

NOWOTWORY UKŁADU CHŁONNEGO I KRWIOTWÓRCZEGO

MONIKA PROCHOREC-SOBIESZEK^{1,2}, DOROTA JESIONEK-KUPNICKA³, GRZEGORZ RYMKIEWICZ²

¹Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

³Zakład Patologii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

1. Spis procedur chirurgicznych

- Biopsja aspiracyjna szpiku
- Trepanobiopsja
- Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa węzła chłonnego
- Limfadenektomia
- Splenektomia

Rozpoznanie nowotworów układu chłonnego i krwiotwórczego wymaga przeanalizowania przez hematopatologa danych klinicznych, morfologicznych, immunofenotypowych oraz genetycznych. Mimo dużego znaczenia w diagnostyce nowoczesnych badań immunofenotypowych i genetycznych, morfologia komórek nowotworowych jest nadal kluczowym elementem rozpoznania. Najlepsze wyniki uzyskuje się przy równoczesnej wielodyscyplinarnej diagnostyce histopatologiczno-immunohistochemicznej, cytometrycznej i genetycznej w jednym zakładzie patomorfologii lub diagnostyki hematologicznej.

2. Szpik

2.1. Materiał do badań

Ocena zmian w szpiku w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego wymaga integracji wielu informacji uwzględniających pełne dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych, takich jak morfologia krwi obwodowej oraz prawidłowo wykonane rozmazy krwi obwodowej i szpiku. W większości przypadków wymagane są równoległe badania: rozmazów krwi obwodowej i aspiratu szpiku oraz trepanobiopsji.

Badania krwi obwodowej i szpiku powinny być wykonane przed włączeniem leczenia. Klasyfikacja WHO zaleca ocenę minimum 200 i 500 komórek odpowiednio w rozmazach z krwi obwodowej i biopsji aspiracyjnej szpiku, co zapewnia możliwość właściwej oceny zawartych w rozmazach elementów morfotycznych.

Często konieczne jest przekazanie materiału uzyskanego drogą biopsji aspiracyjnej szpiku do immunofenotypowania metodą cytometrii przepływowej oraz badań genetycznych metodami cytogenetyki

klasycznej (kariotyp), fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* – FISH) oraz genetyki molekularnej (*reverse transcriptase polymerase chain reaction* – RT-PCR).

Materiał do badań cytogenetycznych powinien być pobrany do probówki z heparyną litową, natomiast do badań molekularnych i immunofenotypowych metodą cytometrii przepływowej – do probówki z antykoagulantem EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*).

2.2. Trepanobiopsja

2.2.1. Zalecenia dla lekarza klinicysty lub hematologa

Trepanobiopsat szpiku powinien mieć co najmniej 1,5 cm długości i, jeśli to możliwe, powinien być pobrany pod kątem prostym w stosunku do kości korowej.

2.2.2. Trepanobiopsja – zabezpieczanie, utrwalanie oraz odwapnianie materiału tkankowego

Trepanobiopsaty wymagają odwapnienia, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zapewnienie optymalnego czasu, ponieważ zarówno zbyt długi, jak i zbyt krótki czas odwapnienia mogą niekorzystnie wpłynąć na jakość otrzymanych preparatów i możliwość uzyskania wiarygodnych barwień immunohistochemicznych.

Materiał należy:

- zmierzyć i umieścić w torebce biopsyjnej razem z kartką opisaną unikatowym numerem pacjenta, datą przyjęcia materiału, inicjałami pacjenta, a torebkę zabezpieczyć zszywaczem i umieścić w małym, plastikowym pojemniku,
- zalać świeżym utrwalaczem oksfordzkim, w którego skład wchodzi: formalina o stężeniu 36–38% – 500 ml, kwas octowy lodowaty (o stężeniu 99,5%) – 100 ml, chlorek sodu (NaCl) – 43,5 g, woda destylowana – 4500 ml,
- utrwalac i jednocześnie odwapniać przez 7 dni, trepanobiopsaty codziennie przelewać świeżym utrwalaczem oksfordzkim, nie płukać wodą!

- po odwapnieniu przełożyć w torebce biopsyjnej do opisanej unikatowym numerem kasetki histopatologicznej i przeprowadzić w procesorze tkankowym.

2.3. Barwienia cytochemiczne

W ocenie rozmazów krwi i szpiku w przypadku nowotworów układu krwiotwórczego używane są barwienia cytochemiczne.

