

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των χρόνιων λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων. Ιστολογία: Ανοσοϊστοχημική τεκμηρίωση

Θ. Παπαδάκη

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη αποτελεί σήμερα πλέον βασική συνιστώσα στη διαγνωστική προσέγγιση των εξεργασιών του λεμφο-δικτυωτού και αιμοποιητικού ιστού. Το γεγονός αυτό συνδέεται άρρηκτα με την αδιαμφισβήτητη συμβολή της στη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας (accuracy) και αναπαραγωγιμότητας (reproducibility) κατά τη μελέτη των αιματολογικών κακοηθειών.

Εξάλλου, ο συνδυασμός των ανοσοϊστοχημικών προς τα κυτταρογενετικά και μοριακά καθώς και τα κλινικά δεδομένα των τελευταίων χρόνων έδειξε, ότι τα περισσότερα αιματολογικά νοσήματα χαρακτηρίζονται από αποκλειστικό τρόπο τινά για κάθε νόσο, ανοσοφαινοτυπικό και γονοτυπικό “προφίλ”, σχετιζόμενο με την παθογένεση της νόσου και την κλινική της πορεία.

Τον “καρπό” της αυξημένης διαγνωστικής ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας κατά τη μελέτη των αιματολογικών κακοηθειών, μέσω της πολύπλευρης αυτής διαγνωστικής των προσέγγισης, αποτελεί η ευρεία διεθνής συναίνεση (consensus), όσον αφορά τον μεγαλύτερο αριθμό των κακοηθειών του λεμφοδικτυωτού ιστού. Η συναίνεση αυτή ενσωματώθηκε στην Ταξινόμηση REAL (Revised European - American Classification of Lymphoid Neoplasms) και δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά το 1994 από τη Διεθνή Ομάδα Εργασίας Λεμφωμάτων. Βασική δέωρηση της Ταξινόμησης REAL αποτελεί, ότι κάθε νόσος αντιπροσωπεύει ανεξάρτητη κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα με ξέχωρα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά όπως: μορφολογία, ανοσοφαινότυπο, γονότυπο, κλινική εκδήλωση, τρόπο επέκτασης και ανταπόκριση στη θεραπεία.

Τα Χρόνια Λεμφοϋπερπλαστικά Σύνδρομα (ΧΛΥΣ) αποτελούν ίσως την αντιπροσωπευτικότερη ομάδα κακοήδων εξεργασιών του λεμφικού ιστού, όπου επιβεβαιώνεται η αξία των βασικών αρχών της ταξινόμησης REAL.

Η συγκεκριμένη αναφορά στοχεύει: 1) στην επισήμανση της αξίας των ανοσοϊστοχημικών δεικτών στη διαγνωστική προσέγγιση των ΧΛΥΣ, 2) στην ανάλυση της κατά περίπτωση ακολουθούμενης μεθοδολογίας μελέτης του υλικού βιοψιών μέσα στα πλαίσια της λήψης της μέγιστης δυνατής πληροφορίας, 3) στην περιγραφή των

βασικών αρχών της αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων, 4) στην επισημάνση ορισμένων διαγνωστικών παγίδων και 5) στην ανάλυση της μεθοδολογίας επιλογής ενός φάσματος αντισωμάτων κατά περίπτωση, το οποίο να καλύπτει τις σύγχρονες ανάγκες της ανοσοφαινοτυπικής ταυτοποίησης των ΧΛΥΣ, μέσα σε πλαίσια εντούτοις μιας ορθολογικής και οικονομικής δεώρησης.

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΧΛΥΣ

Η βασική συμβολή της ανοσοϊστοχημικής μελέτης στη διάγνωση, διαφορική διάγνωση και περαιτέρω ταξινόμηση των ΧΛΥΣ συνίσταται στη **Διαφορική Διάγνωση**: α) των ΧΛΥΣ από τις λευχαιμίες και λεμφώματα από **πρόδρομα B- ή T- λεμφοκύτταρα**, β) των B- από τα T- προέλευσης ΧΛΥΣ, γ) των T- από τα NK-ΧΛΥΣ, δ) των υποτύπων των B-ΧΛΥΣ και ε) των νεοπλασματικών (κλωνικών) από τις αντιδραστικές (πολυκλωνικές) B- λεμφοπλασματοκυτταρικές διηθήσεις.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΒΙΟΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

1. Υλικό Μελέτης

Το υλικό μελέτης κατά τη διαγνωστική προσέγγιση των ΧΛΥΣ δυνατόν να αφορά σε λεμφαδένες, εξωλεμφαδενικούς ιστούς, σπλήνα και οστεομυελική βιοψία.

2. Επεξεργασία Υλικού Βιοψιών

Το υλικό παραλαμβάνεται είτε **μονιμοποιημένο** με τη μορφή συνήθως κύβων παραφίνης και σπανιότερα σε διάλυμα φορμόλης είτε **νωπό**.

Στην πρώτη περίπτωση οι δυνατότητες **περιορίζονται** στη μελέτη τομών παραφίνης α) σε μορφολογικό (χρώση συνήθως Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης και σπανιότερα Giemsa) και β) σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο. Όσον αφορά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο τομών παραφίνης θα πρέπει να σημειωθεί, ότι σήμερα δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ένα ολοένα αυξανόμενο φάσμα αντισωμάτων (ανοσοδραστικών σε τομές παραφίνης) έναντι των αντιγόνων του λεμφικού και αιμοποιητικού ιστού.

