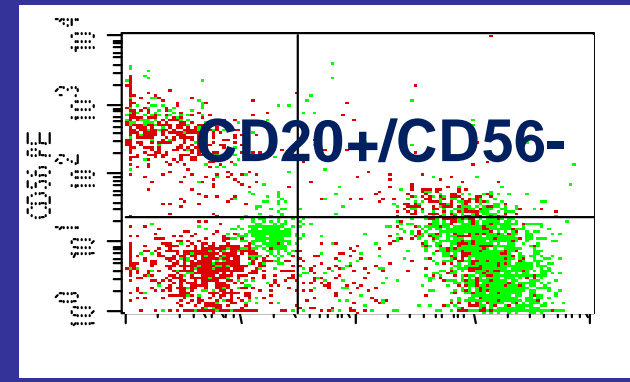
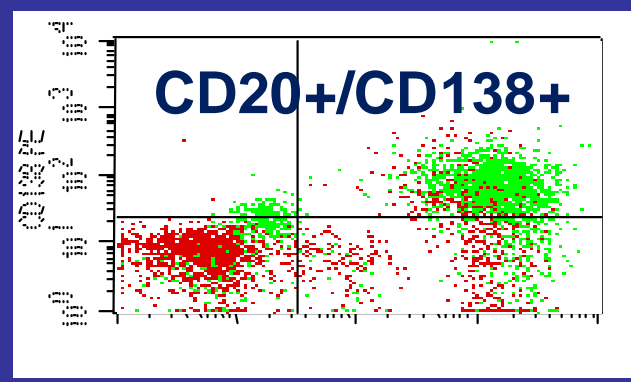
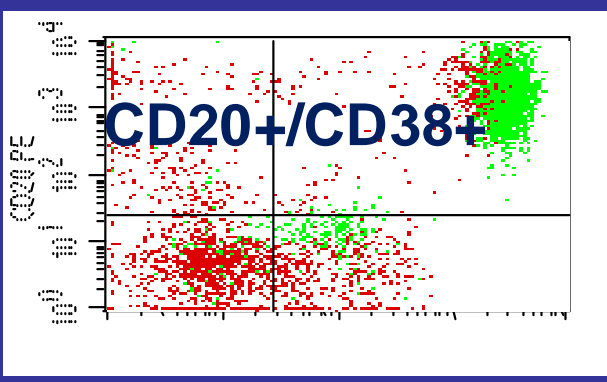
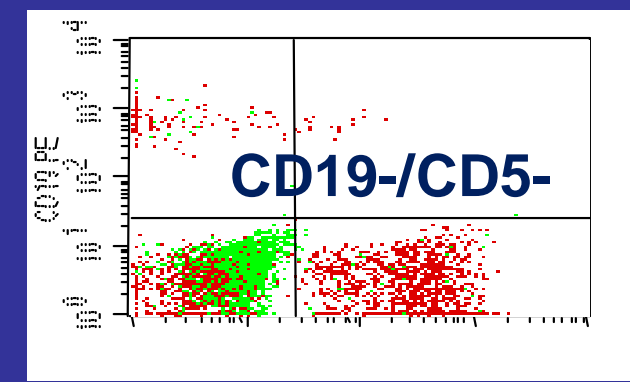
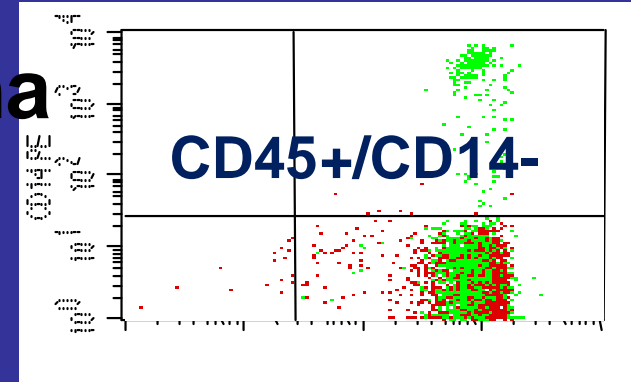
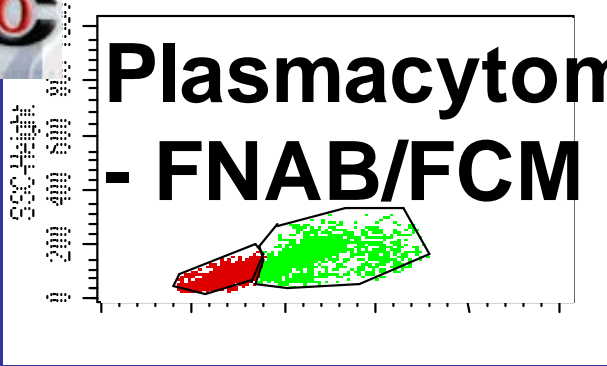
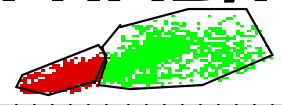
Białaczka plazmatycznokomórkowa PCL