Podstawowe jest barwienie May-Grunwald-Giemsa lub podobne barwienia.

W diagnostyce zespołów mielodysplastycznych oraz niektórych nowotworów mieloproliferacyjnych (*myeloproliferative neoplasms* – MPN) w rozmazach krwi lub szpiku wykorzystuje się barwienie błękitem pruskim na obecność żelaza.

W rozpoznawaniu nowotworów układu krwiotwórczego w celu określenia przynależności liniowej komórek nowotworowych stosowane są barwienia cytochemiczne mające na celu oznaczenie aktywności mieloperoksydazy (POX), oznaczenie aktywności nieswoistej esterazy (NE) z użyciem octanu α -naftyłu oraz oznaczenie zawartości glikogenu (reakcja PAS).

Obecnie w większości tych nowotworów wykorzystanie barwień cytochemicznych nie jest konieczne ze względu na stosowanie immunofenotypowania metodą cytometrii przepływowej i immunohistochemii w ocenie przynależności liniowej komórek.

Barwienie włókien retikuliny metodą Gomoriego oraz kolagenowych metodą Masson-Trichrom w trepanobiopsji w celu oceny włóknienia podścieliska szpiku jest niezbędne w różnicowaniu nowotworów mieloproliferacyjnych.

2.4. Immunofenotypowanie metodą cytometrii przepływowej i immunohistochemii

Immunofenotypowanie można wykonywać metodą cytometrii przepływowej lub immunohistochemii.

W diagnostyce ostrych białaczek szpikowych rekomendowane jest użycie co najmniej 3-kolorowej cytometrii przepływowej. Panel przeciwciał powinien być wystarczający do określenia pochodzenia liniowego rozrostu, jak również nieprawidłowego profilu antygenowego komórek nowotworowych, który potem jest wykorzystywany w ocenie choroby resztkowej.

Immunohistochemia wykonywana w trepanobiopsji szpiku może być pomocna w diagnostyce nowotworów układu krwiotwórczego, ponieważ obecnie dostępnych jest wiele przeciwciał do rozpoznawania antygenów mieloidalnych i limfoidalnych. Niemniej jednak cytometria przepływowa, ze względu na to, że jest metodą szybką (pozwala na uzyskanie wyniku w ciągu kilku godzin), ilościową i jakościową oraz pozwala na ocenę wielu antygenów równocześnie, jest metodą z wyboru w diagnostyce ostrych białaczek.

Szczegółowe immunofenotypy dla poszczególnych nowotworów układu krwiotwórczego są łatwo dostępne w wielu publikacjach hematopatologicznych, w tym w aktualnej klasyfikacji WHO z 2008 r. (*Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*).

Orientacyjna minimalna liczba oznaczeń immunohistochemicznych lub immunofenotypowych niezbędnych do ustalenia rozpoznania nowotworów układu krwiotwórczego wynosi 10. W przypadku skomplikowanych nowotworów liczba odczytów immunohistochemicznych ulegnie zwiększeniu.

2.5. Ocena komórek blastycznych

Badania rozmazów krwi i szpiku mają decydujące znaczenie w ocenie liczby blastów. Liczba blastów, takich jak mieloblasty, monoblasty, promonocyty i megakarioblasty (ale nie dysplastyczne megakariocyty), decyduje o rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej (*acute myeloid leukemia* – AML) lub transformacji blastycznej. Ekwiwalentem blastów w ostrej białaczce promielocytowej jest liczba nieprawidłowych promielocytów. Proerytroblasty nie są liczone jako blasty, z wyjątkiem rzadkich przypadków ostrej białaczki czystoczerwonokrwinkowej.

Ocena komórek blastycznych CD34+ metodą cytometrii przepływowej nie powinna zastępować oceny liczby blastów w rozmazach krwi i szpiku. Nie wszystkie blasty wykazują ekspresję CD34, a domieszka krwi obwodowej i artefakty związane z obróbką materiału mogą być przyczyną złej interpretacji właściwej liczby tych komórek. Jeśli jednak liczba blastów CD34+ w badaniu cytometrii przepływowej jest większa niż w rozmazach krwi i szpiku, wymagana jest powtórna ocena obu badań w celu wyjaśnienia przyczyn różnicy.

Jeżeli aspiraty są niediagnostyczne z powodu włóknienia lub wybitnie bogatokomórkowego szpiku, pomocne w ocenie liczby blastów może być immunohistochemiczne barwienie trepanobiopsji z użyciem przeciwciała anty-CD34 (jeśli blasty są CD34+).