Εντούτοις, σε ορισμένες περιπτώσεις, και ειδικότερα στα ΧΛΥΣ, είναι αναγκαία για την περαιτέρω υποομαδοποίησή των, η παράλληλη

με τις τομές παραφίνης ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών κρουστάτου κατεψυγμένου ιστού. Το βασικό πλεονέκτημα των τομών κρουστάτου έναντι των τομών παραφίνης είναι η διατήρηση της ακεραιότητας του συνόλου των αντιγόνων και υποδοχέων στην επιφάνεια, το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των λεμφοκυττάρων όσο και των άλλων κυτταρικών στοιχείων του λεμφοδικτυωτού ιστού. Τα συγκεκριμένα αντιγόνα καταστρέφονται ή καλύπτονται κατά τις φάσεις της επεξεργασίας του υλικού (μονιμοποίηση σε φορμόλη, έγκλειση σε παραφίνη). Πρόκειται για αντιγόνα κυτταρικής προέλευσης και διαφοροποίησης, ενεργοποίησης, προδρομότητας, απόπτωσης, ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ιογενείς πρωτεΐνες, ογκογονίδια, καθώς και μόρια προσκόλλησης, κυττοκίνες και τους υποδοχείς των.

Στην περίπτωση κατά την οποία το υλικό παραλαμβάνεται **νωπό**, γεγονός το οποίο αποτελεί την ιδανική περίπτωση, ο παθολογοανατόμος έχει την ευθύνη της εξασφάλισης των προϋποθέσεων εκείνων, οι οποίες θα επιτρέψουν τόσο τη μορφολογική και ανοσοφαινοτυπική όσο και την περαιτέρω διαγνωστική του προσέγγιση με μοριακές, κυτταρογενετικές και άλλες μεθόδους. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τη φύλαξη αντιπροσωπευτικού νωπού υλικού στη βαθεία κατάψυξη μετά κατάλληλη επεξεργασία είτε με την ταχεία αποστολή του τεμαχίου σε υγρό καλλιέργειας σε ειδικό κέντρο αναφοράς. Ακολουθεί η λήψη τομών κρουστάτου από τον κατεψυγμένο ιστό και η ανοσοϊστοχημική των μελέτη. Η τελευταία αυτή, όπως ήδη αναλύθηκε, δυνατόν να περιλάβει αντισώματα έναντι του συνόλου των αντιγόνων του λεμφοδικτυωτού και αιμοποιητικού ιστού. Παράλληλα, το υπόλοιπο του νωπού υλικού μονιμοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης και εγκλείεται στη συνέχεια σε παραφίνη. Ακολουθεί μορφολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών παραφίνης.

3. Ανοσοϊστοχημική Μέθοδος Εκλογής

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών παραφίνης και κρουστάτου με τις μεθόδους του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC) και της αλκαλικής φωσφατάσης - αντιαλκαλικής φωσφατάσης (ΑΡΑΑΡ) αντίστοιχα αποτελεί την ανοσοϊστοχημική προσπέλαση εκλογής κατά τη μελέτη των ΧΛΥΣ.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΧΛΥΣ

Η διαγνωστική προσέγγιση των ΧΛΥΣ διαφέρει ουσιαστικά μεταξύ αιματολόγων και αιμοπαθολογοανατόμων. Η βασική διαφορά συνίσταται στο ό,τι ο αιμοπαθολογοανατόμος αξιολογεί ιστό (και όχι μεμονωμένα κύτταρα), οπότε και ισχύουν οι θεμελιώδεις αρχές της ιστολογικής διάγνωσης που ιεραρχικά αφορούν την αξιολόγηση: 1) της αρχιτεκτονικής ανάπτυξης μιας εξεργασίας με σημείο αναφοράς τη “φυσιολογική αρχιτεκτονική” του μελετώμενου ιστού και 2) της κυτταρικής της σύνδεσης με σημείο αναφοράς τη μορφολογία του “φυσιολογικού αντιστοίχου” των νεοπλασματικών κυττάρων. Ακολουθεί **επιβεβαίωση** του καθαρά μορφολογικού διαγνωστικού σκεπτικού από τα “αντικειμενικά” (και μη υποκείμενα στις αδυναμίες της απλής μορφολογικής εκτίμησης, ειδικότερα για τα ΧΛΥΣ) ανοσοϊστοχημικά δεδομένα.

Βασικό πλεονέκτημα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης ιστολογικών τομών (κρουστάτου, κατ'εξοχήν όμως παραφίνης) αποτελεί η δυνατότητα καθορισμού της τοπογραφικής κατανομής των ανοσοχρωσμένων κυτταρικών πληθυσμών με άμεσο επακόλουθο τον **in situ** συνδυασμό των μορφολογικών (αρχιτεκτονική ανάπτυξης-κυτταρική σύνδεση) προς τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα (Ανοσομορφολογία).

Με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, εκτός από τους συγκεκριμένους υπότυπους των ΧΛΥΣ, δυνατόν να ταυτοποιηθούν: α) κλωνικές διαφοροποιήσεις ενός υπότυπου προς έναν άλλο (π.χ. διαφοροποίηση οζώδους προς Β-μονοκυτταροειδές λέμφωμα με την ίδια κλωνικότητα και β) σύνδετα (composite) λεμφώματα με την έννοια είτε συνύπαρξης Β- και Τ- κλωνικών πληθυσμών είτε δύο ανεξάρτητων μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά Β-λεμφοκυτταρικών πληθυσμών.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΑΓΙΔΕΣ

Είναι γεγονός ότι η ανοσοδραστικότητα των διαφόρων αντισωμάτων αφορά κατά βάση ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Εντούτοις με την ευρεία χρησιμοποίηση ολοένα αυξανόμενου αριθμού αντισωμάτων, φάνηκε ότι αρκετά αντισώματα και ειδικότερα τα ανοσοδραστικά σε τομές παραφίνης, παρά την αυξημένη ευαισθησία των (sensitivity) στερούνται ειδικότητας (specificity). Πιο συγκεκριμένα τα αντισώματα αυτά δίδουν δετική ανοσοαντίδραση με αντιγόνα της Β- όσο και Τ- λεμφικής σειράς καθώς και αντιγόνα του αιμοποιητικού ιστού ή άλλων μη λεμφικής προέλευσης ιστών. Κατόπιν αυτών βασική προϋπόθεση για την ασφαλή ταξινόμηση ενός ΧΛΥΣ ως Β-/Τ- ή ΝΚ-προέλευσης καθώς και για την περαιτέρω υποομαδοποίησή του, αποτελεί η χρησιμοποίηση ενός φάσματος αντισωμάτων που να συμπεριλαμβάνει περισσότερους του ενός δείκτες της Β- όσο και Τ- λεμφικής σειράς, καθώς και άλλους δείκτες. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία συμβάλλει επίσης στην διαγνωστική προσέγγιση των ΧΛΥΣ που χαρακτηρίζονται από ανώμαλο ανοσοφαινότυπο (abnormal immunophenotype). Υπό τον όρο αυτό νοούνται **έκτροπες** από τον “φυσιολογικό ανοσοφαινότυπο” των Β- και Τ- λεμφοκυττάρων είτε με την έννοια της απουσίας ορισμένων φυσιολογικά απαντώμενων αντιγόνων (π.χ. CD7, CD5 από τις Τ-Λευχαιμίες από μεγάλα λεμφοκύτταρα με κοκκία) είτε της έκφρασης άλλων μη φυσιολογικά απαντώμενων αντιγόνων (π.χ. CD5 και CD43 στη Β- Χρονία Λεμφική Λευχαιμία και το Λέμφωμα από το Κύτταρο του Μανδύα).

Τέλος επισημαίνεται η αναγκαιότητα της ικανοποιητικής ποιότητας των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων ως αποφασιστικής σημασίας παράμετρος στην αποφυγή ψευδώς δετικών και αρνητικών ευρημάτων.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΧΛΥΣ

Με δεδομένες τις βασικές αρχές μελέτης και τις διαγνωστικές παγίδες που ήδη αναφέρθηκαν, η μεθοδολογία μελέτης των ΧΛΥΣ είτε σε επίπεδο λεμφαδένων είτε εξωλεμφαδενικά είτε στο σπλήνα έχει ως εξής: Κατ'αρχήν αξιολογείται η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, από την οποία και προκύπτουν οι βασικές πληροφορίες όσον αφορά την αρχιτεκτονική ανάπτυξη

ξης και την αδρή κυτταρική σύνδεση της εξεργασίας. Ακολουθεί ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών παραφίνης με περιορισμένο φάσμα δεικτών με στόχο την επιβεβαίωση της κυτταρικής προέλευσης (B ή T) της εξεργασίας. Προκειμένου για την B-σειρά χρησιμοποιούνται οι δείκτες L-26 (CD20ass) και CD79a αντίστοιχα ενώ για την T-σειρά οι δείκτες CD3 (πολυκλωνικό) και CD45RO (UCHL-1) αντίστοιχα.

Μετά την επιβεβαίωση της B- προέλευσης της εξεργασίας (L-26+ CD79a+ CD3⁺, CD45RO⁺) ακολουθεί ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών παραφίνης ή και κρουστάτου με **ευρύτερο φάσμα δεικτών** που στοχεύει: 1) στην ένταξη της εξεργασίας σε ένα από τους υπότυπους των Β-ΧΛΥΣ σύμφωνα με την REAL ταξινόμηση (Πίνακας 1) και 2) την επιβεβαίωση της κλωνικής της φύσης.

Στον πίνακα 2 αναφέρονται οι βασικοί για τη μελέτη των Β-ΧΛΥΣ ανοσοϊστοχημικοί δείκτες σε τομές κρουστάτου και παραφίνης αντίστοιχα. Εντούτοις θα πρέπει να επισημανθεί, ότι το φάσμα των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων διαφέρει κατά περίπτωση και η επιλογή του θα πρέπει **πάντα** να αποτελεί τη συνιστάμενη της αξιολόγησης: 1) της κλασσικής μορφολογίας, 2) του ειδικού ανοσοδιαγνωστικού προβληματισμού και 3) των δυνατοτήτων του

συγκεκριμένου παθολογοανατομικού παρασκευάσματος (νωπό ή μονιμοποιημένο).

Είναι γεγονός ότι, όπως γίνεται προφανές και από τον πίνακα 2, σήμερα πλέον έχει σημαντικά αυξηθεί ο αριθμός των ανοσοδραστικών σε τομές παραφίνης Β-λεμφικών δεικτών. Εντούτοις θα πρέπει να επισημανθεί, ότι για την περαιτέρω ταξινόμηση των Β-ΧΛΥΣ στους υπότυπους των, οι οποίοι σύμφωνα με την ταξινόμηση REAL αναγνωρίζονται πλέον ως ξέχωρες κλινικοπαθολογοανατομικές οντότητες με διαφορετική βιολογική συμπεριφορά και πορεία, είναι **αναγκαία**, προς το παρόν τουλάχιστον, η παράλληλη ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών κρουστάτου και παραφίνης. Ως χαρακτηριστικό εν προκειμένω παράδειγμα αναφέρεται η αξία της ανοσοϊστοχημικής μελέτης τομών κρουστάτου στη ΔΔ του λεμφώματος από το κύτταρο του μανδύα από το χαμηλής κακοηθείας MALT λέμφωμα στο γαστρεντερικό σύστημα. Ως γνωστό, το μεν πρώτο χαρακτηρίζεται από μετρίως επιδετική βιολογική συμπεριφορά, ενώ το δεύτερο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, από ευνοϊκή πρόγνωση.