- *primary vs. secondary PCL*
- kryterium diagnostyczne **PCL**: plazmocyty w PB w ilości $> 2 \times 10^9 /L$ lub więcej niż 20% krwinek białych
- zdarza się częściej w przypadku produkcji **łańcucha lekkiego**, IgD lub IgE przez **PCNs**
- Ponadto, cechą różniącą **PCL** od pozostałych **PCNs** jest brak ekspresji CD56 [**Pellat-Deceunynck i wsp., 1998, Rawstron i wsp., 1999**]
- **PCL** znacznie pogarsza rokowanie w **PCNs**



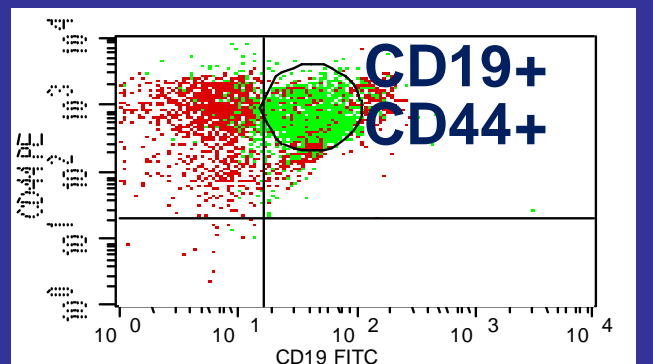