2.6. Badania cytogenetyczne i molekularne

W klasyfikacji WHO nowotworów układu krwiotwórczego szczególnie zaakcentowano wartość badań cytogenetycznych i molekularnych. Bardziej niż kiedykolwiek przedtem wyniki analiz cytogenetycznych są przydatne w rozpoznawaniu poszczególnych nowotworów. Ponadto w niektórych jednostkach nieprawidłowości molekularne stanowią cel terapeutyczny.

W praktyce większość przypadków AML definiuje się na podstawie cytogenetycznych nieprawidłowości. Świadomość znaczenia badań cytogenetycznych i molekularnych oraz znajomość techniki tych badań (kariotyp, FISH, PCR) pozwalają na zabezpieczenie

możliwości ich wykonania równoległe z pobieraniem materiału biopsyjnego szpiku.

Badania metodą FISH można również wykonywać z materiału pochodzącego z wysuszonych na powietrzu, nieutrwalonych rozmazów, a w celu odzyskania DNA należy zeszkrobać część takiego preparatu.

Ocena kariotypu wymaga założenia hodowli komórek, dlatego materiał do tego badania musi być świeży. Ocenia się co najmniej 20 metafaz z hodowli komórek szpiku. Wskazana jest ocena kariotypu z komórek szpiku przy pierwszym rozpoznaniu. Ponowne badania kariotypu pozwalają na ocenę odpowiedzi na leczenie lub obserwację ewolucji genetycznej.

Dodatkowe badania genetyczne, takie jak FISH, RT-PCR, należy wykonywać, kierując się wynikami kariotypu i przy podejrzeniu określonego rozpoznania na podstawie danych klinicznych, wyników badań morfologicznych i immunofenotypowych. Rekomendowane jest badanie duplikacji *FLT3-ITD*, genów fuzyjnych charakteryzujących podtypy AML, jak również analiza mutacji w genach *NPM1* i *CEBPA* we wszystkich przypadkach AML bez zaburzeń cytogenetycznych.

Obecność mutacji *JAK2 V617F* oraz *MPL W515L* i kalretikuliny (*CALR*) (przy braku mutacji *JAK2 V617F*) powinna być oceniona we wszystkich MPN BCR-ABL1-ujemnych. Ocena stanu mutacji genów *KIT*, *NRAS*, *PTNP11* i innych powinna mieć kliniczne uzasadnienie.

2.7. Korelacja danych i raport diagnostyczny

Ze względu na konieczność wielodyscyplinarnego rozpoznawania i klasyfikacji nowotworów układu krwiotwórczego zaleca się, aby różne badania diagnostyczne skorelowane były z wynikami badań klinicznych i odnotowane w jednym, zintegrowanym raporcie. Jeśli nie można rozpoznać danej jednostki chorobowej, raport powinien wskazywać przyczyny i sugerować dalsze badania dodatkowe, które doprowadzą do prawidłowej diagnozy. W celu zapewnienia wysokiej jakości diagnostyki nowotworów układu krwiotwórczego konieczna jest współpraca doświadczonego patomorfologa specjalizującego się w hematopatologii z hematologiem prowadzącym danego pacjenta.

3. Węzeł chłonny

3.1. Zalecenia ogólne

Rozpoznanie nowotworu układu chłonnego z określeniem podtypu histoklinicznego wg aktualnej klasyfikacji WHO powinno być ustalone przez doświadczonego hematopatologa na podstawie badania histopatologicznego i immunohistochemicznego węzła chłonnego, a w przypadku pozawęzłowej prezentacji choroby – wycinka odpowiedniej tkanki lub narządu. W celu doprecyzowania rozpoznania w części przypadków konieczne jest wykonanie badania genetycznego i/lub molekularnego.

W przypadku materiału konsultacyjnego zaleca się ponowną ocenę przez hematopatologa wszystkich preparatów i co najmniej jednego bloczka parafinowego reprezentatywnego dla badanego nowotworu; jeśli materiał konsultacyjny jest niediagnostyczny, wskazana jest powtórna biopsja chirurgiczna.

Biopsja gruboigłowa nie jest polecana, z wyjątkiem warunków klinicznych niepozwalających na bezpieczne uzyskanie materiału diagnostycznego metodą biopsji chirurgicznej.