Η ανοσοϊστοχημική επιβεβαίωση της κλωνικότητας των Β-ΧΛΥΣ, με την έννοια περιορισμού των ελαφρών (κ/λ) αλύσεων, επιτυγχάνεται με την ανίχνευση ανοσοσφαιρίνης επιφα-

Πίνακας 1: Περιφερικά Β - χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα*

- Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία / Λέμφωμα από Μικρά Λεμφοκύτταρα.
Ποικιλία: με μονοκλωνική γαμμοπάθεια / πλασμοκυττοειδή διαφοροποίηση » Λεμφοπλασμοκυττοειδές Ανοσούκτωμα
- Β- Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία.
- Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα / Ανοσούκτωμα (+/- Μακροσφαιριναιμία Waldeström)
- Λέμφωμα από το Κύτταρο του Μανδύα (Mantle-Cell Lymphoma).
Ποικιλίες:
 - Βλαστική ή Βλαστοειδής
 - Πλειόμορφη
 - Από Μικρά Λεμφοκύτταρα
 - Μονοκυτταροειδής
- Λεμφοζιδιακό Λέμφωμα (Follicular Lymphoma)
Ποικιλίες:

• Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (Grade):	1
(κεντροβλάστες <50% των λεμφοζιδιακών περιοχών)	
• Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας:	2
(κεντροβλάστες >50% των λεμφοζιδιακών περιοχών)	
- Β- Λέμφωμα από το Κύτταρο της Οριακής Ζώνης (Marginal-Zone)
 - Εξωλεμφαδενικό (Από το λεμφικό ιστό των βλεννογόνων (MALT και MALT - τύπου αντίστοιχα +/- μονοκυτταροειδή Β- λεμφοκύτταρα).
 - Λεμφαδενικό (Nodal) (+/- Μονοκυτταροειδή Β- λεμφοκύτταρα)
- Σπληνικό Β- Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (+/- Λαχνωτά Λεμφοκύτταρα).
- Λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα.
- Πλασμοκύττωμα

* Σύμφωνα με την πρόσφατη τροποποίηση της ταξινόμησης REAL από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) (Orlando 1997).

Πίνακας 2: Βασικοί δείκτες κατά τη διαγνωστική προσέγγιση των Β-ΧΛΥΣ

Τομές Παραφίνης	Τομές Κρυστάτου
Δείκτες Β- Κυτταρικής Προέλευσης	
<ul style="list-style-type: none"> • CD20ass (L-26) • CD45R (4KB-5) • CD79a • CIg (κ,λ,γ,μ,α) 	<ul style="list-style-type: none"> • CD19 • CD22 • CD20 • SIg (κ, λ, γ, μ, α, δ) • CD10
	Άλλοι Δείκτες
<ul style="list-style-type: none"> • CD43 • K-67 • αντι-Κυκλίνη D1- (PRAD-1) • CD21 (IF8) αντι-bcl-2 ογκο-πρωτεΐνη • Tdt 	<ul style="list-style-type: none"> • CD25 • CD11c • CD5 • K-67 • CD103 (MLA) • DRC • TRAP • Tdt

νείας (SIg) συνήδως σε τομές κρυστάτου και σπανιότερα κυτταροπλάσματος (CIg) σε τομές παραφίνης. Η δυνατότητα ταυτοποίησης Β-κλωνικότητας, ειδικότερα με την έννοια ανοσοσφαιρίνης επιφανείας, αποκτά ιδιαίτερη αξία κατά τη διαγνωστική προσέγγιση περιορισμένης έκτασης, Β-λεμφοκυτταρικών διηθήσεων από μικρά λεμφοκύτταρα σε εξωλεμφαδενικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένης και της ΟΒ, όπου η μορφολογική μελέτη δεν επιτρέπει τον αποκλεισμό της αντιδραστικής (πολυκλωνικής) της φύσης.

Παράλληλα θα πρέπει να τονισθεί η αξία της συνδυασμένης μορφολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης στην εκτίμηση άλλων, πλην της κυτταρικής προέλευσης και κλωνικότητας, παραμέτρων στη διαγνωστική προσέγγιση των Β-ΧΛΥΣ λόγω των άμεσων κλινικοπρογνωστικών των προεκτάσεων. Χαρακτηριστικά αναφέρονται: 1) η δυνατότητα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (Grading) σε όλους πλέον τους υπότυπους των Β-ΧΛΥΣ με ακραίο παράδειγμα τα οζώδη λεμφώματα, 2) η εκτίμηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τους δείκτες (K67 και MIB-1), 3) η εκτίμηση του ποσοστού των Τ-αντιδραστικών λεμφοκυττάρων και των υποτύπων των (T4/T8) στα Β-Λεμφώματα, 4) η επιβεβαίωση σύνδετων (composite) λεμφωμάτων και 5) η δυνατότητα του σχεδιασμού ειδικών ανοσοθεραπειών επί τη βάση του συγκεκριμένου ανοσοφαινοτυπικού profil της κάθε εξεργασίας.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί, ότι οι παράμετροι που προαναφέρθηκαν, δεν είναι εκ των πραγμάτων δυνατό να αξιολογηθούν κατά την ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση

των Β-ΧΛΥΣ με κυτταρομετρία ροής περιφερικού αίματος ή και μυελού των οστών.

