

Postępy w diagnostyce patomorfologicznej chłoniaków

Advances in the pathological diagnosis of lymphomas

Ewa Mizera-Nyczak¹, Grzegorz Dworacki², Jan Sikora², Violetta Filas^{1,3},
Bartosz Brzezicha², Jan Żeromski², Jan Bręborowicz^{1,3}

¹Zakład Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii

²Katedra Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

³Katedra Onkologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Chłoniaki należą do częstych nowotworów węzłów chłonnych szyi i błony śluzowej nosogardła. Ze względu na to, że biopsja cienkoigłowa ma w diagnostyce chłoniaków ograniczoną wartość, diagnostyka ta pozostaje w obszarze zainteresowań głównie histopatologii. Rozwój wiedzy z zakresu biologii i funkcji tkanki limfatycznej powoduje, iż klasyfikacja chłoniaków stale się zmienia. Rozwój nowych metod terapeutycznych zmusza równocześnie patologów do wprowadzania nowych metod diagnostycznych, takich jak immunohistochemia, cytometria przepływową czy techniki biologii molekularnej.

W wielu zakładach diagnostycznych wykorzystywane są już metody immunohistochemiczne i cytometria przepływową. W rutynowej diagnostyce nie stosuje się natomiast technik biologii molekularnej, uważanych za skomplikowane i kosztowne. Rozwiązaniem jednego z tych ograniczeń może być rozwój względnie prostych metod hybrydyzacji *in situ* – fluorescencyjnej (FISH) i z użyciem chromogenu (CISH). Chociaż nowoczesne techniki diagnostyki chłoniaków są kosztowne, stanowią i tak niewielki wydatek w porównaniu z wydatkami związanymi z takim leczeniem, jak chemio- czy immunoterapia.

Stosowanie wymienionych metod jest niezbędne do spełnienia kryteriów diagnostycznych wprowadzonych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) [1]. W niniejszej pracy opisano kilka najważniejszych metod zalecanych w diagnostyce chłoniaków. Należy podkreślić, że metody te wymagają współpracy klinicystów z patologami. Do zadań klinicystów należy głównie prawidłowe utrwalenie całego węzła w 10% buforowanej formalinie oraz dotarczenie do przesyłanego materiału danych klinicznych. Z kolei od patologa wymaga się wiedzy na temat bieżących kryteriów diagnostycznych i stanu klinicznego chorego. Należy pamiętać, że nieprawidłowa diagnostyka patomorfologiczna chłoniaków może być konsekwencją zastosowania nieodpowiednich metod diagnostycznych.

Słowa kluczowe: chłoniak, immunohistochemia, cytometria przepływową, FISH, CISH, TCR, klonalność.

Abstract

Lymphomas are common malignancies arising in the cervical lymph nodes and in the nasopharyngeal mucosa. Diagnosis of lymphoma remains in the domain of histopathology as fine needle aspiration biopsy is of limited value in this respect. Thanks to progress in our understanding of the structure and function of lymphoid tissue the classification of lymphomas is constantly changing. In addition the development of new therapeutic modalities forces pathologists to introduce new diagnostic methods including immunohistochemistry, flow cytometry and molecular biology techniques.

The application of immunohistochemistry and cytometry is already well established in many diagnostic institutions. However, molecular biology techniques are considered to be



difficult and expensive and, therefore, are not so widely applied in routine diagnosis. One solution to this limitation is due to the development of relatively simple fluorescence and chromogen in situ hybridization methods. While application of these techniques is expensive, modern diagnostic methods for lymphoma represent only a small cost, relative to the costs involved in treatments such as chemotherapy or immunotherapy.

Application of the above-mentioned techniques is absolutely necessary to fulfil the criteria of diagnosis of lymphomas introduced by the World Health Organization [1]. In this article, we describe some of the most important methods recommended for the diagnosis of lymphomas. It is necessary to note that the success of these methods requires the cooperation of clinicians and pathologists. The minimum requirements for the clinician include the fixation of the whole lymph node in 10% buffered formalin, which should be accompanied by a summary of clinical data. The minimum requirements for the pathologist include a knowledge of current diagnostic criteria and of the clinical setting. It must also be stressed that incorrect pathological diagnosis of lymphomas is sometimes due to unsatisfactory diagnostic techniques.

Key words: lymphoma, immunohistochemistry, flow cytometry, FISH, CISH, TCR, clonality.

(*Postępy w chirurgii głowy i szyi* 2006; 2: 63–82)

Wprowadzenie

Nowotwory układu chłonnego występują często w węzłach chłonnych szyi i błonie śluzowej nosogardła. Nomenklatura oraz metody ich diagnostyki ulegają ciągłym zmianom. Zmiany te wynikają zarówno z rozwoju wiedzy na temat czynności układu odpornościowego, jak i rozwoju nowych metod terapeutycznych, zwłaszcza chemioterapii i immunoterapii. Warunkiem zastosowania właściwej metody terapeutycznej jest prawidłowe rozpoznanie nowotworu.

Podstawą diagnostyki histopatologicznej pozostaje badanie histopatologiczne węzła chłonnego. Węzeł powinien być pobrany w całości, tak aby nie doszło do uszkodzenia torebki węzła. Tylko w przypadku dużych konglomeratów węzłów należy pobrać duży wycinek tkankowy. Jedynym zalecanym utrwalcaczem jest buforowana 10% formalina (pH 7,4). Węzeł powinien być utrwalany przez 18–24 godz.; pospieszne utrwalenie (np. w cieplarce) jest przeciwwskazane. Formalina wolno dyfunduje w tkance (jedynie na głębokość kilku milimetrów w ciągu 24 godz.) i dlatego większe węzły powinny być przekrojone ostrym nożem (najlepiej w największej płaszczyźnie – w przypadku małego węzła, lub cięciami równoległymi do średnicy mniejszej – w przypadku większego węzła). Z przekrojów należy wykonać preparaty odciskowe, tzw. *imprinty* [2].

Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa może być stosowana do wykrywania przerzutów nowotworowych do węzła chłonnego, jednak zazwyczaj nie wystarcza ani do rozpoznania, ani też do ustalenia typu chłoniaka. Metoda ta pozwala jednak na ustalenie wstępnego rozpoznania chłoniaka, a także na pobranie materiału do badań cytometrycznych lub molekularnych. Biopsja cienkoigłowa może być też wykorzystywana do potwierdzenia nawrotu chłoniaka [2].

Postęp wiedzy pozwala na coraz lepsze poznanie budowy i czynności układu odpornościowego. Układ ten składa się z wielu wyspecjalizowanych komórek, wśród których wyróżnia się limfocyty B, limfocyty T, komórki NK, komórki dendrytyczne, histiocyty i komórki tuczne. Wszystkie te komórki wywodzą się z komórki macierzystej (*stem cell*). Mogą one ulegać mutacjom, a w konsekwencji transformacji nowotworowej.

Poznano wiele etapów rozwoju komórek limfoidalnych; na poszczególnych etapach tego rozwoju stwierdza się ekspresję różnych antygenów systemu CD (*Cluster of Differentiation*). Geny immunoglobulin i receptorów T ulegają rearanżacji we wczesnym okresie rozwoju limfocytów B i T. W wyniku tego procesu komórki te uzyskują receptory o unikalnej swoistości dla antygenów. Za pomocą takich metod, jak Southern blotting i łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR), można stwierdzić, czy w badanym klonie komórek limfoidalnych nastąpiła już rearanżacja. W praktyce badanie rearanżacji pozwala na odróżnienie łagodnych rozrostów limfoidalnych od złośliwych, a także stwierdzenie, czy nowotwór wywodzi się z komórek B czy T.

Pod względem antygenowym komórki poszczególnych chłoniaków przypominają odpowiednie komórki układu chłonnego. Ekspresję tych antygenów, zwłaszcza z systemu CD, można wykrywać za pomocą immunohistochemii i cytometrii; metody te są obecnie najczęściej stosowane jako uzupełnienie badania histopatologicznego. W diagnostyce chłoniaków wzrasta znaczenie metod biologii molekularnej. Choć generalnie metody te są stosunkowo skomplikowane i kosztowne, istnieje już wiele prostych metod molekularnych dostosowanych do warunków rutynowej diagnostyki histopatologicznej. W niniejszym opracowaniu autorzy przedstawiają podstawowe informacje dotyczące diagnostyki



patomorfologicznej chłoniaków z uwzględnieniem najnowszych metod diagnostycznych. Na wstępie przedstawiono aktualną klasyfikację chłoniaków wg WHO.

Klasyfikacja chłoniaków wg WHO

Tylko nieznacznie zmieniło się nazewnictwo ziarnicy złośliwej (choroby Hodgkina). Największe zmiany dotyczą chłoniaków niezziarnicznych. Zapomnieliśmy już o takich terminach, jak *lymphosarcoma* czy *reticulosarcoma*. Zarzucono wiele terminów wprowadzonych przez klasyfikację kilońską, praktycznie znaczenie straciły także wszystkie terminy stosowane w tzw. *Working Formulation*. W 1994 r. wprowadzono tzw. klasyfikację REAL (*Revised European-American Classification of Lymphomas*) [3], będącą w zasadzie mody-

fikacją klasyfikacji kilońskiej [4]. Klasyfikacja REAL z niewielkimi modyfikacjami jest zalecana przez Światową Organizację Zdrowia do stosowania w diagnostyce nowotworów układu chłonnego [5].

Zgodnie z zaleceniami WHO diagnostyka nowotworów układu chłonnego nie może opierać się wyłącznie na klasycznych metodach histologicznych. Konieczne jest równoległe stosowanie metod immunohistochemicznych, a także cytometrii i metod biologii molekularnej. Znaczenie tych ostatnich metod wzrasta i uznaje się, że w najbliższej przyszłości staną się one niezbędne w diagnostyce chłoniaków. Klasyfikacja chłoniaków została podana przez WHO w języku angielskim. Autorzy uznają, że tłumaczenie tych terminów na stosowaną w Polsce łacinę byłoby nieporozumieniem. Większość terminów przetłumaczono na język polski, choć ze

Tab. 1. B-CELL NEOPLASMS (nowotwory z komórek B)

B-CELL NEOPLASMS (nowotwory z komórek B)	
Precursor B-cell neoplasm (nowotwory z prekursorowych komórek B)	
<i>Precursor B lymphoblastic leukaemia</i> (białaczka limfoblastyczna z prekursorowych komórek B) ₁ / <i>lymphoma</i> (chłoniak limfoblastyczny z prekursorowych komórek B) ₂	9835/3 ₁ 9728/3 ₂
Mature B-cell neoplasms (nowotwory z dojrzałych komórek B)	
<i>Chronic lymphocytic leukaemia</i> (przewlekła białaczka limfocytarna) ₁ / <i>small lymphocytic lymphoma</i> (chłoniak z małych limfocytów) ₂	9823/3 ₁ 9670/3 ₂
<i>B-cell prolymphocytic leukaemia</i> (białaczka prolimfocytarna z komórek B)	9833/3
<i>Lymphoplasmacytic lymphoma</i> (chłoniak limfoplazmocytny)	9671/3
<i>Splenic marginal zone lymphoma</i> (chłoniak śledzionowy strefy brzeżnej)	9689/3
<i>Hairy cell leukemia</i> (białaczka włochatkomórkowa)	9940/3
<i>Plasma cell myeloma</i> (szpiczak mnogi)	9732/3
<i>Solitary plasmacytoma of bone</i> (jednoogniskowy plazmocytna kości)	9731/3
<i>Extranasal plasmacytoma</i> (plazmocytna pozakostny)	9734/3
<i>Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue MALT-lymphoma</i> (pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej z komórek B zlokalizowanych w błonach śluzowych)	9699/3
<i>Nodal marginal zone B-cell lymphoma</i> (chłoniak z komórek B strefy brzeżnej węzłów chłonnych)	9699/3
<i>Follicular lymphoma</i> (chłoniak grudkowy)	9690/3
<i>Mantle cell lymphoma</i> (chłoniak z komórek płaszczą)	9673/3
<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> (rozlany chłoniak z dużych komórek B)	9680/3
<i>Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma</i> (śródpiersiowy/grasiczy chłoniak z dużych komórek B)	9679/3
<i>Intravascular large B-cell lymphoma</i> (wewnątrznaczyniowy chłoniak z dużych komórek B)	9680/3
<i>Primary effusion lymphoma</i> (chłoniak pierwotnie wysiękowy)	9678/3
<i>Burkitt lymphoma</i> ₁ / <i>leukaemia</i> ₂ (chłoniak/białaczka Burkitta)	9687/3 ₁ 9826/3 ₂
B-cell proliferations of uncertain malignant potential (rozrosty z komórek B o niepewnym potencjale złośliwości)	
<i>Lymphomatoid granulomatosis</i>	9766/1
<i>Post-transplant lymphoproliferative disorder, polymorphic</i> (potransplantacyjne zaburzenie limfoproliferacyjne, polimorficzne)	9970/1



Tab. 2. T-CELL AND NK-CELL NEOPLASMS (nowotwory z komórek T i komórek NK)