Pomocnymi, a niejednokrotnie diagnostycznymi badaniami w rozpoznawaniu chłoniaków mogą być badanie cytologiczne i cytometria przepływowa materiału z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej węzła chłonnego lub narządu pozawęzłowego. W części przypadków ocena powinna być uzupełniona badaniem genetycznym lub molekularnym. Metoda ta jest szczególnie polecana w ocenie zmian rezydualnych i nawrotowych, w przypadku trudnej dostępności zmian do biopsji chirurgicznej oraz u chorych wymagających natychmiastowego leczenia.

W diagnostyce białaczek standardowym postępowaniem jest ocena cytologii i fenotypu komórek białaczkowych metodą cytometrii przepływowej oraz badania genetyczne i/lub molekularne.

3.2. Materiał do badań

Rozpoznanie chłoniaka może być ustalone na podstawie badania różnych materiałów w zależności od obrazu klinicznego. Wycinki pobierane drogą chirurgiczną najczęściej pochodzą z węzłów chłonnych lub tkanek pozawęzłowych: skóry, przewodu pokarmowego, szpiku kostnego, śledziony, grasicy i migdałków. W diagnostyce chłoniaków lub białaczek ocenia się również krew obwodową, aspirat szpiku, trepanobiopsję, rzadziej płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z opłucnej i otrzewnej.

3.2.1. Zalecenia dla chirurga

Węzły chłonne powinny być pobierane w całości z torebką; jeśli węzły są zrośnięte w niedający się usunąć konglomerat, należy pobrać głęboki wycinek klinowy. Pobieranie sąsiedniego luźno leżącego węzła jest niecelowe, ponieważ najczęściej nie jest on zajęty przez proces chorobowy i rozpoznanie odwleka się do następnego pobrania.

Tkanka otrzymana do badania histopatologicznego powinna być materiałem świeżym, dostarczoną bezzwłocznie po biopsji chirurgicznej do zakładu patomorfologii. W razie braku możliwości dostarczenia świeżego materiału należy go utrwalić w 10-procentowej zbuforowanej PBS (*phosphate-buffered saline*) formalinie. Utrwalone w ten sposób materiały są przydatne do badań dodatkowych, m.in. molekularnych i FISH.

W celu zapewnienia optymalnej reaktywności przeciwciał w badaniach immunohistochemicznych i możliwości przeprowadzenia badań genetycznych (degradacja DNA) należy unikać nadmierne go wydłużania czasu utrwalania tkanek (zaleca się 24–72 godzin, w zależności od wielkości wycinka). Lekarz klinicysta, przysyłając materiał do badania, powinien załączyć pełną dokumentację kliniczną chorego obejmującą wiek chorego, wyniki badań laboratoryjnych (m.in. morfologii krwi obwodowej z rozmazem, stężenia LDH), badań obrazowych (ultrasonografii, tomografii komputerowej, rezonansu magnetycznego, pozytonowej tomografii emisyjnej), wyniki wcześniejszych badań histopatologicznych, cytometrycznych i genetycznych, informacje o niedoborach immunologicznych i przebytych istotnych infekcjach oraz opisać dotychczasowy przebieg choroby.

Badanie cytologiczne ze świeżego węzła typu *touch imprint* może służyć do analizy genetycznej metodą FISH.

W ośrodkach referencyjnych fragment świeżego węzła powinien być biobankowany, co zapewnia najwyższą jakość badań genetycznych.

W przypadku podejrzenia zmian zapalnych należy pobrać fragment do hodowli bakteryjnej.

3.3. Ocena makroskopowa węzła chłonnego

W trakcie oceny makroskopowej należy każdorazowo:

- podać liczbę węzłów chłonnych, ocenić, czy występują pojedynczo, czy w formie konglomeratu, czy węzeł dostarczono w całości, czy jedynie jego fragment,
- podać wymiary węzła lub węzłów w centymetrach,
- ocenić torebkę: w całości, bez uszkodzenia lub z uszkodzeniem,
- dokonać oceny węzła na przekrojach: opisać jego barwę (jednolita, niejednorodna lub z pigmentacją), budowę (homogenna, guzkowa, z włóknieniem) i konsystencję (mięka lub spoista) oraz obecność wylewów krwi lub ognisk martwicy,
- ocenić wcześniejsze utrwalenie węzłów chłonnych: dobrze utrwalone lub niepełne utrwalenie w części centralnej węzła chłonnego.

3.4. Pobieranie wycinków do badania histopatologicznego

Węzeł chłonny powinien być przebadany w całości.