Στον πίνακα 3 αναφέρονται τα βασικά μορφολογικά γνωρίσματα καθώς και ο **χαρακτηριστικός** (και όχι παθογνωμονικός) ανοσοφαινότυπος των υποτύπων των Β-ΧΛΥΣ, μετά τη συνδυασμένη αξιολόγηση των οποίων υπομαδοποιούνται στα πλαίσια της ταξινόμησης REAL.

Στις περιπτώσεις επιβεβαίωσης της Τ- προέλευσης μιας εξεργασίας (CD3+, CD45RO+/-, CD79a-, L-26-) ή ευρημάτων αρνητικών για Β- και Τ- προέλευση ακολουθεί ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών κρυστάτου και παραφίνης με ευρύτερο φάσμα δεικτών της Τ- και ΝΚ- σειράς καθώς και άλλων βασικών στη διάγνωση των Τ- και ΝΚ- ΧΛΥΣ δεικτών (Πίνακας 4).

Εν προκειμένω προτείνεται η χρησιμοποίηση του συνόλου των Pan-T (CD7, CD3, CD2, CD5, CD1a), των CD4 και CD8, καθώς και των ΝΚ (CD56, CD16, CD57) δεικτών, λόγω του ότι τα Τ-ΧΛΥΣ χαρακτηρίζονται συχνά από την απουσία ενός ή περισσότερων Pan-T αντιγόνων, των CD4 ή και CD8 αντιγόνων καθώς και ενός τουλάχιστον των ΝΚ αντιγόνων μέσα στα πλαίσια "άνωμαλου ανοσοφαινότυπου". Επισημαίνεται παράλληλα η σχετική (και όχι απόλυτη) αξία του άνωμαλου ανοσοφαινότυπου, ως στοιχείου ενδεικτικού υπέρ της κλωνικής (νεοπλασματικής) φύσης των Τ-λεμφοκυτταρικών διηθήσεων από μικρά λεμφοκύτταρα. Η αδυναμία αυτή ανοσοφαινοτυπικής επιβεβαίωσης Τ-κλωνικότητας, οφείλεται στην απουσία, προς το παρόν τουλάχιστον, ανοσοφαινοτυπικού δείκτη κλωνικότητας στην Τ-κυτταρική σειρά, σε

Πίνακας 3: Περιφερικά B- χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα

Αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης	Κυτταρική σύνδεση	Ανοσοφαινότυπος	Επιθεβαίωση	Γονότυπος	Τελική Διάγνωση
<p><i>Λεμφαδένες:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Διάχυτο • Αυξητικά Κέντρα (+) (Pseudofollicles) <p>"</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά λεμφοκύτταρα • Προλεμφοκύτταρα (σπάνια) • Παραανοσοβλάστες (σπάνια) <p>Τα παραπάνω</p> <p>+</p> <ul style="list-style-type: none"> • Λεμφοκύτταρα με πλασμοκυττοειδή διαφοροποίηση 	<ul style="list-style-type: none"> • *SIgM⁺, SIgD^{+/-}, Pan B⁺, CD5⁺, CD23⁺ CD43⁺, CD11c^{+/-}, CD10⁻ <p>Τα παραπάνω</p> <p>+</p> <ul style="list-style-type: none"> • **Cig⁺ 		<ul style="list-style-type: none"> • Τρισωμία 12^{+/-}, 13q^{+/-} <p>"</p>	<p>B- Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (B-ΧΛΛ) / B-Λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα</p> <p>Ποικιλία B-ΧΛΛ: Με πλασμοκυττοειδή Διαφοροποίηση ≈ Λεμφοπλασμοκυττοειδές Ανοσοκύττωμα</p>
<p><i>Λεμφαδένες:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Διάχυτο • Αυξητικά κέντρα (-) • Ανάπτυξη στον μεσολεμφοζιδιακό χώρο 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά Λεμφοκύτταρα • Λεμφοκύτταρα με πλασμοκυττοειδή Διαφοροποίηση • Πλασματοκύτταρα • Ανοσοβλάστες 	<ul style="list-style-type: none"> • CIg⁺ (Πλασματοκύτταρα + Λεμφοκύτ. με πλασμοκυττοειδή Διαφοροποίηση) • Pan-B⁺, CD5⁻, CD23⁻, CD10⁻, CD43^{+/-}, D25^{+/-} 			<p>Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα (Ανοσοκύττωμα) +/- Μακροσφαιριναίμια Waldeström</p>
<p><i>Λεμφαδένες:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Λεμφοζιδιακό • Λεμφοζιδιακό & Διάχυτο • Διάχυτο από μικρά με εντομή λεμφ. (σπάνιος υπότυπος) 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά Λεμφοκύτταρα με εντομή (κεντροκύτταρα) <p>+</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλα Λεμφοκύτταρα χωρίς εντομή με πυρήνιο (κεντροβλάστες) 	<ul style="list-style-type: none"> • CD10^{+/-} CD5⁻, bcl-2 πρωτ.* • SIg⁺ (M, G, A), Pan B⁺, PRAD-1⁻, CD43⁻, CD23^{+/-} • Δίκτυο Δενδριτικών Δικτυοκυττάρων Βλαστικών Κέντρων (+) 		<ul style="list-style-type: none"> • t (14; 18) • Αναδιάταξη Ογκογονιδίου bcl-2 	<p>Λεμφοζιδιακό Λέμφωμα (Follicular Center Lymphoma)</p>
<p><i>Λεμφαδένες:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Διάχυτο • Οζώδες (nodular) • Ζώνης Μανδύα (Mantle-Zone) • Αυξητικά κέντρα (-) 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά-Μέσου μεγέδους λεμφοκύτταρα με ανώμαλο πυρηνικό περίγραμμα <p>Ποικιλίες:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Βλαστική - Πλειόμορφη - Μονοκυτταροειδής 	<ul style="list-style-type: none"> • SIgM⁺, SIgD⁺, Pan-B⁺, CD5⁺, CD23⁻ CD10⁻ CD43⁺, CD11c⁻, CD25⁻ • K-67 ↑ • PRAD-1 (κυκλίνη D1)⁺ 		<ul style="list-style-type: none"> • t (11; 14) • Αναδιάταξη Ογκογονιδίου bcl-1/PRAD-1 	<p>Λέμφωμα από το κύτταρο του Μανδύα (Mantle-cell Lymphoma)</p>