T-CELL AND NK-CELL NEOPLASMS (nowotwory z komórek T i komórek NK)	
Precursor T-cell neoplasms (nowotwory z prekursorowych komórek T)	
<i>Precursor T lymphoblastic leukaemia</i> (białaczka limfoblastyczna z prekursorowych komórek T) ₁ /	9837/3 ₁
<i>lymphoma</i> (chłoniak limfoblastyczny z prekursorowych komórek T) ₂	9729/3 ₂
<i>Blastic NK cell lymphoma</i> **	9727/3
Mature T-cell and NK-cell neoplasms (nowotwory z dojrzałych komórek T i NK)	
<i>T-cell prolymphocytic leukaemia</i> (białaczka prolimfocytarna z komórek T)	9834/3
<i>T-cell large granular lymphocytic leukaemia</i> (białaczka z dużych ziarnistych komórek T)	9831/3
<i>Aggressive NK-cell leukaemia</i> (agresywna białaczka z komórek NK)	9948/3
<i>Adult T-cell leukaemia/lymphoma</i> (białaczka/chłoniak z komórek T dorosłych)	9827/3
<i>Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type</i> (pozawęzłowy chłoniak NK/T, typ nosowy)	9719/3
<i>Enteropathy-type T-cell lymphoma</i> (chłoniak z komórek T typu enteropathy)	9717/3
<i>Hepatosplenic T-cell lymphoma</i> (wątrobowo-sledzionowy chłoniak z komórek T)	9716/3
<i>Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma</i>	9708/3
<i>Mycosis fungoides</i> (ziarniak grzybiasty)	9700/3
<i>Sezary syndrome</i> (zespół Sezary'ego)	9701/3
<i>Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma</i> (pierwotny skórny anaplastyczny chłoniak z dużych komórek)	9718/3
<i>Peripheral T-cell lymphoma, unspecified</i> (chłoniak z obwodowych komórek T, bliżej nieokreślony)	9702/3
<i>Angioimmunoblastic T-cell lymphoma</i> (chłoniak angioimmunoblastyczny z komórek T)	9705/3
<i>Anaplastic large cell lymphoma</i> (anaplastyczny chłoniak z dużych komórek)	9714/3
T-cell proliferation of uncertain malignant potential (rozrosty komórek T o niepewnym potencjale złośliwości)	
<i>Lymphomatoid papulosis</i>	9718/1

** Nowotwór o nieokreślonej linii i stopniu zróżnicowania

Tab. 3. HODGKIN LYMPHOMA (chłoniak Hodgkina, ziarnica złośliwa)

HODGKIN LYMPHOMA (chłoniak Hodgkina, ziarnica złośliwa)	
<i>Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma</i> (chłoniak Hodgkina guzkowy z przewagą limfocytów)	9659/3
<i>Classical Hodgkin lymphoma</i> (klasyczny chłoniak Hodgkina)	9650/3
<i>Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma</i> (klasyczny chłoniak Hodgkina z włóknieniem guzkowym)	9663/3
<i>Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma</i> (klasyczny chłoniak Hodgkina bogaty w limfocyty)	9651/3
<i>Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma</i> (mieszanokomórkowy klasyczny chłoniak Hodgkina)	9652/3
<i>Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma</i> (chłoniak Hodgkina z deplecją limfocytów)	9653/3

względu na to, że tłumaczenie niektórych terminów wymagałoby tworzenia nowych słów, podano je jedynie w brzmieniu angielskim. Zamieszczono również kody morfologiczne poszczególnych nowotworów limfoidalnych wg trzeciego wydania Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób (ICD-O 3), gdzie /3 oznacza nowotwór złośliwy, a /1 zmianę o niskim lub nieokreślonym potencjale złośliwości (tab. 1.–5.) [6].

Immunohistochemia

Metody immunohistochemiczne umożliwiają określenie immunofenotypu komórek i obecnie uważa się je za niezbędne w diagnostyce chłoniaków. Są to metody immunomorfologiczne, polegające na zastosowaniu reakcji antygen-przeciwciało, wymagające użycia przeciwciał związanych ze znacznikiem uwidaczniają-



Tab. 4. HISTIOCYTIC AND DENDRITIC-CELL NEOPLASMS (nowotwory histiocytarne i z komórek dendrytycznych)

HISTIOCYTIC AND DENDRITIC-CELL NEOPLASMS (nowotwory histiocytarne i z komórek dendrytycznych)	
Macrophage/histiocytic neoplasm (nowotwory z makrofagów i histiocytów)	
Histiocytic sarcoma (mięsak histiocytarny)	9755/3
Dendritic cell neoplasms (nowotwory z komórek dendrytycznych)	
Langerhans cell histiocytosis (histiocytoza z komórek Langerhansa)	9751/1
Langerhans cell sarcoma (mięsak z komórek Langerhansa)	9756/3
<i>Interdigitating dendritic cell sarcoma</i> ₁ / <i>tumour</i> ₂	9757/3 ₁ 9757/1 ₂
<i>Follicular dendritic cell sarcoma</i> ₁ / <i>tumour</i> ₂	9758/3 ₁ 9757/3 ₂

Tab. 5. MASTOCYTOSIS (mastocytoza)

MASTOCYTOSIS (mastocytoza)	
<i>Cutaneous mastocytosis</i> (mastocytoza skórna)	
<i>Indolent systemic mastocytosis</i> (indolentna systemowa mastocytoza)	9741/1
<i>Systemic mastocytosis with associated clonal, haematological non-mast cell lineage disease</i> (mastocytoza systemowa z towarzyszącą klonalną chorobą hematologiczną z linii innej niż komórki tuczne)	9741/3
<i>Aggressive systemic mastocytosis</i> (agresywna mastocytoza systemowa)	9741/3
<i>Mast cell leukaemia</i> (białaczka z komórek tucznych)	9742/3
<i>Mast cell sarcoma</i> (mięsak z komórek tucznych)	9740/3
<i>Extracutaneous mastocytoma</i> (mastocytoma pozaskórny)	9740/1

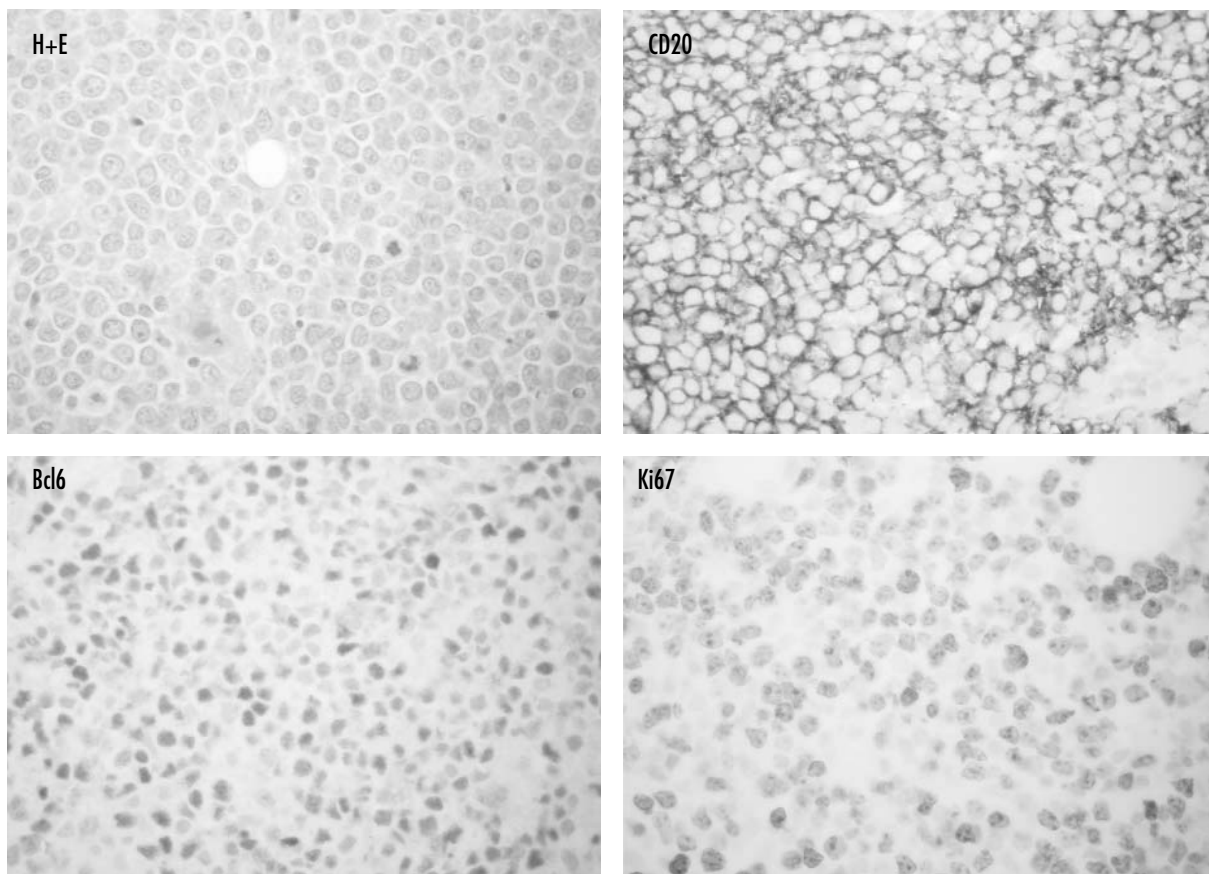
cym lokalizację antygeny w badanej tkance. W diagnostyce chłoniaków jako znaczników używa się najczęściej enzymów, m.in. peroksydazy lub fosfatazy alkalicznej. Po dodaniu odpowiedniego chromogenu (diaminobenzydyny DAB dla peroksydazy, soli naftolu dla alkalicznej fosfatazy) w miejscu występowania antygeny otrzymuje się barwny ziarnisty produkt reakcji. Najczęściej stosuje się metodę pośrednią z użyciem kompleksu enzym-antyenzym, który dodaje się wtórnie po związaniu pierwotnego przeciwciała z szukanym antygenem [7]. Obecnie do diagnostyki chłoniaków używane są gotowe zestawy, np. z kompleksem En Vision+HRP [DAKO]. Jest to przykład reakcji immunoenzymatycznej z zastosowaniem peroksydazy, gdzie po dodaniu DAB w miejscu występowania antygeny otrzymuje się żółtobrazowy produkt. Oznaczenie immunofenotypu (czyli antygenów różnicowania) komórek chłoniaka pomaga w określeniu typu chłoniaka zgodnie z klasyfikacją WHO.

Chłoniaki niezziarnicze z komórek B

Chłoniaki niezziarnicze z komórek B stanowią najczęstszą grupę wśród nowotworów limfocytarnych.

Do czynników sprzyjających ich rozwojowi zalicza się zaburzenia układu immunologicznego, m.in. choroby autoimmunizacyjne i niedobory odporności, a do czynników etiologicznych (stwierdzanych jednak tylko w niektórych przypadkach) wirusy Epsteina-Barra, HIV, HHV8 (ludzki wirus *herpes* typ 8), HCV oraz bakterie *Helicobacter pylori*. Chłoniaki z komórek B zajmują pierwotnie węzły chłonne lub narządy pozawęzłowe, czasem z zajęciem szpiku lub obrazem białaczkowym we krwi. Przebieg kliniczny i odpowiedź na leczenie zależą od typu chłoniaka, dlatego tak ważne jest prawidłowe rozpoznanie badanej zmiany. W większości przypadków obraz morfologiczny i immunofenotypowy pozwala na rozpoznanie chłoniaka zgodnie z klasyfikacją WHO. Do najczęstszych chłoniaków z komórek B zalicza się chłoniaki z dużych i średnich komórek z dużą aktywnością proliferacyjną, np. chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL) i chłoniaka Burkitta (BL), oraz chłoniaki z małych komórek, np. chłoniaka/białaczkę limfocytarną (SLL/CLL), chłoniaka grudkowego (FL), chłoniaka strefy brzeżnej (MZL) i chłoniaka z komórek płaszczka (MCL) [1]. Poniżej znajdują się krótka charakterystyka i immunofenotyp stwierdzany w wymienionych chłoniakach.





Ryc. 1. Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL) – preparat H+E, dodatnia reakcja błonowa CD20 w komórkach chłoniaka, dodatnia reakcja jądrowa Bcl6 w komórkach chłoniaka, ekspresja Ki67 w >40% komórek chłoniaka

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL) (ryc. 1.)