- Węzeł chłonny należy przeciąć wzdłuż osi długiej na równoległe cienkie plastry, nie grubsze niż 0,5 cm.
- Wycinki powinny być umieszczone w oddzielnych kasetkach.

3.5. Badania immunofenotypowe i genetyczne

Immunofenotypowanie jest podstawową procedurą w diagnostyce nowotworów układu chłonnego. Zgodnie z przedstawionymi poniżej rekomendacjami dotyczącymi paneli immunohistochemicznych orientacyjna minimalna liczba odczynów immunohistochemicznych lub immunofenotypowych, które powinien ocenić hematopatólog w celu ustalenia rozpoznania nowotworów układu chłonnego, wynosi 10. W przypadku nowotworów o skomplikowanym utkaniu, liczba odczynów immunohistochemicznych może ulec zwiększeniu.

Immunofenotypowanie można wykonywać metodą cytometrii przepływowej lub immunohistochemii, a każda z nich ma swoje zalety i wady. Cytometria przepływowa jest metodą szybką (pozwala na uzyskanie wyniku w ciągu kilku godzin), ilościową i umożliwia ocenę wielu antygenów równocześnie. Wykrycie antygeny nie pozwala jednak na korelację z architekturą nowotworu. Immunohistochemia wymaga godzin lub dni, a ocena ilościowa jest subiektywna, lecz najważniejszą jej cechą jest możliwość korelacji odczynu z architekturą i cytologią nowotworu. Nie wszystkie przeciwciała są dostępne w immunohistochemii, zwłaszcza dla tkanek utrwalanych, ale ważną zaletą tej metody jest możliwość jej zastosowania w przypadku archiwalnych materiałów zatopionych w parafinie. Obie techniki mogą być wykorzystywane w diagnostyce chłoniaków i są źródłem istotnych klinicznie informacji, w tym identyfikacji cząstek koniecznych do zastosowania terapii celowanej: CD20, CD22, CD30, CD52.

Materiał do badań cytometrycznych (krew obwodowa, szpik, zawiesina komórek z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej) należy pobierać do probówek z EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*). Istnieje możliwość przesyłania fragmentu świeżej tkanki we właściwym podłożu transportowym do pracowni cytometrii.

Znaczenie badań molekularnych w nowotworach układu chłonnego stale rośnie; umożliwiają one określenie klonalności i pochodzenia komórek nowotworowych. W szczególnych jednostkach chorobowych badania te są niezbędne do ustalenia ostatecznego rozpoznania oraz monitorowania choroby resztkowej.

Do badań genetycznych materiał biologiczny (10 ml krwi obwodowej lub 2 ml szpiku kostnego) należy pobrać do probówki z odpowiednim antykoagulantem. W przypadku badań cytogenetycznych właściwym antykoagulantem jest heparyna litowa, natomiast materiał kierowany na badania molekularne należy pobrać na EDTA i maksymalnie w ciągu 24 godzin dostarczyć do pracowni genetyki. Materiał

powinien być dostarczony do laboratorium w temperaturze +4°C; zamrożenie materiału biologicznego wyklucza wykonanie badania. W przypadku diagnostyki nowotworowo zmienionej tkanki wycinek należy umieścić w folii aluminiowej i odpowiednio opisać.

Najlepszą metodą pozwalającą na zachowanie DNA i RNA jest zamrażanie tkanek. Na czas transportu tkankę należy umieścić w suchym lodzie. Dal-
sze przechowywanie materiału wymaga powolnego zamrażania poprzez utrzymanie próbki w alkoholu izopropylowym przez 24 godziny, a następnie zanurzenie w ciekłym azocie – procedury te są wykonywane w pracowni genetyki.

3.5.1. Rekomendowane panele immunohistochemiczne w diagnostyce chłoniaków wg WHO, BCSH (British Committee for Standards in Haematology) i NCCN (National Comprehensive Cancer Network)

Interpretacja immunofenotypu powinna być skorelowana z obrazem klinicznym i cechami histopatologicznymi chłoniaków:

- odczyn *vs* chłoniak – panel podstawowy: CD45 (LCA), CD19/CD20, CD2/CD3, Ki67, BCL2, (EBV-EBER ISH, jeżeli istnieje podejrzenie ostrej infekcji wirusem Epsteina-Barr – EBV),
- chłoniak *vs* przerzut raka lub czerniaka – panel na nieodróżniony nowotwór: CD45, cytokeratyny, S-100, Melan A (+/- panel podstawowy),
- chłoniaki z małych komórek B [przewlekła białaczka limfocytowa/chłoniak limfocytowy (*chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma* – CLL/SLL), chłoniak z komórek płaszczka (*mantle cell lymphoma* – MCL), śledzionowy chłoniak strefy brzeżnej z komórek B (*splenic B-cell marginal zone lymphoma* – SMZL), białaczka włochatokomórkowa (*hairy cell leukemia* – HCL), chłoniak limfoplazmocytowy (*lymphoplasmacytic lymphoma* – LPL), pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej MALT (*extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue* – MALT lymphoma), węzłowy chłoniak strefy brzeżnej (*nodal marginal zone lymphoma* – NMZL), chłoniak grudkowy (*follicular lymphoma* – FL)]: panel podstawowy + CD5, CD10, CD23, cyklina D1, BCL6, CD43 (CD25, CD103, CD11c),
- chłoniaki ze średnich komórek B +/- obraz gwiazdzistego nieba, rozlany typ wzrostu [chłoniak Burkitta (*Burkitt lymphoma* – BL), chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL), MCL wariant blastoidny, chłoniak z komórek B, nieklasyfikowalny, z cechami pośrednimi pomiędzy chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B a chłoniakiem Burkitta (*B-cell lymphoma, unclassified, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma* – BCLU,

DLBCL/BL), chłoniak limfoblastyczny z komórek B (*B lymphoblastic lymphoma* – LBL)]: panel podstawowy + CD5, CD10, cyklina D1, BCL6, TdT, MYC; FISH dla *MYC*, *BCL2*, *BCL6*,

- chłoniaki z dużych komórek B (DLBCL, MCL wariant pleomorficzny) – panel podstawowy + panel chłoniaka z dużych komórek B: CD5, BCL6, CD10, IRF4/MUM1, CD138, cyklina D1, MYC (CD30, CD15, ALK1),
- chłoniaki z komórek B – lokalizacja skórna [pierwotny skórny chłoniak strefy brzeżnej (*primary cutaneous marginal zone lymphoma* – PCMZL), pierwotny skórny chłoniak z ośrodków rozmnażania (*primary cutaneous follicle center lymphoma* – PCFCL), pierwotny skórny chłoniak rozlany z dużych komórek B typu kończynowego (*primary cutaneous DLBCL, leg type* – PCLBCL)]: panel podstawowy + CD5, CD10, BCL6, IRF4/MUM1, CD21/23,
- chłoniak Hodgkina: panel podstawowy + panel chłoniaka Hodgkina: CD30, CD15, Pax5, EBV-LMP1/EBER (ISH) [CD57, BOB1 i OCT2, jeżeli podejrzewa się chłoniak Hodgkina guzkowy z przewagą limfocytów (*nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma* – NLPHL)],
- chłoniaki z komórek T – lokalizacja węzłowa, morfologia nieanaplastyczna [białaczka/chłoniak z komórek T dorosłych (*adult T-cell leukemia/lymphoma* – ATLL), chłoniak z komórek T angioimmunoblastyczny (*angioimmunoblastic T-cell lymphoma* – AITL), chłoniak z obwodowych komórek T, bliżej nieokreślony (*peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified* – PTCL, NOS), chłoniak z dużych komórek anaplastyczny, ALK+ (*anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive* – ALCL, ALK+), wariant z małych komórek i bogaty w histocyty] – panel podstawowy + panel chłoniaka z komórek T: CD4, CD5, CD7, CD8, CD30, ALK1; TdT, jeżeli podejrzany T-LBL; CD10, CD21, CD23, BCL6, PD1, CXCL13 i EBV-EBER ISH, jeżeli podejrzenie AILT; CD56, CD57, granzym B, jeżeli podejrzewa się chłoniak/białaczkę z komórek NK,
- chłoniaki z komórek T – morfologia anaplastyczna (ALCL): panel podstawowy + CD5, CD7, CD30, EMA, CD15, PAX5, ALK1, EBV-EBER, białka ziarnistości cytotoksycznych (granzym B, perforyna, TIA1), CD25, MUM1,
- chłoniaki z komórek T – lokalizacja skórna [pierwotnie skórne choroby limfoproliferacyjne CD30+ (*lymphoproliferative diseases CD30+* – LPD CD30+), ziarniniak grzybiasty (*mycosis fungoides* – MF), zespół Sézary’ego (*Sézary syndrome* – SS), chłoniak z komórek T tkanki podskórnej typu zapalenia tkanki podskórnej (*subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma* – SPTCL), pierwotny skórny chłoniak z komórek T gd (*primary cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma* – PCGD-TCL), pierwotny agresywny skórny chłoniak epidermotropowy z cytotoksycznych komórek