Πίνακας 3: Περιφερικά B- χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα (συνέχεια)

Αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης	Κυτταρική σύνδεση	Ανοσοφαινότυπος	Επιβεβαίωση Γονότυπος	Τελική Διάγνωση
<p><i>Λεμφαδένες:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Τύπου Οριακής Ζώνης (Marginal Zone) • Μεσολεμφοζιδιακό • Περικολποειδικό (Perisinusoidal) • Λεμφοζιδιακό (Αποικισμός βλαστικών κέντρων) 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά Λεμφοκύτταρα • Λεμφοκύτταρα Οριακής Ζώνης • Μονοκυτταροειδή Λεμφοκ. • Πλασματοκύτταρα • Ανοσοβλάστες 	<ul style="list-style-type: none"> • SIg⁺, CIg^{-/+}, Pan-B⁺, CD5⁺, CD10⁻ CD23⁻ CD43^{-/+}, CD11c⁻, CD25⁻ 	<ul style="list-style-type: none"> • bcl-1 (-) • bcl-2 (-) 	<p>Λεμφαδενικό B- Λέμφωμα Οριακής Ζώνης +/- Μονοκυτταροειδή B- Λεμφοκύτταρα</p>
<p><i>Εξωλεμφαδενικοί ιστοί:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Τύπου Οριακής Ζώνης • Μεσολεμφοζιδιακό • Λεμφοζιδιακό (Αποικισμός βλαστικών κέντρων) 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά Λεμφοκύτταρα • Λεμφοκύτταρα Οριακής Ζώνης <ul style="list-style-type: none"> - Κεντροκυτταρικού τύπου - B- Μονοκυτταροειδή • Πλασματοκύτταρα • Ανοσοβλάστες • Λεμφοεπιδηλιακή αλλοίωση 	<ul style="list-style-type: none"> • SIg⁺ (M, G, A), CIg^{-/+}, Pan B⁺, CD5⁺, CD10⁻, CD23⁻, CD43^{-/+}, CD25⁻, CD11c^{+/-} 	<ul style="list-style-type: none"> • t (11; 18) • Τρισωμία 3 	<p>Εξωλεμφαδενικό B- Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (χαμηλής κακοηθείας) ≈ Λέμφωμα MALT και MALT τύπου</p>
<p><i>Λεμφαδένες:</i></p> <p>Τα παραπάνω +</p> <ul style="list-style-type: none"> • Περικολποειδικό <p><i>Σπλήνας</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Τύπου Οριακής Ζώνης στο Λευκό Πολφό +/- <p>Διήθηση Ερυθρού Πολφού πρωτόπλασμα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Σπλήνας: Διήθηση ερυθρού πολφού • Ήπαρ: Διήθηση κολποειδών • Λεμφαδένας: Λεμφοκολπικό • Μυελός Οστών: Διάμεση / Διάχυτη Διήθηση 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά λεμφοκύτταρα με άφθονο διαυγές • Μικρά λεμφοειδή κύτταρα με νεφροειδή πυρήνα και άφθονο διαυγές πρωτόπλασμα 	<ul style="list-style-type: none"> • SIgM⁺, SIgD^{+/-}, Pan-B⁺, CD5^{+/-}, CD10⁻, CD25⁻, CD23⁻, CD11c^{+/-} TRAP^{+/-} • SIg⁺ (M, G, D, A), Pan B⁺, CD5⁺, CD10⁻, CD25⁻, CD103(MLA)⁺, CD23⁻, TRAP⁺ 		<p>Σπληνικό B- Λέμφωμα Οριακής Ζώνης +/- Λαχνωτά Λεμφοκύτταρα</p> <p>Λευκαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα</p>

* Ανοσοσφαιρίνη επιφανείας

** Ανοσοσφαιρίνη κυτταροπλάσματος

Πίνακας 4: Βασικοί δείκτες κατά τη διαγνωστική προσέγγιση των T- και NK- ΧΛΥΣ

Τομές Παραφίνης	Τομές Κρουστάτου
	Δείκτες T- Κυτταρικής Προέλευσης
<ul style="list-style-type: none"> • CD3 (πολυκλωνικό) • CD45RO (UCHL-1) • CD43 (Leu 22) • OPD4 • CD8 • CD1a • βF1 (Tcr-αβ) • CD57 	<ul style="list-style-type: none"> • CD5 • CD7 • CD3 • CD2 • CD4 • CD8 • CD1a • Tdt • CD56 • CD16 • Tcr-δ
	Άλλοι Δείκτες
<ul style="list-style-type: none"> • Tdt • Κυτταροτοξικές πρωτεΐνες: - Περφορίνη - TIA-1 • K-67 	<ul style="list-style-type: none"> • CD25 • K-67 • CD103 (MLA)

αντίθεση με την Β-σειρά, όπου ο περιορισμός των ελαφρών (κ/λ) αλύσεων αποτελεί ανοσοφαινοτυπικό δείκτη Β-κλωνικότητας. Η επιβεβαίωση της κλωνικής φύσης των T-χρονίων λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών επιτυγχάνεται εντούτοις σε μοριακό επίπεδο (Southern Blot / PCR) μέσω της ανάδειξης κλωνικών αναδιατάξεων των T-κυτταρικών υποδοχέων Tcr-αβ και Tcr-γδ.