Najczęstszy chłoniak wykrywany u ludzi dorosłych, ale występujący też u dzieci. Powstaje zazwyczaj *de novo*, ale może rozwinąć się w przebiegu chłoniaków o niższym stopniu złośliwości jako wyraz progresji (SLL/CLL, FL, MZL, NLPHL). Częstym czynnikiem predysponującym jest niedobór odporności spowodowany np. infekcją EBV lub HIV. Chłoniak ten zajmuje pierwotnie węzły chłonne lub narządy pozawęzłowe, w tym przewód pokarmowy, skórę, ośrodkowy układ nerwowy, kości, jądra, tkanki miękkie, migdałki, ślinianki, płuca, wątrobę, nerki i układ rozrodczy żeński. W obrazie morfologicznym utkanie chłoniaka stanowi populacja dużych komórek o rozlanym wzorze wzrostu i dużej aktywności proliferacyjnej. Zajęcie węzła może być całkowite, częściowe, międzygrudkowe lub wewnątrzatkowe, dlatego ważne jest badanie histologiczne całego węzła chłonnego. Cytologicznie wyróżnia się kilka wariantów tego chłoniaka: centroblastyczny (najczęstszy), immunoblastyczny, bogaty w limfocyty T/histiocyty, anaplastyczny, a także rzadko występujący wrzecionowato-

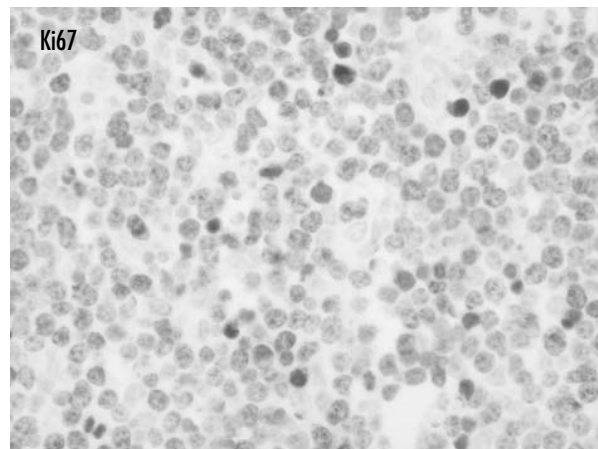
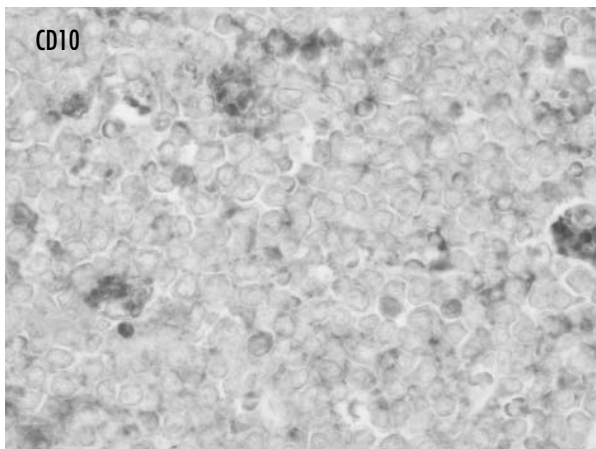
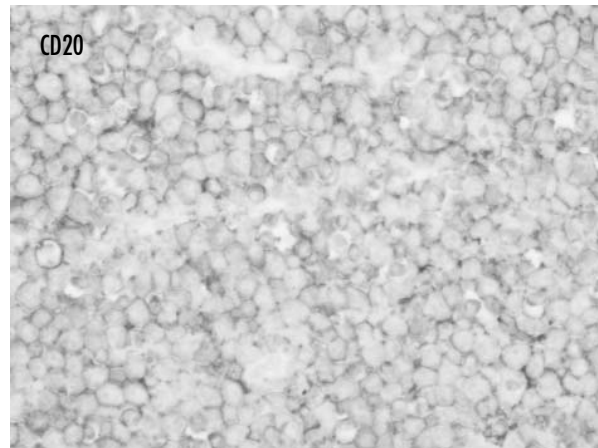
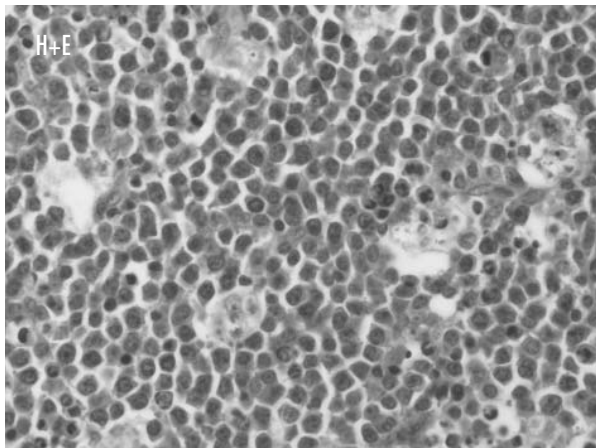
komórkowy lub syngnetowatokomórkowy [1, 8, 9]. Istnienie różnych podtypów morfologicznych wymaga stosowania metod immunohistochemicznych w celu określenia limfocytarnej histogenezy nowotworu.

Immunofenotyp: **CD20+**, **CD79α+**, **Ki67 >40%**, Bcl2+/-, Bcl6-/+ , CD43-/+ , CD5-/+ , CD10-/+ , CD30-/+ , ALK1-/+ , cyklina D1-, TdT-

Chłoniak Burkitta (BL) (ryc. 2.)

Zdecydowanie rzadszy, rozwija się u dzieci i osób dorosłych (średnia wieku ok. 30 lat). Wyróżnia się postacie endemiczne, sporadyczne i związane z niedoborami odporności (w tym infekcją HIV) [10, 11]. Czynnikiem etiologicznym jest zakażenie wirusem EB. Chłoniak ten zajmuje najczęściej pierwotnie narządy pozawęzłowe, takie jak kości twarzoczaszki (szczękę, oczodoły), przewód pokarmowy, jajniki, nerki i gruczoł piersiowy. Często stwierdza się zajęcie ośrodkowego układu nerwowego, czasem obraz białaczkowy z nacieczeniem szpiku [10, 12]. Lokalizacja węzłowa występuje częściej u dorosłych, zwłaszcza w stanach obniżonej odporności. W obrazie morfologicznym utkanie chłoniaka stanowi





Ryc. 2. Chłoniak Burkitta (BL) – preparat H+E, dodatnia reakcja błonowa CD20 w komórkach chłoniaka, dodatnia reakcja błonowa CD10 w komórkach chłoniaka, ekspresja Ki67 w ok. 100% komórek chłoniaka

monotonna populacja komórek średniej wielkości o dużej aktywności proliferacyjnej i apoptozie. Zazwyczaj widoczny jest obraz tzw. *gwiazdzistego nieba*, związany z obecnością licznych nienowotworowych makrofagów, oraz obraz tzw. *kostki brukowej*, z powodu obkurczenia cytoplazmy (w trakcie utrwalania) i modelowania się przylegających do siebie komórek [1].

Immunofenotyp: **CD20+**, **CD79α+**, **CD10+**, **Bcl6+**, **Ki67 ok. 100%**, CD43+/-, Bcl2-, CD5-, CD23-, CD30-, ALK1-, cyklina D1-, TdT-

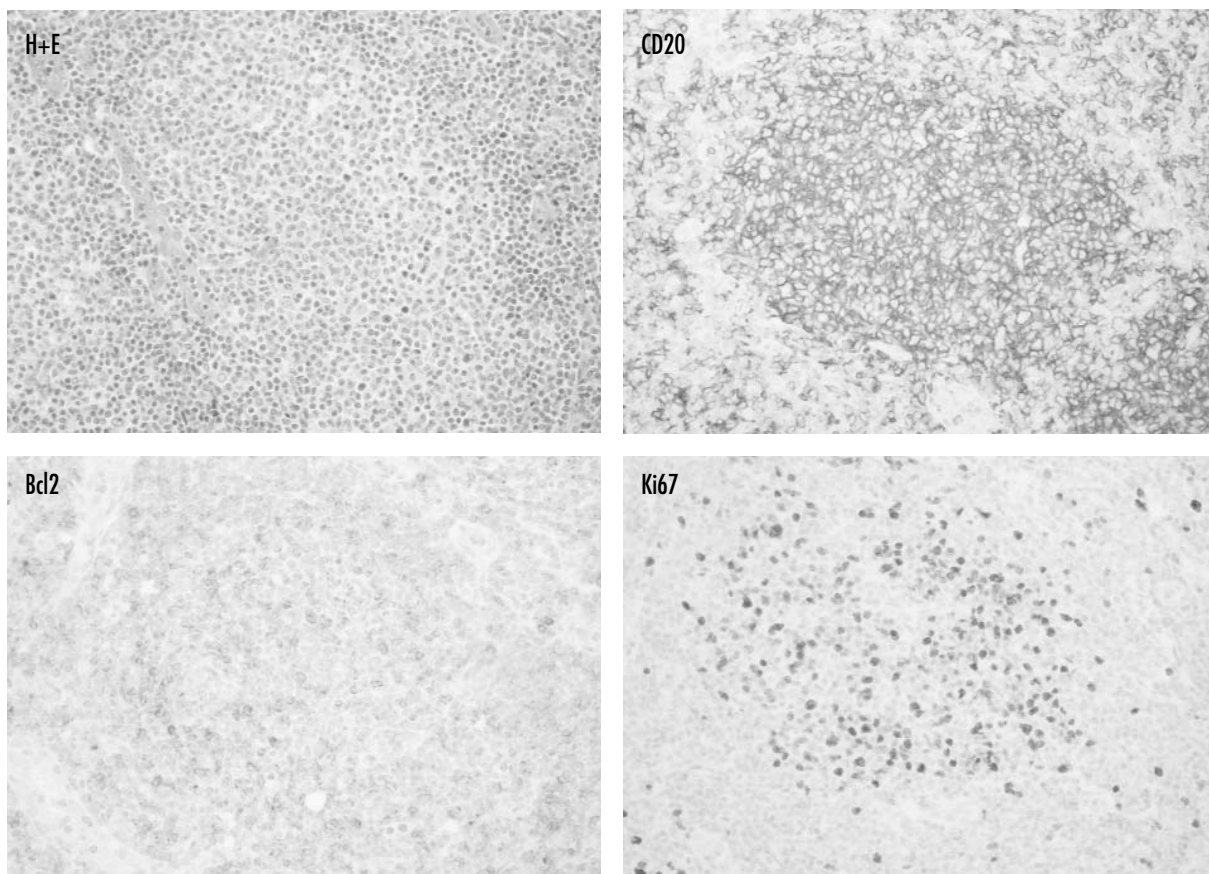
Chłoniak grudkowy (FL) (ryc. 3.)

Wywodzi się z komórek grudek chłonnych: centrocytów i centroblastów. Zajmuje pierwotnie najczęściej węzły chłonne, ale stwierdza się także pierwotną lokalizację pozawęzłową w: skórze, śledzionie, migdałkach, przewodzie pokarmowym, tkankach miękkich, czasami z nacieczeniem szpiku. Przebieg kliniczny jest zazwyczaj długo bezobjawowy, poza powiększeniem węzłów chłonnych. W obrazie morfologicznym zachowany jest

przynajmniej częściowo follikularny wzór wzrostu, dlatego chłoniak ten wymaga różnicowania z odczynową poliklonalną hyperplazją follikularną, co jest możliwe dzięki metodom immunohistochemicznym. W zależności od liczby centroblastów w utkanie nowotworowych grudek stosuje się trzystopniowy podział na G1, G2, G3a i b (im więcej centroblastów, tym wyższy stopień i tym większa złośliwość nowotworu). Często widoczne są obszary włóknienia i szkliwienia. W niektórych przypadkach mogą pojawić się komórki o różnicowaniu plazmatycznym, sygnetowate lub monocytoidne (przypominające utkanie MZL). Istnieje też rzadko występujący wariant o rozlanym wzorze wzrostu, którego utkanie tworzą komórki centrocyto-, centroblastopodobne, co – mimo braku widocznych grudek – pozwala na zakwalifikowanie tego chłoniaka do typu chłoniaka grudkowego [1].

Immunofenotyp: **CD20+**, **CD79α+**, **Ki67 <40%**, **CD10+/-**, **Bcl2+/-** (ujemne są chłoniaki skóry), **Bcl6+/-**, CD43+/-, CD5-, CD23- (widoczna dodatnia reakcja w follikularnych komórkach dendrytycznych), CD30-, ALK1-, cyklina D1-, TdT-





Ryc. 3. Chłoniak grudkowy (FL) – preparat H+E, dodatnia reakcja błonowa CD20 w komórkach chłoniaka, dodatnia reakcja cytoplazmatyczna Bcl2 w komórkach chłoniaka, ekspresja Ki67 w ok. 40% komórek chłoniaka

Chłoniak limfocytarny/białaczka limfocytarna (SLL/CLL) (ryc. 4.)

Nowotwór ludzi dorosłych (powyżej 50. roku życia), zajmujący pierwotnie węzły chłonne lub szpik, zwykle z obrazem białaczkowym we krwi; stwierdza się również wtórne zajęcie wątroby, śledziony i innych narządów pozawęzłowych, np. skóry i gruczołu piersiowego [1]. Jest to choroba o zróżnicowanym przebiegu klinicznym, w większości przypadków długo bezobjawowa. Później pojawiają się objawy typowe dla nacieczenia szpiku, takie jak osłabienie, niedokrwistość, podatność na infekcje i skaza krwotoczna, oraz objawy zajęcia śledziony i wątroby (spleno-, hepatomegalia). U niektórych chorych obserwuje się bardziej agresywny przebieg, transformację do chłoniaka DLBCL lub chłoniaka ziarniczego. Złe rokowanie daje stwierdzenie braku mutacji genów dla regionów zmiennych immunoglobulin (Ig VH) i nadekspresja ZAP-70 oraz ekspresja antygeny CD38 [13, 14, 15]. W obrazie morfologicznym utkanie chłoniaka stanowi monomorficzna populacja małych, okrągłych komórek, zazwyczaj z domieszką komórek większych typu prolimfocyta i para-