T CD8+ (*primary cutaneous CD8-positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma* – AECTCL), pierwotny skórny chłoniak z małych/średnich komórek T CD4+ (*primary cutaneous CD4-positive small/medium T-cell lymphoma*), pozawęzłowy chłoniak z komórek NK/T typu nosowego (*extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type* – ENKTCL), PTCL-NOS, nowotwór blastyczny z plazmacytoidnych komórek dendrytycznych (*blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm* – BPDCN)] – panel podstawowy + CD5, CD7, CD4, CD8, CD30, CD56, białka ziarnistości cytotoksycznych (perforyna, granzym B, TIA1), EBV-EBER; opcjonalnie: CD25,

- chłoniak *vs* białaczka szpikowa: panel podstawowy + panel szpikowy: mieloperoksydaza, CD33, CD34, CD163 (później, w razie potrzeby: CD14, CD15, CD61, CD117, glikoforyna A/CD71).

4. Śledziona

Splenektomia może być wykonana z powodu chorób limfoproliferacyjnych: chłoniaków i białaczek, pierwotnie lub wtórnie zajmujących śledzionę, nowotworów mieloproliferacyjnych, zmian o charakterze odczynowym, choroby Castlemana, limfoproliferacji autoimmunologicznych, innych chorób hematologicznych oraz zmian niehematologicznych – nowotworów litych oraz zmian nienowotworowych (incydentalne, pourazowe wycięcie śledziony, zmiany nowotworopodobne).

Do oceny zmian w śledzionie niezbędne są istotne dane (wcześniejsze rozpoznanie chłoniaka lub białaczki, nowotworu mieloproliferacyjnego, stopnia powiększenia węzłów chłonnych, obecność organomegalii, wyniki badań hematologicznych, objawy kliniczne, wcześniejsze niedobory immunologiczne, w tym status HIV, przebyte istotne infekcje (*H. pylori*, EBV, HTLV-1)).

Wytyczne CAP nie precyzują osobnego postępowania ze śledzioną, niniejsze zasady opierają się głównie na zaleceniach badania makroskopowego wg Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, wyd. 10, 2011.

4.1. Postępowanie z materiałem pooperacyjnym

Należy zważyć i zmierzyć śledzionę w trzech wymiarach.

Nieutrwaloną śledzionę należy pociąć na równoległe cienkie plastry 3 do 4 mm bardzo ostrym nożem, nie należy płukać powierzchni przekrojów pod bieżącą wodą. Każdy przekrój należy ocenić dokładnie na obecność zmian ogniskowych.

Małe zmiany ogniskowe widoczne na przekrojach należy pobrać w formie sześciennych wycin-

ków z mięszem otaczającym, większe zmiany należy wyciąć w całości i utrwalić w osobnym naczyniu w 10-procentowym roztworze formaliny zbuforowanej PBS na co najmniej kilka godzin lub całą noc.

W przypadku podejrzenia zmian zapalnych należy pobrać fragment do hodowli bakteryjnej.

Należy pobrać cztery preparaty odciskowe z przekroju – dwa na barwienie HE i dwa na barwienie May-Grunwald-Giemsa lub barwienie podobne, np. Wright-Giemsa.

W przypadku podejrzenia chłoniaka lub nowotworu mieloproliferacyjnego należy, szczególnie w ośrodkach referencyjnych, pobrać nieutrwalone wycinki do badań molekularnych, dodatkowych badań genetycznych (FISH, RT-PCR, ocena kariotypu z hodowli komórkowej) oraz do cytometrii przepływowej. Dokładny sposób postępowania jest opisany dla węzłów chłonnych.

W przypadku podejrzenia anemii sierpowatej konieczne jest utrwalenie fragmentu tkankowego śledziony natychmiast w 10-procentowej formalinie zbuforowanej PBS.

Należy odszukać węzły chłonne wnęki, okołoaortalne lub krezki oraz śledziony dodatkowe. Należy ostrożnie odciąć struktury wnęki śledziony do osobnego pojemnika.