Στον πίνακα 5 αναφέρονται οι T- και NK-χρόνιες λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες με καθυπεροχή λευχαιμικό/γενικευμένο πρότυπο ανάπτυξης στα πλαίσια της ταξινόμησης REAL. Η αναγκαιότητα της περαιτέρω ανοσοφαινοτυπικής οριοθέτησής των γίνεται προφανής, αν ληφθεί υπόψη, ότι οι συγκεκριμένες οντότητες παρουσιάζουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά σχετιζόμενη απολύτως με χαρακτηριστι-

κό ανοσοφαινότυπο. Ενδεικτικά αναφέρεται η επιθετική βιολογική συμπεριφορά της NK-Λευχαιμίας από μεγάλα λεμφοκύτταρα με κοκκία (NK-LGL) σε αντίθεση με την ήπια πορεία των T- προέλευσης λευχαιμιών από μεγάλα λεμφοκύτταρα με κοκκία (T-LGL). Παράλληλα αναφέρεται το ηπατοσπληνικό γδ T- Λέμφωμα, ως ξέχωρη κλινικο-παθολογοανατομική οντότητα στην ομάδα των T-ΧΛΥΣ, με επιθετική βιολογική συμπεριφορά, όπου η συνδυασμένη μορφολογική, ανοσοφαινοτυπική, γονοτυπική, και καρυοτυπική μελέτη συμβάλλει στη διαφορική διάγνωσή της από τις ήπιες πορείας T-λευχαιμίες από μεγάλα λεμφοκύτταρα με κοκκία (T-LGL), που χαρακτηρίζονται επίσης από μαζική διήθηση του σπληνός, ήπατος και, σε μικρότερη έκταση, του μυελού των οστών.

Στον πίνακα 6 αναφέρονται τα βασικά μορ-

Πίνακας 5: Περιφερικά T- και NK- χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα με γενικευμένο / λευχαιμικό πρότυπο ανάπτυξης*

- T- Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.
- T- Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία.
- T- Λευχαιμία από Μεγάλα Λεμφοκύτταρα με κοκκία (T-LGL).
- NK- Λευχαιμία από Μεγάλα Λεμφοκύτταρα με κοκκία (NK - LGL) με επιθετική βιολογική συμπεριφορά.
- T- Λευχαιμία / Λέμφωμα Ενηλίκων (HTL-V-1+) (ATL/L).
- Ηπατοσπληνικό γδ T- Λέμφωμα
- Σπογγοειδής Μυκητίαση / Σύνδρομο Sezary

* Σύμφωνα με την πρόσφατη τροποποίηση της ταξινόμησης REAL από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) (Orlando 1997).

Πίνακας 6: Περιφερικά T- και NK- χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα με καθ' υπεροχή λευχαιμικό/γενικευμένο πρότυπο ανάπτυξης.

Αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης	Κυτταρική σύνδεση	Επιβεβαίωση Ανοσοφαινότυπος	Γονότυπος	Τελική Διάγνωση
<ul style="list-style-type: none"> • Διάχυτη Διήθηση Λεμφαδένων • Υπερπλασία μετατριχοειδικών φλεβιδίων 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά λεμφοκύτταρα ή Προλεμφοκύτταρα χωρίς κοκκία 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan-T⁺ (CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺, CD7⁺), CD25⁻, CD4⁺, CD8⁻ > CD4⁺, CD8⁺ > CD4⁺, CD8⁻ 	<ul style="list-style-type: none"> • 75% inv 14 (q11; q32) 	T- Χρόνια Λεμφοκυτταρική / Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία
<ul style="list-style-type: none"> • Διήθηση: Ερυθρού Πολφού, Σπλήνα, Ηπατικών Κολποειδών, Κολποειδών Μυελού Οστών 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά Λεμφοκύτταρα με άφθονο διαυγές πρωτόπλασμα 	<ul style="list-style-type: none"> • CD2⁺, *SCD3⁺, CD7⁻, TcRaβ⁺, CD4⁻, CD8⁺, CD16⁺, CD56⁻, CD57⁻ 	<ul style="list-style-type: none"> • Παρουσία Κλωνικών Αναδιατάξεων των γόνων των T- κυτταρικών υποδοχέων (Ter) 	T- Λευχαιμία από Μεγάλα Λεμφοκύτταρα με κοκκία (T-cell Granular Lymphocytic Leukemia)
<ul style="list-style-type: none"> • Διήθηση: Ερυθρού Πολφού, Σπλήνα, Ηπατικών Κολποειδών, Κολποειδών Μυελού Οστών 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά Λεμφοκύτταρα με άφθονο διαυγές πρωτόπλασμα 	<ul style="list-style-type: none"> • CD2⁺SCD3⁻, CD56⁺, CD5⁻, CD7⁻, CD4⁻, CD8^{+/-}, CD16⁺, CD57^{+/-} • TcRaβ⁻, TcRγδ 	<ul style="list-style-type: none"> • Απουσία Κλωνικών Αναδιατάξεων των Γόνων των T- κυτταρικών υποδοχέων (Ter) 	NK- Λευχαιμία από Μεγάλα Λεμφοκύτταρα με κοκκία με επιθετική συμπεριφορά (Aggressive NK-Cell Leukemia)
<ul style="list-style-type: none"> • Διήθηση: Ερυθρού Πολφού, Σπλήνα, Ηπατικών Κολποειδών, Κολποειδών Μυελού Οστών 	<ul style="list-style-type: none"> • Μέσου μεγέδους Λεμφοκύτταρα με ανώμαλο πυρηνικό περίγραμμα και διαυγές πρωτόπλασμα 	<ul style="list-style-type: none"> • CD3⁺, CD2⁺, CD7⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD56^{+/-} • TcRδ⁺, TcRaβ 	<ul style="list-style-type: none"> • Ισοχρωμόσωμα 7q 	Ηπατοσπληνικό γ δ T-Λέμφωμα (Hepatosplenic γδ T-cell Lymphoma)
<ul style="list-style-type: none"> • Απουσία Διήθησης Λεμφαδένων Δέρμα 				
<ul style="list-style-type: none"> • Επιδερμοτροπισμός • Λεμφαδένες: <ul style="list-style-type: none"> - Δερματοπαθητική αντίδραση - Διήθηση T- ζώνης από T-Λέμφωμα 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά και Μεγάλα Λεμφοκύτταρα με εγκεφαλοειδείς πυρήνες 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan-T⁺ (CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺, CD7^{+/-}), CD4⁺, CD8⁻, CD25^{+/-} 		Σπογγοειδής μυκητίαση / Σύνδρομο Sezary
<ul style="list-style-type: none"> • Λεμφαδένες: Διάχυτη Διήθηση T-Zώνης και Λεμφοκόλπων 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά και Μέσου μεγέδους ή Μεγάλα Λεμφοκύτταρα με εντονότερες ανωμαλίες της πυρηνικής μεμβράνης 	<ul style="list-style-type: none"> • CD3⁺, CD45RO⁺, CD43⁺, CD25⁺, CD4⁺, CD7⁻ 	<ul style="list-style-type: none"> • Τρισωμία 3 και 7 	T- Λευχαιμία / Λέμφωμα των Ενηλίκων (Adult - T-cell Leukemia/Lymphoma)