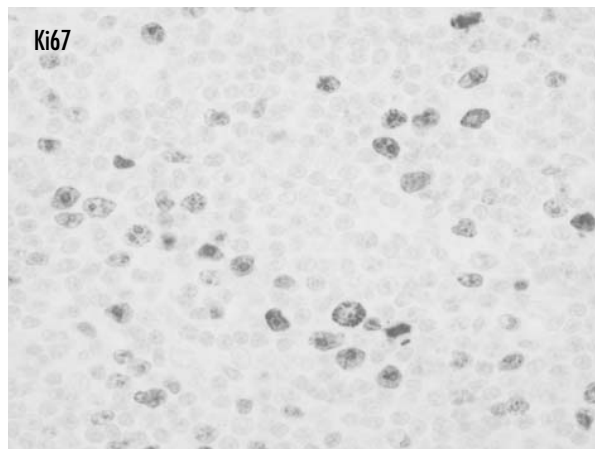
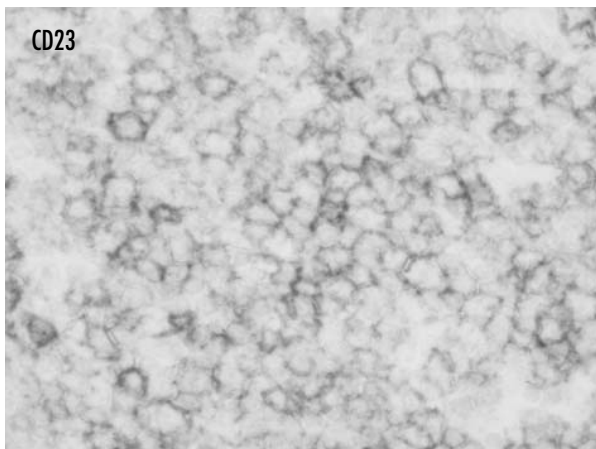
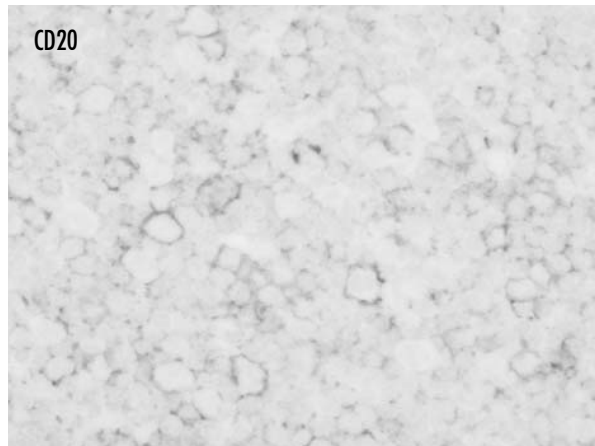
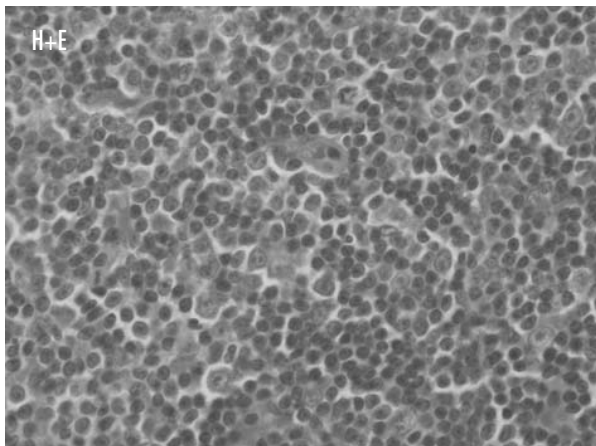
immunoblasta, tworzących centra proliferacyjne, co wiąże się z pseudogrudkowym wzorem wzrostu. Istnieją warianty ze zwiększoną liczbą prolimfocytów lub różnicowaniem plazmatycznokomórkowym [1].

Immunofenotyp: **CD20+**, **CD79α+**, **Ki67 <40%**, **CD5+/-**, **CD23+/-**, **CD43+/-**, **Bcl2+/-**, **Bcl6-**, **CD10-**, **CD30-**, **ALK1-**, **cyklina D1-**, **TdT-**.

Chłoniak strefy brzeżnej (MZL) (ryc. 5.)

W zależności od pierwotnej lokalizacji wyróżnia się postać węzłową (Nodal MZL), pozawęzłową – śledzionową (Splenic MZL), lub związaną z tkanką limfatyczną pozawęzłową, np. systemu MALT przewodu pokarmowego, ślinianek, płuc i gruczołu piersiowego (MZL typu MALT). Chłoniak ten rozwija się zazwyczaj u ludzi dorosłych (powyżej 50. roku życia), często po przewlekłym zapaleniu, czasem o podłożu autoimmunizacyjnym. Przebieg choroby jest zwykle powolny, z zajęciem szpiku (w typie MALT i śledzionowym). W obrazie morfologicznym utkanie chłoniaka stanowi różnorodna populacja małych centrocytopodobnych, monocytoidalnych komórek z pojedynczymi większymi ko-





Ryc. 4. Chłoniak limfocytarny/białaczka limfocytarna (SLL/CLL) – preparat H+E, słabo dodatnia reakcja błonowa CD20 w komórkach chłoniaka, dodatnia reakcja błonowa CD23 w komórkach chłoniaka, ekspresja Ki67 w <40% komórek chłoniaka

mórkami typu centroblastu, immunoblastu, czasem z różnicowaniem plazmatycznokomórkowym. W węzłach chłonnych i miazdze białej śledziony widoczne są zazwyczaj pozostałości nienowotworowych grudek chłonnych, natomiast w tkankach nabłonkowych naciekaające komórki chłoniaka tworzą zmiany limfoepitelialne. Chłoniak ten może ulec transformacji w chłoniaka o wyższym stopniu złośliwości typu DLBCL [1].

Immunofenotyp: **CD20+**, **CD79α+**, **Ki67 <40%**, **Bcl2+**, **Bcl6-**, **CD43+/-**, **CD5-**, **CD10-**, **CD23-**, **CD30-**, **ALK1-**, cyklina D1-, TdT-

Chłoniak z komórek płaszczka (MCL) (ryc. 6.)

Występuje u ludzi starszych (średnia wieku ok. 60 lat), częściej u mężczyzn. Zajmuje pierwotnie węzły chłonne, rzadziej narządy pozawęzłowe: śledzionę, przewód pokarmowy i migdałki, często z nacieczeniem szpiku. W większości przypadków stwierdza się limfadenopatię i hepatosplenomegalię, czasem z obrazem

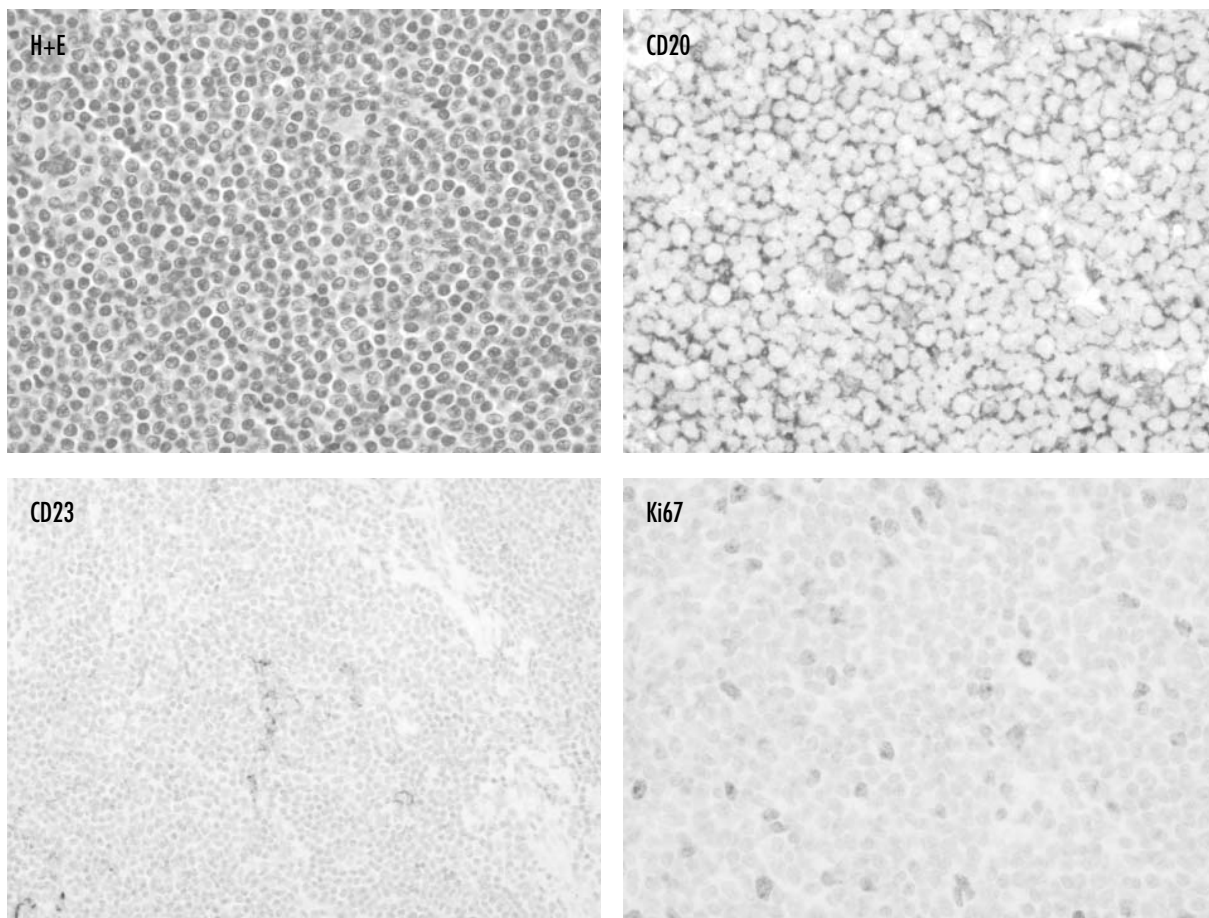
białaczkowym we krwi. W obrazie morfologicznym utkanie chłoniaka stanowi monotonna populacja komórek małej/średniej wielkości przypominających centrocyty, zwykle o rozlanym typie wzrostu, czasem z pozostałościami nienowotworowych grudek chłonnych. Często widoczne są szklawiejące naczynia i pojedyncze epitelioidne histocyty, a także nienowotworowe komórki plazmatyczne. Istnieje też wariant blastoidny charakteryzujący się większymi komórkami i większą aktywnością proliferacyjną, wymagający różnicowania z chłoniakami o wyższym stopniu złośliwości z dużych komórek, np. DLBCL [1, 16].

Immunofenotyp: **CD20+**, **CD79α+**, **Ki67 <40%** (zazwyczaj wyższy niż w innych chłoniakach z małych komórek), **Bcl2+**, **CD5+/-**, **CD43+/-**, **cyklina D1+**, **Bcl6-**, **CD10-**, **CD23-**, **CD30-**, **ALK1-**, TdT-

Chłoniaki nieziarnicze z komórek T/NK

Chłoniaki nieziarnicze z komórek T/NK – występujące rzadziej niż chłoniaki z komórek B – charakteryzu-





Ryc. 5. Chłoniak strefy brzożnej (MZL) – preparat H+E, dodatnia reakcja błonowa CD20 w komórkach chłoniaka, ujemna reakcja CD23 w komórkach chłoniaka (dodatnia w foliularnych komórkach dendrytycznych), ekspresja Ki67 w <40% komórek chłoniaka

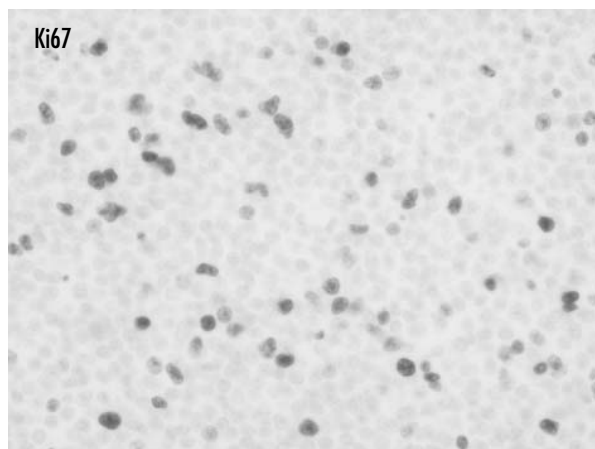
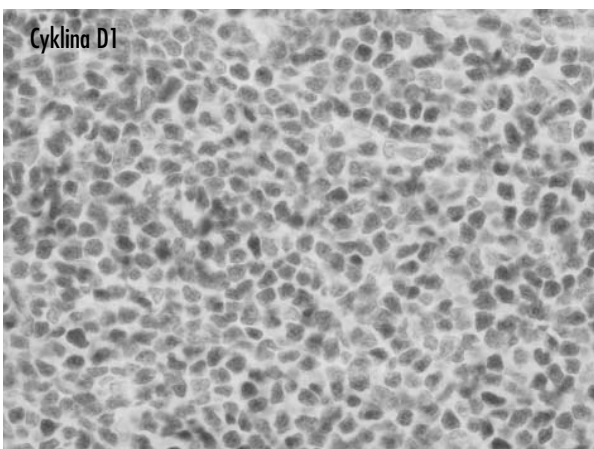
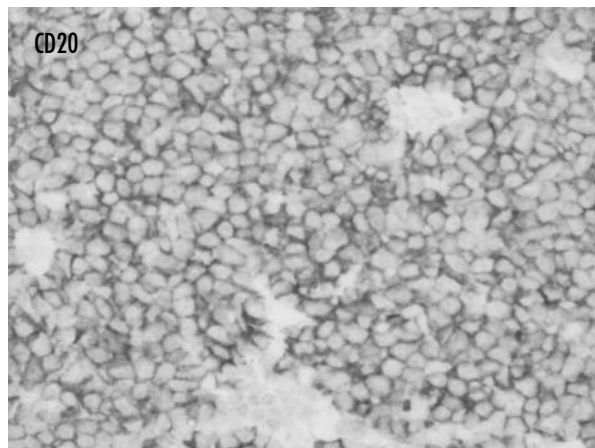
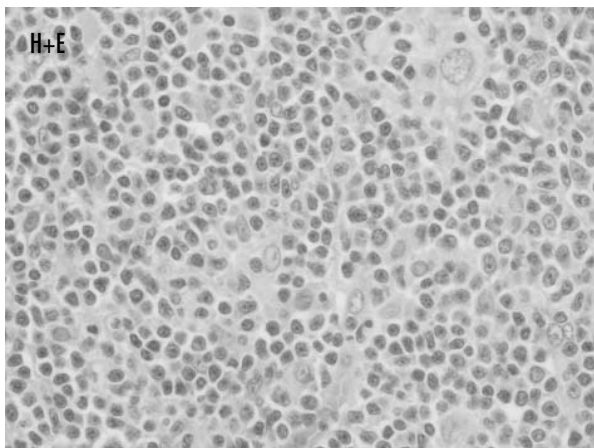
ją się zazwyczaj bardziej agresywnym przebiegiem i są trudniejsze diagnostycznie (obraz morfologiczny i immunofenotypowy często nie wystarcza do rozpoznania zgodnie z klasyfikacją WHO). W diagnostyce rozrostów nowotworowych z komórek T/NK konieczne jest zastosowanie metod biologii molekularnej, a pomocny staje się obraz kliniczny choroby.

Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek (ALCL) (ryc. 7.)

Zaliczany jest do grupy chłoniaków z komórek T, chociaż często nie wykazuje ekspresji typowych antygenów limfocyta T. Utkanie chłoniaka stanowią zazwyczaj duże komórki z obfitą cytoplazmą, zawierającą białka ziarnistości cytotoksycznych (typowych dla komórek T/NK), z polimorficznym tzw. nerkowatym jądrem lub wielojądrowe przypominające komórki Reed-Sternberga. Istnieją też rzadsze warianty: limfohistocytny, drobnokomórkowy, olbrzymiokomórkowy, wrzecionowatokomórkowy, sygnetowatokomórkowy [17]. Ze względu na podobieństwo do innych nowo-

tworów anaplastycznych, np. pochodzenia nabłonkowego, do potwierdzenia różnicowania limfocytarnego konieczne jest zastosowanie metod immunohistochemicznych. Na komórkach chłoniaka stwierdza się ekspresję antygeny CD30 oraz w większości białka ALK (przezbłonowego receptora o aktywności kinazy tyrozynowej), a także antygeny CD43 przy ekspresji tylko jednego lub braku innych markerów limfocyta T. Gen dla ALK w nienowotworowych limfocytach jest nieaktywny, a aktywacji ulega wskutek mutacji, takich jak translokacje, poprzez fuzję z innymi *przeniesionymi* genami, np. dla nukleofosminy [t(2;5)], niemięśniowej tropomiozyny [t(1;2)]. Powstaje wówczas chimeryczne białko, np. NPM-ALK, TPM3-ALK, które jest wykrywalne za pomocą metod immunohistochemicznych. Wzór dodatniej reakcji z przeciwciałem zależy od rodzaju chimerycznego białka, np. w przypadku NPM-ALK za dodatnią uważa się reakcję jądrową, jądrową i cytoplazmatyczną, w przypadku TPM3-ALK – reakcję błonową i cytoplazmatyczną [18, 19]. ALK+ chłoniaki pojawiają się częściej u dzieci i w pierwszych trzech dekadach życia, częściej u mężczyzn, natomiast ALK-





Ryc. 6. Chłoniak z komórek płaszczka (MCL) – preparat H+E, silnie dodatnia reakcja błonowa CD20 w komórkach chłoniaka, dodatnia reakcja jądrowa cykliny D1 w komórkach chłoniaka, ekspresja Ki67 w <40% komórek chłoniaka

u starszych osób i niezależnie od płci. Zazwyczaj występują objawy ogólne (gorączka). Pierwotnie chłoniak ten zajmuje węzły chłonne lub narządy pozalimfatyczne (częściej ALK+), takie jak skóra, kości, tkanki miękkie, płuca i wątroba; wtórnie stwierdza się zajęcie szpiku, czasami bardzo dyskretne, a więc wymagające badań immunohistochemicznych. Chłoniak ten zazwyczaj dobrze reaguje na chemioterapię [1].

Immunofenotyp: **CD30+** (reakcja błonowa i punktowa cytoplazmatyczna w okolicy aparatu Golgiego), **ALK1+/-**, **CD43+/-**, **Ki67 >40%**, **CD3-/+**, **CD5-/+**, **CD4+/-**, **CD7-/+**, **CD8-/+**, **CD15-**.

Inne chłoniaki z obwodowych komórek T/NK

Poza lokalizacją węzłową, chłoniaki z obwodowych komórek T/NK zajmują narządy pozawęzłowe, takie jak skóra, tkanka podskórna, przewód pokarmowy, wątroba, śledziona, okolice nosogardła i zatok, czasami z fazą białaczkową we krwi. W niektórych przypadkach czynnikiem etiologicznym są wirusy EBV lub HTLV-1. Za-

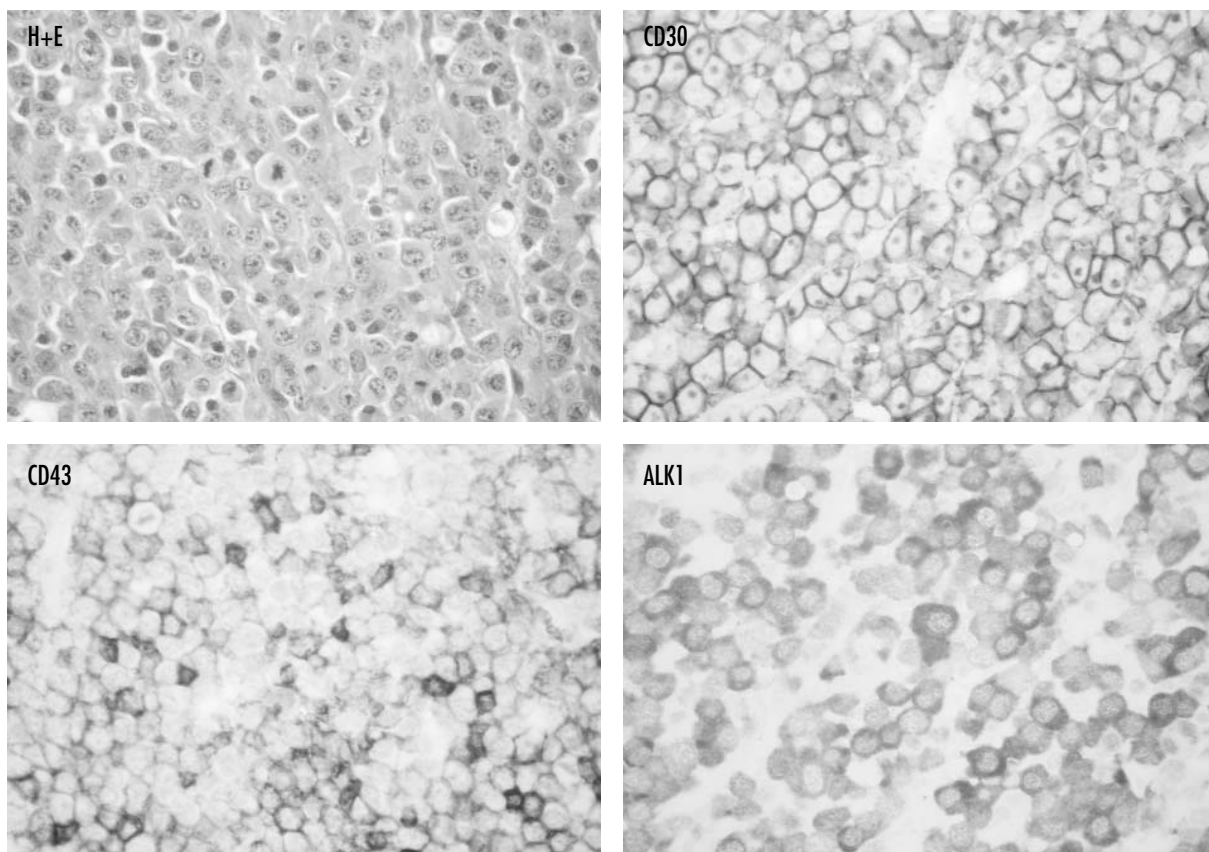
zwyczaj występują objawy kliniczne, takie jak zmiany skórne, gorączka, zespół hemofagocytarny i hepatosplenomegalia. W obrazie morfologicznym widoczny jest polimorfizm komórkowy, obecne pojedyncze komórki przypominające komórki Reed-Sternberga, angiocentryzm, obszary martwicy i apoptozy, współistniejące zapalenie. Nie ma specyficznych markerów immunohistochemicznych dla poszczególnych typów chłoniaków z komórek T/NK. O różnicowaniu komórek chłoniaka w kierunku limfocytów T/NK świadczy ekspresja przynajmniej jednego z antygenów linii T/NK, często część komórek wykazuje też ekspresję antygeny CD30 [1].

Immunofenotyp: **CD3+/-**, **CD5+/-**, **CD30+/-**, **Ki67 >40%**, **CD4+/-**, **CD7+/-**, **CD8+/-**, **CD43+/-**, **CD56+/-**, **CD57+/-**, TdT-.

Chłoniak ziarniczny (chłoniak Hodgkina, ziarnica złośliwa)

Chłoniak ziarniczny występuje głównie u ludzi młodych. W części przypadków pojawiają się objawy ogóln-





Ryc. 7. Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek (ALCL) – preparat H+E, dodatnia reakcja błonowa i cytoplazmatyczna punktowa CD30 w komórkach chłoniaka, dodatnia reakcja błonowa CD43 w komórkach chłoniaka i pojedynczych limfocytach, dodatnia reakcja cytoplazmatyczna ALK1 w komórkach chłoniaka

ne: gorączka, świąd skóry, nocne poty i spadek masy ciała. Chłoniak ten zajmuje pierwotnie najczęściej węzły chłonne przyosiowe, tzn. wzdłuż środkowej linii ciała: szyjne, śródpiersiowe, przyaortalne. W obrazie morfologicznym w utkaniu węzła muszą być obecne dwa elementy: właściwe komórki nowotworowe – wielojądrowe komórki Reed-Sternberga (RS) i jednojądrowe komórki Hodgkina, oraz elementy nacieku zapalnego – nienowotworowe limfocyty, eozynofile, neutrofile, komórki plazmatyczne i histiocyty. Komórki RS są zwykle otoczone rozetą limfocytów T. Zgodnie z klasyfikacją WHO wyróżnia się 2 podstawowe typy różniące się immunofenotypem komórki nowotworowej: chłoniak Hodgkina guzkowy z przewagą limfocytów (NLPHL) i klasyczny chłoniak Hodgkina (CHL).

Chłoniak Hodgkina guzkowy z przewagą limfocytów (NLPHL)

W NLPHL występuje wariant komórki RS – tzw. komórka LH (limfo/histiocytarny wariant) o fenotypie komórki B, a naciek zapalny złożony jest z limfocytów. Na ten typ chłoniaka chorują przede wszystkim mężczyźni w wieku 30–50 lat. Zajęte są zazwyczaj węzły

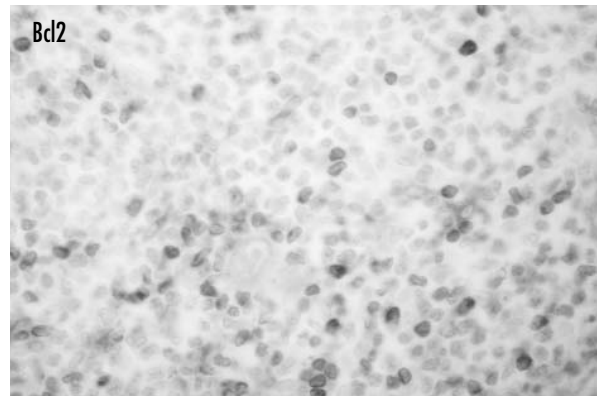
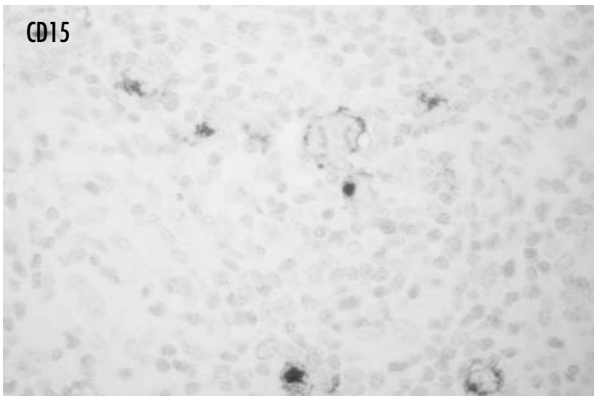
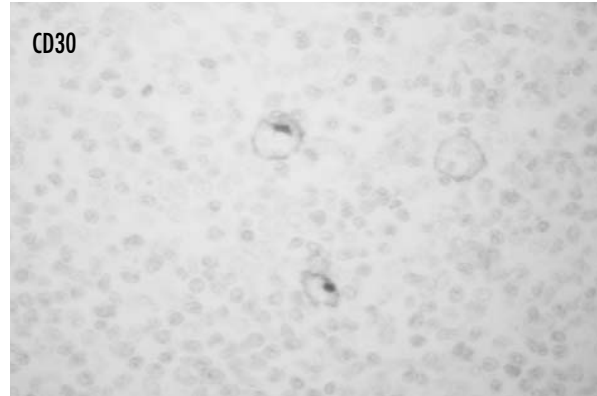
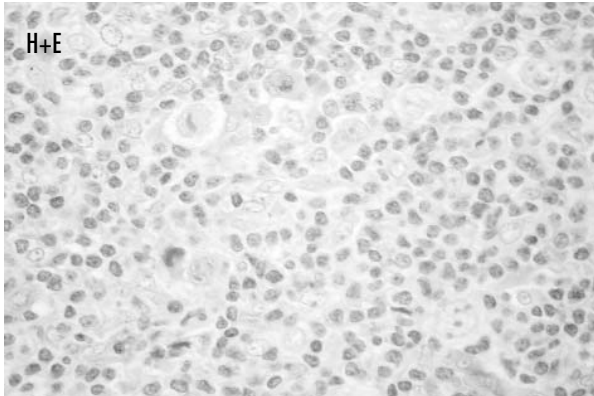
chłonne szyjne, pachowe, pachwinowe, bardzo rzadko stwierdza się natomiast zajęcie węzłów śródpiersiowych, śledziony i szpiku [1].