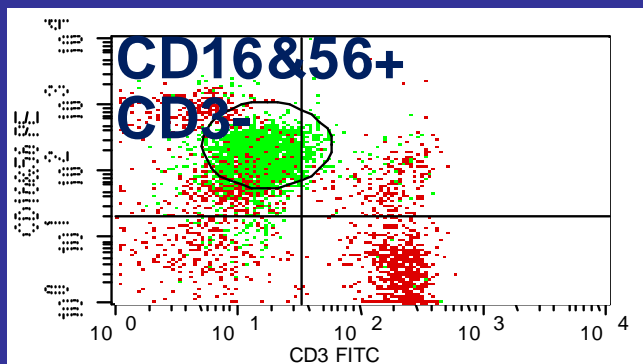
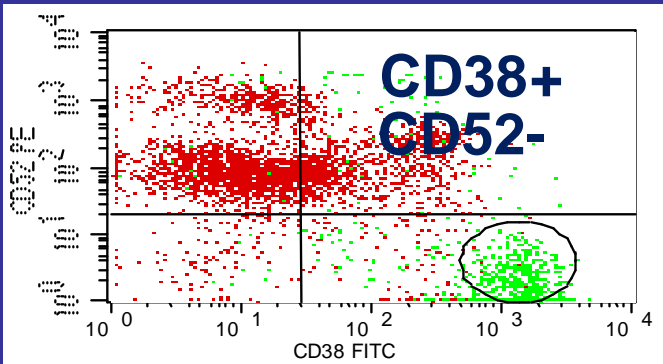
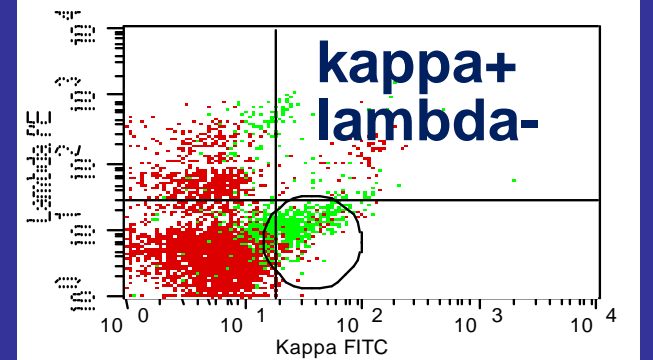
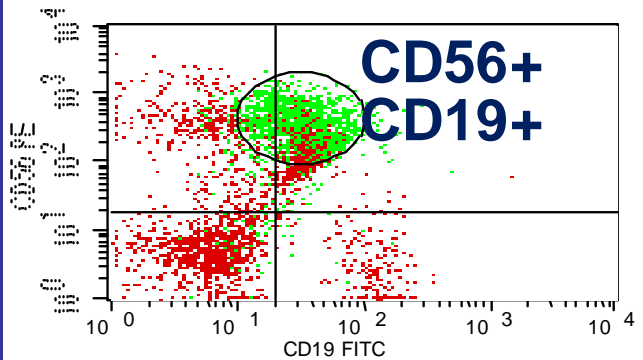
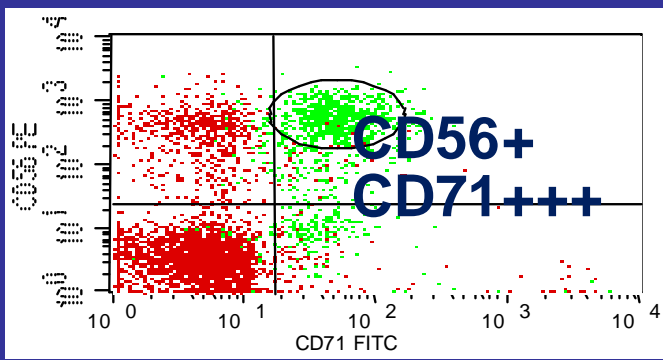
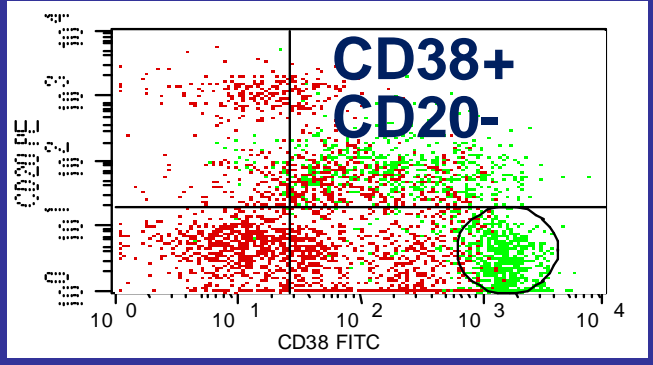
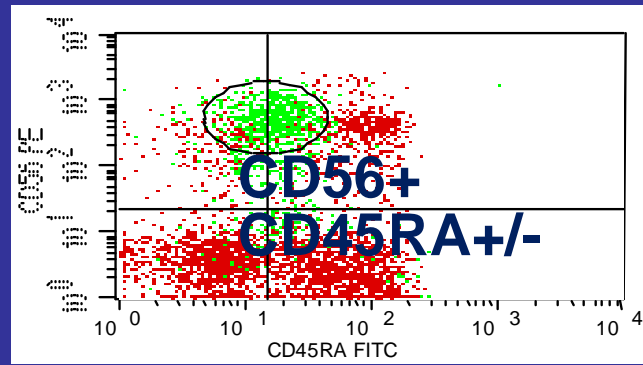
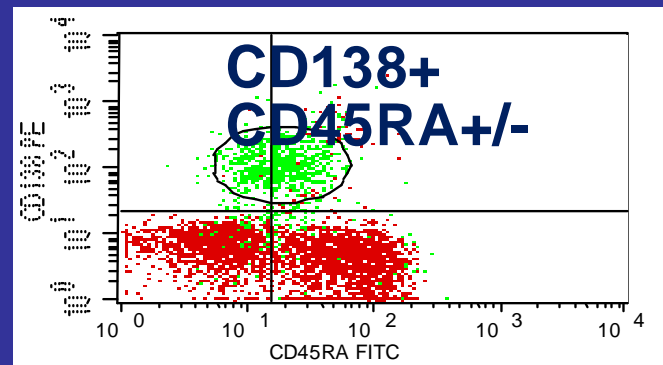
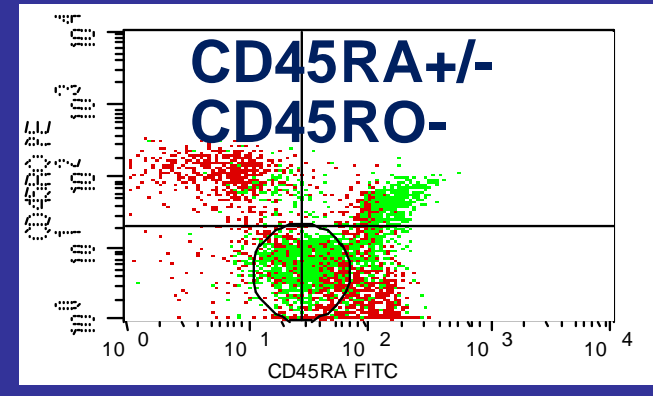
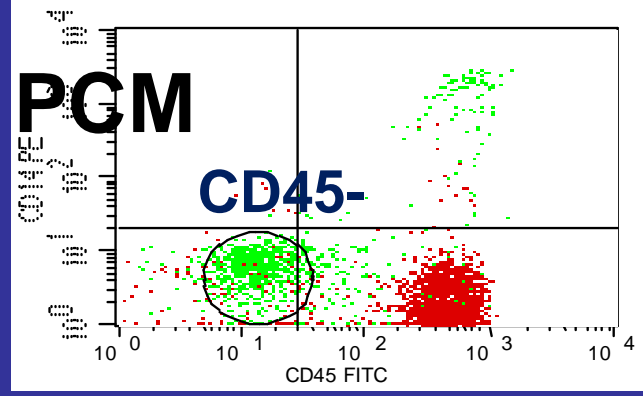
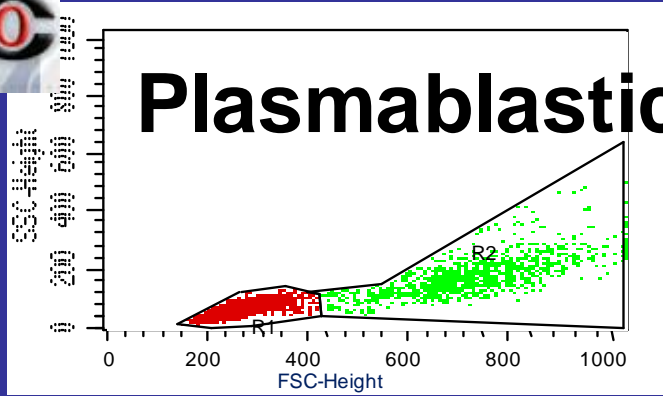