W celu lepszej oceny miazgi czerwonej w chorobach z hipersplenizmem można zastosować nastrożenie śledziony formaliną przez tętnicę śledzionową.

W przypadku oceny stopnia zaawansowania chłoniaków mogą być nadesłane dodatkowe klinowe wycinki z wątroby z płata prawego i lewego – należy je pociąć na cienkie plastry i przechować w osobnym, opisanym naczyniu.

4.2. Ocena makroskopowa

W trakcie oceny makroskopowej materiału operacyjnego należy każdorazowo:

- zważyć i zmierzyć śledzionę,
- opisać zawartość wnęki – określić rodzaj i liczbę naczyń, podać informację o obecności węzłów chłonnych i śledziony dodatkowej,
- ocenić torebkę [kolor, konsystencja, ciągłość, rodzaj oraz wielkość uszkodzenia (lokalizacja, długość, głębokość), zmiany ogniskowe, nacieki nowotworowe],
- opisać powierzchnię przekroju mięszu [kolor, konsystencja, ocena miazgi białej (grudek chłonnych śledziony, włóknienia, guzków lub masy guzowej, nacieku rozlanego?)].

4.3. Pobieranie wycinków do badania histopatologicznego

Wycinki należy pobrać z makroskopowo zmienionych miejsc lub podejrzanych makroskopowo

o zmiany patologiczne, przy czym liczba wycinków zależy od wielkości zmian.

Należy pobrać następujące wycinki:

- z makroskopowo zmienionych miejsc lub podejrzanych makroskopowo o zmiany patologiczne, przy czym liczba wycinków zależy od wielkości zmian;
- z wszystkich węzłów chłonnych zgodnie z zasadami opisanymi dla węzłów chłonnych, właściwie zidentyfikowanych co do lokalizacji;
- ze śledziony dodatkowej;
- wszystkie wycinki z klinowej biopsji wątroby z różnieniem na płat prawy i lewy.

Ostateczny wynik hematopatologiczny musi zawierać rozpoznanie wg najnowszej klasyfikacji WHO na podstawie przeanalizowanych łącznie wszystkich znanych danych klinicznych, histopatologicznych, immunofenotypowych (immunohistochemia i cytometria przepływowa), molekularnych i cytogenetycznych. Pierwotne chłoniaki śledzionowe zajmują jednocześnie szpik kostny i w niektórych przypadkach węzły chłonne wnęki śledziony, a także mogą wystąpić jako postać białaczkowa bez limfadenopatii – należy wykonać korelację wyników z tych lokalizacji. Wynik początkowy (wstępny) może być dalej uzupełniony na podstawie badań dodatkowych. Zalecane podstawowe panele immunohistochemiczne dotyczące diagnostyki nowotworów układu chłonnego występujących w śledzionie opisane są w akapicie dotyczącym węzłów chłonnych.

Minimalna liczba wycinków pobieranych ze śledziony wynosi:

- w przypadku gdy nie stwierdza się zmian makroskopowych: 3 wycinki, w tym 1 z wneki oraz 2 z mięszu razem z torebką;
- w przypadku zmian widocznych makroskopowo liczba pobieranych wycinków zależy od rozmiarów i ilości zmian oraz liczby węzłów chłonnych i obecności dodatkowej śledziony i wynosi 5.

Piśmiennictwo

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N i wsp. (red.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2008.
2. Hussong JW, Arber DA, Bradley KT i wsp. Protocol for the examination of specimens from patients with non-Hodgkin lymphoma/lymphoid neoplasms. College of American Pathologists. Protocol web posting date: June 2010.
3. Hussong JW, Arber DA, Bradley KT i wsp. Protocol for the examination of specimens from patients with Hodgkin lymphoma. College of American Pathologists. Protocol web posting date: October 2009.
4. Parker A, Bain B, Devereux S i wsp. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting. British Committee for Standards in Haematology. Royal College of Pathologists. Protocol web posting date: April 2012.
5. Immunofenotypowa diagnostyka różnicowa chłoniaków według National Comprehensive Cancer Network. Na podstawie: www.nccn.org.
6. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Tom 2, Wyd. 10. Elsevier, Philadelphia 2011.
7. Wilkins BS. Lymphomas involving the spleen. Diagn Histopathol 2010; 16: 116-124.
8. Iannitto E, Tripodo C. How I diagnose and treat splenic lymphomas. Blood 2011; 117: 2585-2595.