Immunofenotyp komórki RS-LH: **CD20+**, **CD79α+**, **Ki67+**, Bcl2+/-, Bcl6+/-, LCA+/-, EMA+/-, CD15-, CD30-.

Klasyczny chłoniak Hodgkina (CHL) (ryc. 8.)

Wyróżnia się 4 typy morfologiczne CHL: stwardnienie guzkowe (NS), mieszanokomórkowy (MC), bogaty w limfocyty (LR) i z zanikiem limfocytów (LD). W CHL występują jednojądrowe komórki Hodgkina i wielojądrowe komórki Reed-Sternberga, a naciek zapalny tworzą limfocyty oraz (poza podtypem LR) eozynofile, neutrofile, histiocyty, plazmocyty, w podtypie NS i LD także fibroblasty i włókna kolagenowe. Ogólna zapadalność na CHL jest niezależna od płci. Chorują osoby w wieku 15–35 lat oraz osoby starsze. Zajęte są najczęściej węzły chłonne szyjne, śródpiersiowe (zwłaszcza w NS), pachowe i przyaortalne; częściej niż w NLPHL obserwuje się zajęcie śledziony (w MC, LD) i szpiku





Ryc. 8. Chłoniak ziarniczny typu NS – preparat H+E, dodatnia reakcja błonowa i cytoplazmatyczna punktowa CD30 w komórkach RS, dodatnia reakcja błonowa i cytoplazmatyczna punktowa CD15 w komórkach RS, dodatnia reakcja cytoplazmatyczna Bcl2 w komórkach RS

(w LD). W patogenezie CHL pewną rolę odgrywa wirus EB; w niektórych przypadkach jego antygeny są wykrywalne w komórkach RS [1].

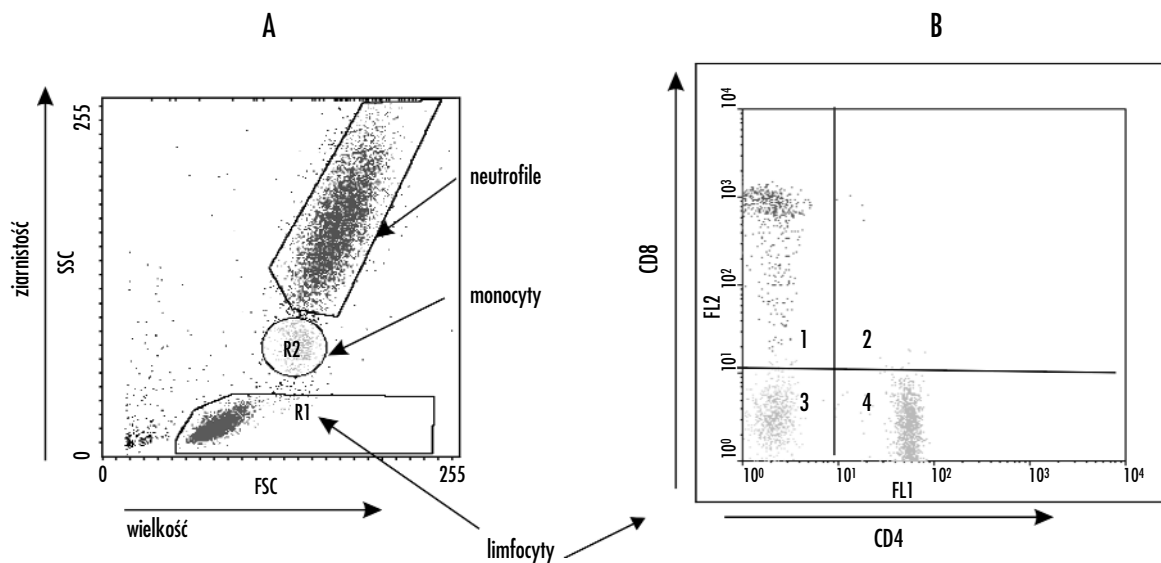
Immunofenotyp komórki RS: **CD30+**, **CD15+/-**, **Ki67+**, Bcl2+/-, CD20-/+ , CD79α-/+ , LCA-, EMA-.

Do rozpoznania i określenia typu chłoniaka konieczne jest zastosowanie metod immunohistochemicznych. Na podstawie piśmiennictwa [1, 2] i dotychczasowych doświadczeń autorzy proponują panel niezbędnych przeciwciał stosowanych w diagnostyce chłoniaków do oznaczania następujących markerów: **CD3, CD5, CD10, CD15, CD20, CD23, CD30, CD43, CD79α, cyklina D1, ALK1, Bcl2, Bcl6, TdT, Ki67**. Ten zestaw przeciwciał autorzy uważają za podstawowy, zalecają jednak oznaczanie dodatkowych markerów w niektórych wybranych przypadkach: CD4, CD7, CD8, CD56, CD57 – w diagnostyce chłoniaków z komórek T/NK; kappa, lambda, CD138, IgM, EMA – do określania różnicowania plazmatycznokomórkowego i monoklonalności linii B (kappa, lambda); EMA, LCA – pomocne w diagnostyce ALCL, NLPHL; CD34 – do wykrycia niedojrzałych komórek typu limfoblasta; CD38, ZAP-70

– czynniki rokownicze SLL/CLL; DBA44, aneksyna A1 – w diagnostyce białaczki włochatokomórkowej HCL; FMC7, IgD, IRTA, p27, Pax5 – w różnicowaniu chłoniaków z małych komórek B (np. MCL, MZL); MUM-1 – w różnicowaniu chłoniaków z małych i dużych komórek B (np. FL, DLBCL, MZL); EBV antygeny – w celu stwierdzenia infekcji EBV [13–15, 20–22].

Oznaczanie wielu markerów w połączeniu z obrazem morfologicznym pozwala często na postawienie rozpoznania, zwłaszcza w przypadku chłoniaków z komórek B. Należy jednak pamiętać o istnieniu nietypowych wariantów, które wykazują odmienny immunofenotyp, np. brak ekspresji antygeny CD10 w chłoniaku grudkowym lub brak CD5 w chłoniaku z komórek płaszczka czy nietypowa ekspresja antygeny CD23 w chłoniaku z komórek płaszczka lub FMC7 w chłoniaku limfocytarnym. Metody immunohistochemiczne mają też mniejsze znaczenie w diagnostyce chłoniaków z komórek T/NK. Z tego powodu w diagnostyce chłoniaków zawsze konieczna jest korelacja z obrazem klinicznym, a w niektórych przypadkach, np. do wykrywania mutacji i określania klonalności limfocytów, zastosowanie także innych metod, takich jak cytometria przepływowa i metody biologii molekularnej.





Ryc. 9. A – obraz morfologii krwi obwodowej w badaniu cytometrycznym, na osi X – wielkość komórek, na osi Y – ziarnistość komórek; B – obraz immunofenotypowy *bramkowanych* limfocytów, na osi X – reakcja z przeciwciałem CD4-Fitc (zielona barwa fluorescencji), na osi Y – reakcja z przeciwciałem CD8-PE (czerwona barwa fluorescencji). 1: limfocyty CD8(+), 4: limfocyty CD4(+), 3: limfocyty CD4(-), CD8(-) – głównie limfocyty B i komórki NK

Rola cytometrii przepływowej w diagnostyce chłoniaków

W ciągu ostatnich dwóch dekad cytometria przepływowa stała się narzędziem wykorzystywanym nie tylko w badaniach naukowych, ale także uznanym narzędziem diagnostycznym w ocenie immunofenotypu i ploidi DNA komórek. Po wprowadzeniu klasyfikacji REAL/WHO [3, 5, 23, 24] praktyczne znaczenie oceny immunofenotypowej znacznie wzrosło i trudno dzisiaj mówić o diagnostyce rozrostów nowotworowych wywodzących się z układu krwiotwórczego bez prawidłowej oceny immunofenotypowej [25, 26, 27, 28]. Cytometria przepływowa może okazać się bardzo przydatna w ocenie materiału uzyskanego z aspiracyjnej biopsji cienkoigłowej [24, 29], która pozwala zwykle na skuteczne różnicowanie rozrostów odczynowych i nowotworowych węzłów chłonnych, jednak jej czułość i swoistość bywa często ograniczona [25, 30], a przez niektórych uważana wręcz za kontrowersyjną [31–34].

Metoda cytometrii przepływowej opiera się na możliwości skanowania przy użyciu światła laserowego zawiesiny komórek, które bardzo szybko przepływają w laminarnym strumieniu buforu. Przy odpowiedniej gęstości zawiesiny pozwala to na analizę nawet kilkudziesięciu tysięcy komórek w ciągu kilku sekund. Analizę w cytometrze przepływowym poprzedza inkubacja zawiesiny komórek z odpowiednimi do celów diagnostycznych przeciwciałami monoklonalnymi. Przeciwciała muszą być znakowane fluorochromami, wzbudzonymi do świecenia w trakcie skanowania komórek przez światło lasera. Rodzaj związanego przeciwciała cytometr rozpoznaje po barwie światła fluorescencyjnego,

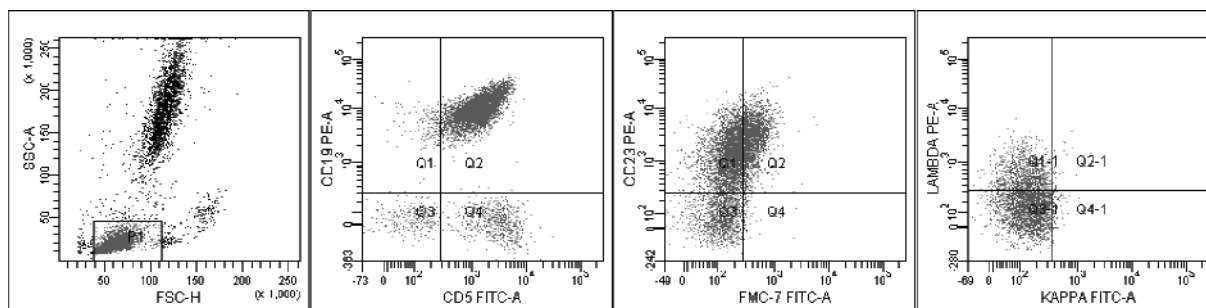
które emituje związany z tym przeciwciałem fluorochrom. Przeciwciała mogą być znakowane fluorochromami o różnych barwach emitowanej fluorescencji, co pozwala – w zależności od klasy cytometru przepływowego – na ocenę od 2 do 6 różnych antygenów CD na jednej komórce. Światło fluorescencyjne może być analizowane nie tylko pod względem jakościowym, długości emitowanej fali, ale także pod względem ilościowym – intensywności świecenia (ryc. 9.). Pozwala to na precyzyjną analizę gęstości markerów na powierzchni komórek. Parametr ten może stanowić pomocne kryterium w różnicowaniu niektórych typów chłoniaków [35], dostarcza także cennych informacji pozwalających na podejmowanie racjonalnych decyzji w doborze terapii przeciwciałami monoklonalnymi.

Do zalet cytometrii przepływowej należy zaliczyć [36]:

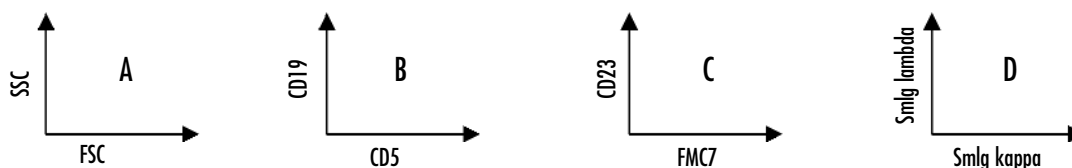
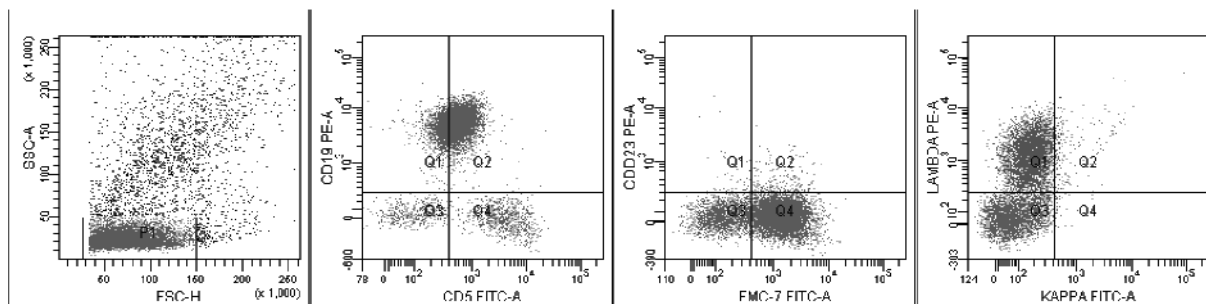
- możliwość oceny wielu markerów na jednej komórce, w tym markerów zlokalizowanych nawet w obrębie tej samej struktury komórkowej;
- możliwość *bramkowania*, tj. wydzielenia do analizy na podstawie cech morfologicznych bądź immunofenotypowych odrębnej, mniej licznej subpopulacji komórek zawartych w danej zawieszynie;
- możliwość oceny jakościowej i ilościowej ekspresji poszczególnych markerów w obrębie wydzielonej *bramką* subpopulacji;
- łatwość oceny ploidi DNA;
- wymóg niewielkiej ilości materiału biologicznego potrzebnego do szerokiej oceny immunofenotypowej (2–3 ml krwi, 0,5 ml szpiku, ok. 1 mm³ tkanki chłonnej);