Plasmacytoma - FNAB/FCM





Plasmablastic PCM





Podsumowanie PCNs

- prawidłowe PCs: **CD38(+)^{higher}/CD19(+)/CD56(-)**
- patologiczne PCs: **CD38(+)^{weaker}/CD19(-) /CD56 (+/-)**
- pogarsza rokowanie: masywne zajęcie szpiku, rozlany typ nacieku i plazmablastyczna morfologia , **CD11a-CD18(-), CD29-CD49e(-), CD45(+),CD56(-), CD44(+)^{higher} /CD117(-),CD19(+),CD28(+)**
- poprawa rokowania: **CD79 a(+), CD20(+), CD27(+), translokacji t(11;14)**



Standardy diagnostyki

Zintegrowana metoda rozpoznawania PCNs

1. Ośrodki referencyjne i specjalistyczne zajmujące się diagnostyką i leczeniem **PCNs** powinny równocześnie diagnozować w/w nowotwory za pomocą metod : **HP/IH** i **CYT/FCM** i **GEN** (najlepiej w jednym Zakładzie Hematopatologii)
2. **Diagnostyka wstępna: HP/IH trepanobiopsji** (ocena jakościowa, ilościowa (subiektywna) i czynników prognostycznych)
3. **Diagnostyka wstępna: CYT/FCM i GEN** (ocena jakościowa, ilościowa (obiektywna) i czynników prognostycznych na poziomie białek i zmian cytogenetycznych)



Standardy diagnostyki

Zintegrowana metoda rozpoznawania PCM

4. Wielowariantowa analiza choroby resztkowej w **PCMs** za pomocą **FCM**, 100 dni po przeszczepie autologicznym szpiku jest najważniejszym niezależnym czynnikiem prognostycznym, dla PFS i OS [Paiva i wsp., 2008]
5. Podkreślono w ostatnich pracach, że ilościowe oszacowanie **PCs** przez **FCM** ma większą wartość prognostyczną w **PCNs** niż oszacowanie morfologiczne ilości **PCs** [Rawstron i wsp., 2008, Mateo i wsp., 2008]
6. Wykazanie w **FCM** patologicznych **PCs** może być użyteczne u pacjentów z **Non-Secretory myeloma** i **pierwotną amyloidozą**



Standardy diagnostyki

Zintegrowana metoda rozpoznawania PCM

- Przewaga **FCM** w rozpoznawaniu **PCNs** nad innymi metodami diagnostycznymi opiera się na:
 - analizie ilościowej i jakościowej **PCs** w szpiku. Ocena wieloparametrowa wielu markerów na **PCs** wraz z określeniem **monoklonalności i patologicznego immunofenotypu** jest bardziej specyficzna niż badania **IH**
 - identyfikacji czynników prognostycznych, szczególnie w **MGUS** i **SMM**, opartej na różnych proporcjach **PCs**, natomiast w innych postaciach **PCNs** prognostyczne znaczenie immunofenotypu nie zostało dotychczas precyzyjnie określone.



Standardy diagnostyki

Zintegrowana metoda rozpoznawania PCM

- ocenie skuteczności leczenia, choroby resztkowej i wiarygodnej remisji [Rawstron i wsp., 2002, Rawstron i wsp., 2008].



Dziękuję z uwagę

grzegorzrymkiewicz@coi.waw.pl

Pracownia Cytometrii Przepływowej
Zakładu Patologii Centrum Onkologii
Instytut w Warszawie

Mgr Katarzyna Błachnio

Dr n.med.Magda Feliksbrod-Bratosiewicz

Dr n.med.Zbigniew Bystydzieński