Przewlekła białaczka limfatyczna (krew obwodowa) – B-CLL



Chłoniak z komórek płaszczka (węzeł chłonny) – MCL



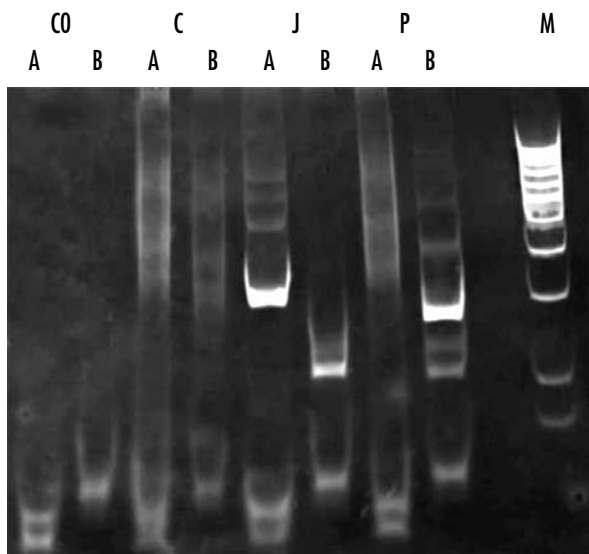
Ryc. 10. Obraz immunofenotypowy przewlekłej białaczki limfatycznej (panel górny – krew obwodowa) i chłoniaka z komórek płaszczka (panel dolny – węzeł chłonny) w oznaczeniach przeciwciałami CD19, CD5, CD23, FMC7, Smlg kappa i Smlg lambda

- możliwość oceny immunofenotypowej materiału biologicznego uzyskanego z biopsji cienkoigłowej, biopsji endoskopowej;
- czułość pozwalająca na wykrycie bardzo niewielkich populacji komórek nowotworowych, co daje możliwość monitorowania choroby resztkowej;
- niewielką inwazyjność badania dla pacjenta;
- możliwość weryfikowania rozrostów nowotworowych na podstawie braku ekspresji markerów – pojęcie tzw. *dziury antygenowej*, np. w przypadku rozrostów nowotworowych z limfocytów T;
- możliwość stosowania znacznie szerszego panelu przeciwciał monoklonalnych (ponieważ oceniane są antygeny natywne, a nie utrwalane);
- znacznie większą czułość niż ludzkie oko, co pozwala na odróżnienie bardzo słabej ekspresji poszczególnych markerów;
- ze względu na czułość, łatwiejszą niż metodami immunomorfologicznymi ocenę monoklonalności rozrostów B-komórkowych, w oparciu o restrykcję łańcuchów lekkich immunoglobulin powierzchniowych;
- krótki czas od pobrania materiału do uzyskania wyniku (możliwe w ciągu kilku godzin).

Do wad cytometrii przepływowej należy zaliczyć:

- brak możliwości oceny morfologii reakcji immunofenotypowej w obrębie struktur komórkowych, co nie daje np. możliwości zróżnicowania, czy reakcja dotyczy jądra, czy cytoplazmy; o lokalizacji reakcji można jedynie wnioskować, porównując reakcje przed i po permeabilizacji błony komórkowej;
- trudność oceny immunofenotypowej komórek łatwo ulegających uszkodzeniu, co może mieć znaczenie w ocenie chłoniaków wielkokomórkowych oraz oce-





Ryc. 11. Elektroforogram żelu poliakrylamidowego przedstawiający rozdział produktów reakcji. Reakcję przeprowadzono, używając jako matrycy DNA izolowanego z komórek hodowli komórkowej Jurkat (J); z krwi pacjenta, u którego zdiagnozowano odzynowy rozrost limfocytów T (C); z krwi pacjenta, którą skierowano do badania (P). Kontrola czystości reakcji, w której nie podano matrycy – CO. Marker *mas Low Range* (Fermentas) – M. A i B – oddzielne reakcje PCR z wykorzystaniem różnych zestawów starterów

nie komórek Reed-Sternberga w ziarnicy złośliwej;

- ograniczony czas wykonania reakcji (komórki muszą być żywe);
- trudność w ocenie rozrostów słabo zdefiniowanych immunofenotypowo, np. chłoniaka wielkokomórkowego z komórek B.

Na podstawie oceny ekspresji takich antygenów, jak CD19, CD 10, CD20, CD5, CD23, FMC7, łańcuchów lekkich Smlg lambda i Smlg kappa, cytometria przepływowa pozwala na postawienie rozpoznania przewlekłej białaczki limfatycznej B-CLL/SLL, chłoniaka z komórek płaszczka MCL i chłoniaka grudkowego FL. Do charakterystycznych cech tych rozrostów w obrazie cytometrycznym należą:

- przewlekła białaczka limfatyczna z komórek B/rozlany chłoniak limfocytarny z małych komórek (B-CLL/SLL) – koekspresja antygenów komórek B (CD20+, CD19+) oraz antygenów CD5(+) i CD23(+) przy niskiej ekspresji immunoglobulin powierzchniowych i stosunkowo niskiej ekspresji antygenów CD20(+) i braku FMC7(-) (ryc. 10.);
- chłoniak grudkowy (FL) – brak ekspresji antygenów CD5(-), obecność CD10+, wyraźna ekspresja antygenów CD20+ i immunoglobulin powierzchniowych;
- chłoniak z komórek płaszczka (MCL) – CD5(+), FMC7(+), brak ekspresji CD23(-), silna ekspresja antygenów CD20(+) i immunoglobulin powierzchniowych (ryc. 10.).

Należy zaznaczyć, że istnieją nietypowe postacie tych nowotworów, w których mogą występować różnice manifestujące się brakiem jednego z wyżej podanych antygenów lub pojawieniem się innego markera niespotykanego zwykle w danej jednostce chorobowej. Przykładem może być brak antygenów CD23 na komórkach przewlekłej białaczki limfatycznej B, przy czym ten sam antygen może pojawić się na komórkach chłoniaka z komórek płaszczka (*mantle cell lymphoma*), na których zwykle nie występuje.

Cytometria przepływowa w połączeniu z obrazem cytologicznym bądź histologicznym może być też pomocna w różnicowaniu takich rozrostów, jak chłoniaki z dużych komórek, chłoniak Burkitta (CD10+, przy braku CD34-, TdT-) czy chłoniaki limfoblastyczne (CD34+, TdT+), oraz służyć do oceny aktywności proliferacyjnej badanych populacji komórkowych (Ki-67). Odczyn ten można również skojarzyć z ekspresją markerów zlokalizowanych na błonie komórkowej, co bardzo ułatwia rozpoznawanie np. chłoniaka Burkitta i chłoniaków limfoblastycznych.

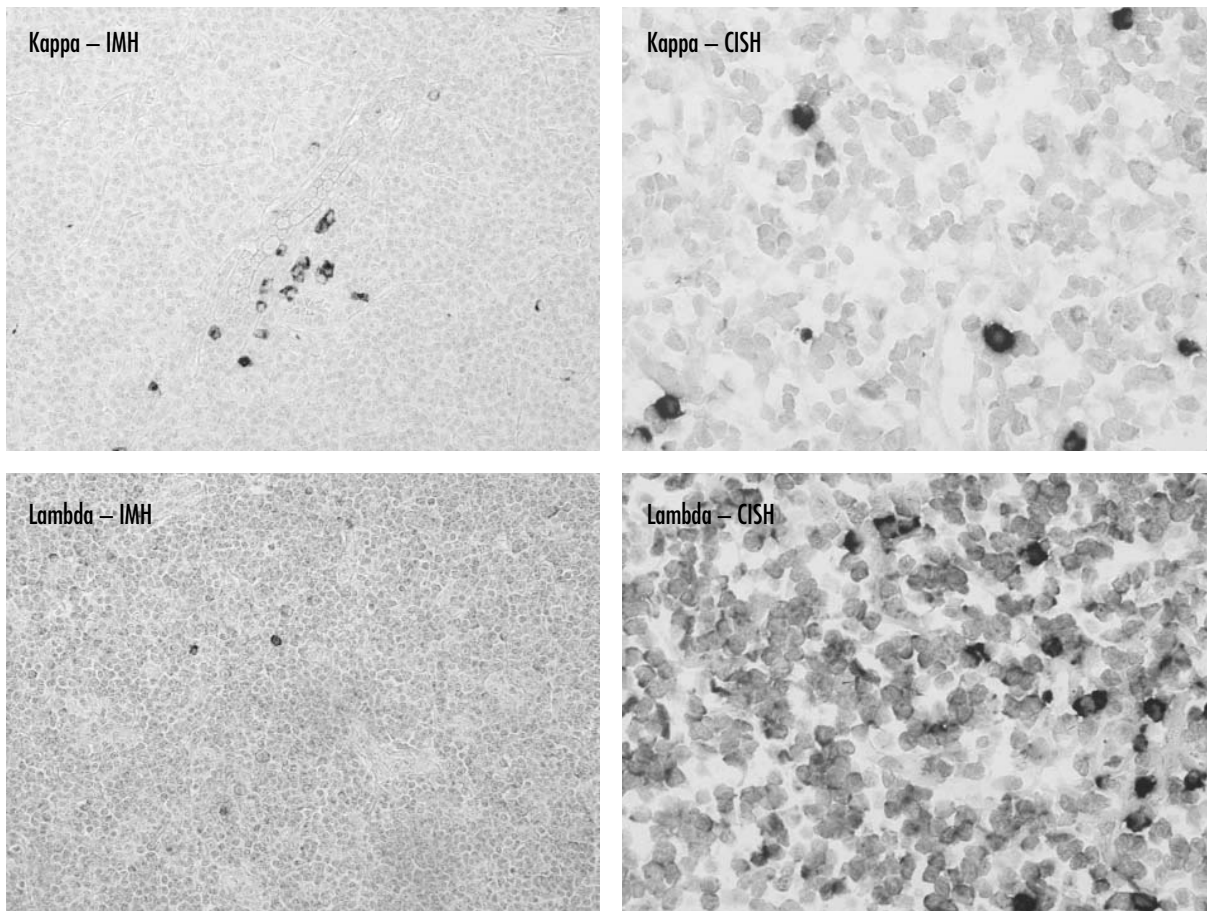
Analiza immunofenotypowa w cytometrii przepływowej umożliwia także różnicowanie większości rzadszych rozrostów nowotworowych z komórek T, komórek NK, NK-T, komórek dendrytycznych, rzadkich postaci rozrostów nowotworowych z komórek B, pozwalając precyzyjnie określić stopień ich dojrzałości. Trudności można napotkać w ocenie monoklonalności limfocytów T. Dostępne są metody opierające się na analizie repertuaru limfocytów T w oparciu o ekspresję łańcucha TCR V beta [37], jednak ze względu na wysokie koszty tego badania nie jest ono powszechnie stosowane.

W podsumowaniu należy podkreślić, że w diagnostyce chłoniaków cytometria przepływowa stanowi bardzo przydatną, szybką, a także dostępną pod względem kosztów technologię, użyteczną zwłaszcza w sytuacjach niewielkiej ilości materiału biologicznego. Stanowi ponadto wartościowe narzędzie monitorowania choroby resztkowej.

Ocena rearanżacji genu receptora antygeny TCR γ w rozrostach nowotworów z komórek T

Wśród rozplemów nowotworowych wywodzących się z komórek układu krwiotwórczego wiele trudności diagnostycznych sprawiają chłoniaki i białaczki pochodzące z linii komórek T. W znacznej większości limfocytarnych nowotworów złośliwych (>98%), w limfocytach zachodzi identyczne (klonalne) przegrupowanie (rearanżacja) genów kodujących immunoglobuliny lub receptory komórek T (TCR). Na podstawie molekularnych badań genów TRG kodujących łańcuchy γ receptorów TCR możliwa jest ocena klonalności rozplemów nowotworowych limfocytów T.





Ryc. 12. Chłoniak strefy brzeżnej. IMH – reakcja immunohistochemiczna: dodatnie łańcuchy lekkie immunoglobulin kappa tylko w komórkach plazmatycznych, łańcuchy lekkie lambda słabo dodatnie w komórkach chłoniaka, silnie dodatnia reakcja w komórkach plazmatycznych; CISH – hybrydyzacja *in situ* z użyciem chromogenu: dodatnia cytoplazmatyczna ekspresja łańcuchów lekkich kappa tylko w komórkach plazmatycznych, dodatnia cytoplazmatyczna ekspresja łańcuchów lekkich lambda w komórkach chłoniaka, silnie dodatnia reakcja w komórkach plazmatycznych

Klonalna rearanżacja genów kodujących immunoglobuliny lub receptory komórek T występuje w większości limfocytarnych nowotworów złośliwych. Dużo rzadziej pojawia się w przypadku rozrostów nowotworowych komórek NK. Około 25–30% przypadków sprawiających duże trudności diagnostyczne może być poprawnie rozpoznana dzięki dobrze zdefiniowanym markerom klonalności. Geny TRG ulegają przegrupowaniu we wczesnych etapach różnicowania komórek T, a ich zmienność jest stosunkowo ograniczona. Repertuar kombinatoryczny TRG/D wynosi $\sim 5 \times 10^3$, w porównaniu z repertuarem $\sim 3 \times 10^6$ dla TRA/B i $\sim 2 \times 10^6$ dla IG.

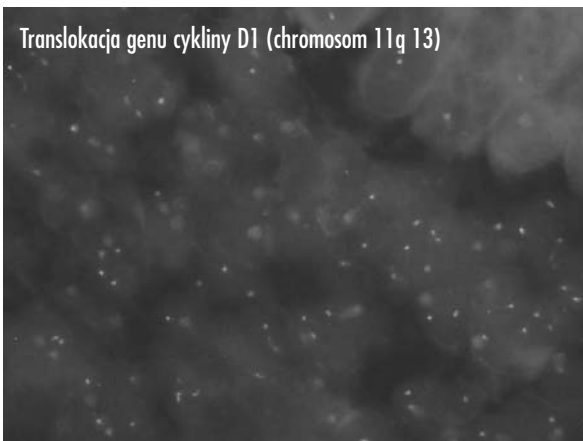
Diagnostyka prowadzona jest w oparciu o protokół europejskiego projektu badawczego BIOMED-2 *Concerted Action* [38]. Podczas badania wykorzystuje się technikę multiplex PCR, zakończoną analizą heterodupleksów wraz z rozdziałem elektroforetycznym produktów reakcji w żelu poliakryloamidowym. Całość badania opiera się na dwóch reakcjach PCR (A i B),

każda zawiera zestaw czterech starterów (z puli sześciu) na reakcję.

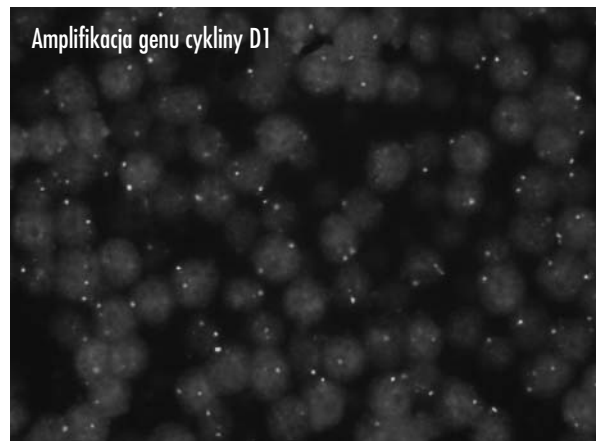
Matrycę stanowi DNA izolowany z tkanek dostarczonych do badania. Matrycą w negatywnej reakcji kontrolnej jest DNA izolowany z krwi pacjenta, u którego rozpoznano odczynowy rozrost limfocytów T. Matrycę w kontroli pozytywnej stanowi DNA izolowany z komórek hodowli komórkowej Jurkat, będącej linią ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej T. Wynikiem badania jest elektroforogram. Obecność prążka na obrazie żelu świadczy o istnieniu monoklonalnej rearanżacji w obrębie genów TRG. W przypadku braku rozrostu komórek T lub w przypadku rozrostu o charakterze odczynowym obserwuje się smugę świadczącą o obecności pełnego repertuaru zrearanzowanych genów (ryc. 11.).

Geny TRG wydają się być odpowiednimi do badań klonalności ze względu na fakt, iż do ich rearanżacji dochodzi we wczesnych etapach różnicowania komórek T. Mimo iż w linii komórek T ekspresyjujących receptory TCR $\alpha\beta$ nie dochodzi do ekspresji łańcuchów $\gamma\delta$ recep-





Ryc. 13. FISH metoda *split*. Translokacja genu cykliny D1 (chromosom 11q13) w komórkach chłoniaka z komórek płaszczka – oddzielone od siebie sygnały: czerwony i zielony w komórce chłoniaka



Ryc. 14. Amplifikacja genu cykliny D1 w komórkach chłoniaka z komórek płaszczka; sygnał zielony – telomery, po dwa w jądrze komórkowym; sygnał czerwony – amplifikacja genu cykliny D1, powyżej pięciu w jądrze komórkowym

torów TCR na poziomie białka, w przeciwieństwie do genów TRD (kodujących łańcuch δ receptora) geny TRG nie ulegają delecji i zrearranżowana forma genu nadal występuje w linii TCR $\alpha\beta$. Dzięki temu możliwa jest ocena klonalności rozrostów limfocytów T nie tylko w przypadku limfocytów z ekspresją TCR $\gamma\delta$, lecz także w przypadkach nowotworów wywodzących się z linii TCR $\alpha\beta$.

Hybrydyzacja *in situ* w diagnostyce chłoniaków

Hybrydyzacja jest jedną z podstawowych metod identyfikacji kwasów nukleinowych o określonej sekwencji nukleotydów. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych przypomina reakcję antygen-przeciwciała. W uproszczeniu można powiedzieć, że w obu tych interakcjach odpowiednie cząsteczki tworzą kompleksy, rozpoznając się wzajemnie dzięki budowie przestrzennej (zasada klucza i zamka). Rolę przeciwciała w hybrydyzacji spełnia tzw. sonda, czyli cząsteczka DNA lub RNA komplementarna wobec sekwencji nukleotydowej, którą chcemy wykryć. Sondę można wyznakować izotopem, chromogenem lub fluorochromem. W zależności od zastosowanego znacznika wynik reakcji ocenia się za pomocą autoradiografii lub też za pomocą mikroskopu świetlnego czy też fluorescencyjnego. Czułość tych metod pozwala na wykrycie pojedynczej kopii sekwencji nukleotydowej obecnej w komórce [39].

Większość chłoniaków to chłoniaki z obwodowych komórek B. W komórkach tych nowotworów stwierdza się rearanżację genów immunoglobulin i w konsekwencji komórki te mogą wytwarzać jedynie łańcuchy lekkie jednej klasy (lambda lub kappa). Stwierdzenie ekspresji cytoplazmatycznej lub błonowej tylko jednego z tych łańcuchów świadczy o monoklonalności rozplemu ko-

mórek nowotworowych, a zatem o jego nowotworowym charakterze. Ekspresję cytoplazmatyczną łańcuchów lekkich można wykazać za pomocą immunohistochemii, wykazanie immunohistochemiczne ekspresji błonowej jest jednak trudne i w większości laboratoriów niemożliwe. Alternatywnie można zastosować metodę CISH (chromogen *in situ* hybridization), czulszą od metody immunohistochemicznej (ryc. 12.).

W diagnostyce chłoniaków praktyczne znaczenie ma wykrywanie niektórych translokacji. Obecnie dostępne są już handlowe zestawy służące do wykrywania wielu translokacji za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Do najczęściej wykrywanych translokacji należą: t(11;14) w chłoniaku z komórek płaszczka, t(14;18) w chłoniaku grudkowym, t(8;14) w chłoniaku Burkitta i t(11;18) w chłoniaku strefy brzeżnej [1]. Prawidłowe rozpoznanie tych chłoniaków jest bardzo ważne i dlatego poza metodami histologicznymi i immunohistochemicznymi zaleca się potwierdzenie rozpoznania metodą FISH. Do niedawna stosowano przede wszystkim metodę FISH typu *fusion*. W metodzie tej sekwencje obecne na różnych chromosomach (wyznakowane różnymi fluorochromami) znajdują się na jednym chromosomie; w efekcie zamiast dwóch punktów o różnych barwach widzimy jeden punkt o barwie będącej wypadkową obu znaczników. W praktyce metoda ta jest skomplikowana i wymaga liczenia wyników fuzji w licznych jądrach komórkowych.

Obecnie częściej stosuje się metodę *split*, w której dwoma fluorochromami znakuje się miejsca sąsiadujące z miejscem spodziewanej translokacji. W wyniku translokacji zamiast dwóch barwnych sygnałów znajdujących się obok siebie widzimy sygnały oddzielone od siebie. Stwierdzenie oddalonych od siebie pojedynczych sygnałów chociażby w kilku komórkach świad-



czy o obecności translokacji, a zatem o charakterze nowotworowym badanych komórek (ryc. 13.).

Poza wykrywaniem translokacji, w diagnostyce chłoniaków można również wykrywać amplifikację wybranych genów. W metodzie tej jednym znacznikiem znakuje się centromery chromosomu, na którym znajduje się interesujący nas gen, a drugim sam gen. O amplifikacji można mówić wtedy, gdy w jądrze komórkowym widać dwa sygnały telomerów i co najmniej pięć sygnałów genu. Przykładem jest badanie amplifikacji genu cykliny D1. Taką amplifikację stwierdza się w chłoniakach z komórek płaszczka (ryc. 14.). Niedogodnością tej metody jest konieczność liczenia sygnałów w wielu komórkach w celu uzyskania wyniku.

Podsumowanie

W diagnostyce patomorfologicznej chłoniaków można wyróżnić kilka etapów:

1. Ocena histopatologiczną węzła chłonnego (lub szpiku), najlepiej z równoczesną oceną cytologiczną *imprintów* węzła. Zwraca się tu uwagę na budowę węzła i cechy morfologiczne komórek limfoidalnych.
2. Określenie ekspresji markerów komórek B, T i NK za pomocą metod immunohistochemicznych i/lub cytometrycznych.
3. Ocena klonalności rozplemu komórek limfoidalnych. Klonalność komórek B potwierdza badanie ekspresji łańcuchów lekkich immunoglobulin za pomocą metod immunohistochemicznych lub cytometrycznych. Alternatywnie stosuje się hybrydyzację *in situ*.
4. W uzasadnionych lub wątpliwych przypadkach wykorzystuje się metody biologii molekularnej, przede wszystkim fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*.

Piśmiennictwo

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, 2001.
2. Stachura J, Rudzki Z, Gałązka K i wsp. Diagnostyka chłoniaków. Zarys standardów diagnostycznych. Pol J Pathol 2006; 57:1-8.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-1392.
4. Lennert K, Feller AC. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas. 2nd Springer Verlag, Berlin 1992.
5. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. Mod Pathol 2000; 13: 193-207.
6. Fritz A, Percy C, Jack A, et al. International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O), Third Edition, WHO 2000.
7. Żeromski J. Metody immunologiczne. Przewodnik do ćwiczeń z immunologii dla studentów Wydziału Lekarskiego. Poznań, 1997.
8. Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood 1997; 89: 3909-3918.
9. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic

- subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. J Clin Oncol 1998; 16: 2780-2795.
10. Burkitt DP, Wright DH. Burkitt's lymphoma. Livingstone: Edinburgh and London, 1970.
11. Raphael M, Gentilhomme O, Tulliez M, et al. Histopathologic features of high-grade non-Hodgkin's lymphomas in acquired immunodeficiency syndrome. The French Study Group of Pathology for Human Immunodeficiency Virus-Associated Tumors. Arch Pathol Lab Med 1991; 115: 15-20.
12. Magrath IT, Sariban E. Clinical features of Burkitt's lymphoma in the USA. IARC Sci Publ 1985; 119-127.
13. Sabattini E, Orduz R, Campidelli C, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma: role of ZAP-70 determination on bone marrow biopsies. J Clin Pathol 2006 [Epub].
14. Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, et al. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. Mod Pathol 2004; 17: 954-61.
15. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig V (H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94: 1848-54.
16. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, et al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. Blood 1997; 89: 2067-2078.
17. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. Blood 1998; 91: 2076-2084.
18. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. Science 1994; 263: 1281-1284.
19. Lamant L, Dastugue N, Pulford K, et al. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. Blood 1999; 3088-3095.
20. Sato H, Sato Y, Ichimura K, et al. P27 (Kip1) is detected on most gastric MALT lymphomas, but not large cell lymphomas. J Clin Exp Hematop 2006; 46: 25-30.
21. Delgado J, Matutes E, Morilla AM, et al. Diagnostic significans of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. Am J Clin Pathol 2003; 120: 754-9.
22. Hoefnagel JJ, Mulder MM, Dreef E, et al. Expression of B-cell transcription factors in primary cutaneous B-cell lymphoma. Mod Pathol 2006; 19:1270-6.
23. Chan JP, Banks M, Cleary, et al. A proposal for classification of lymphoid neoplasms (by the International Lymphoma Study Group). Histopathology 1994; 25: 517-536.
24. Mourad W, Tulbah A, Shoukri M, et al. Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine-needle aspiration: cytomorphic and immunophenotypic approach. Diagn Cytopathol 2003; 28: 191-195.
25. Das D, Gupta S, Datta B, et al. Fine needle aspiration cytodiagnosis of Hodgkin's disease and its subtypes. I. Scope and limitations. Acta Cytol 1990; 34: 329-336.
26. Khirwadkar N, Dey P, Das A, et al. Fine-needle aspiration biopsy of metastatic soft-tissue sarcomas to lymph nodes. Diagn Cytopathol 2001; 24: 229-232.
27. Zeppa P, Picardi M, Marino G, et al. Fine-needle aspiration biopsy and flow cytometry immunophenotyping of lymphoid and myeloproliferative disorders of the spleen. Cancer 2003; 99: 118-127.
28. Zeppa P, Marino G, Troncone G, et al. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. Cancer 2004; 102: 55-65.
29. Mayall F, Dray M, Stanley D, et al. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. J Clin Pathol 2000; 53: 451-457.
30. Stastny J, Almeida M, Wakely PJ, et al. Fine-needle aspiration biopsy and imprint cytology of small non-cleaved cell (Burkitt's) lymphoma. Diagn Cytopathol 1995; 12: 201-207.
31. Russell J, Orell S, Skinner J, et al. Fine needle aspiration cytology in the management of lymphoma. Aust N Z J Med 1983; 13: 365-368.



32. Hajdu S, Melamed M. Limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary neoplasms. *Acta Cytol* 1984; 28: 337-345.
33. Katz R, Caraway N. FNA lymphoproliferative diseases: myths and legends. *Diagn Cytopathol* 1995; 12: 99-100.
34. Leong A, Stevens M. Fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of lymphoma: a perspective. *Diagn Cytopathol* 1996; 15: 352-357.
35. Olejniczak S, Stewart C, Donohue K, et al. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest* 2006; 35: 93-114.
36. Żeromski J, Dworacki G, Mizera-Nyczak E i wsp. Doświadczenia w diagnostyce nowotworów układu krwiotwórczego przy użyciu skojarzonych metod badawczych *Now Lek* 2001; 73: 483-488.
37. Langerak A, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero I, et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha T-cell proliferations. *Blood* 2001; 98: 165-173.
38. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-2317.
39. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. *Genetyka*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Ewa Mizera-Nyczak**
Zakład Patologii Nowotworów
Wielkopolskie Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
tel. +48 61 885 06 70
faks + 48 61 885 08 09