* SCD3 = CD3 Επιφανείας

φολογικά γνωρίσματα καθώς και ο **χαρακτηριστικός** (και όχι παθογνομονικός) ανοσοφαινότυπος των T- και NK-ΧΛΥΣ, μετά τη συνδυασμένη αξιολόγηση των οποίων υποομαδοποιούνται στα πλαίσια της ταξινόμησης REAL.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η ανοσοϊστοχημική μελέτη συμβάλλει καθοριστικά στη διάγνωση, διαφορική διάγνωση, πρόγνωση, θεραπεία και παρακολούθηση ασθενών με ΧΛΥΣ.

- Ο σωστός χειρισμός και η επεξεργασία του νωπού υλικού αποτελούν εγγύηση για την αξιολόγηση της κλασσικής μορφολογίας όσο και τη δυνατότητα εφαρμογής ανοσοϊστοχημικών ή άλλων τεχνικών με **διαγνωστικά αξιολογήσιμα** αποτελέσματα.

- Η ερμηνεία των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων και η επιλογή του κατά περίπτωση χρησιμοποιούμενου φάσματος αντισωμάτων προϋποθέτει Α) **γνώση**: 1) του αντικειμένου, 2) του συγκεκριμένου ανοσοδιαγνωστικού προβλημα-

τισμού και 3) των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των διαφόρων αντισωμάτων και τεχνικών και Β) **συνεκτίμηση πάντοτε** με τα δεδομένα της κλασσικής μορφολογίας.

- Η μοριακή ανάλυση συμπληρώνει σε ορισμένες περιπτώσεις την ανοσομορφολογική μελέτη.

- Η ανοσομορφολογική μελέτη διογκωμένων λεμφαδένων ή εξωλεμφαδενικών ιστών με παθολογία, παρέχει τη δυνατότητα αξιολόγησης παραμέτρων με κλινικοπρογνωστική αξία, οι οποίες δεν είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη του περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών με κυτταρομετρία ροής.

- Η αναγκαιότητα πολύπλευρης κατά το δυνατό διαγνωστικής προσέγγισης των ΧΛΥΣ (μορφολογικής, ανοσοϊστοχημικής, μοριακής και κυτταρογενετικής) κάνει σκόπιμη την εξασφάλιση των προϋποθέσεων εκείνων, μετά την εξαίρεση του βιοπτικού υλικού, που θα επιτρέψουν μια τέτοια διαγνωστική προσέγγιση, εάν και όποτε αυτό κριθεί επιβεβλημένο.

SUMMARY

Immunophenotype analysis of chronic lymphoproliferative syndromes Papadaki Th.

Department of Hemopathology "Evangelismos" General Hospital, Athens

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Harris N, Jaffe E, Banks P, et al. A revised European - American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(55): 1361-1293, 1994.
2. Jaffe ES. Histopathology and Immunopathology in Magrath I (ed). *The non Hodgkin's Lymphoma*, 2nd Edition, Arnold, 1997: 109-133.
3. Perkins S and Kjoldborg CI. Immunophenotyping of Lymphomas and Leukemias in Paraffin-Embedded Tissues. *Am J Clin Pathology* 99(4), 363-373, 1993.
4. Stein H. Critique of the critique: Response to the editorial entitled "Classification of Lymphoid Neoplasms" by Dr Saul Rosenberg which

accompanied the publication of the Revised - European American Lymphoma Classification Proposal in the September 1994 Issue of *Blood*. *Annals of Oncology* 6, 109-111, 1995.

5. O' Connor Nigel. New Classification for lymphomas. *Lancet* 345:1521-1522, 1995.
6. Criel A, Pittaluga S, Verhoef G et al. Small B-cell NHL and their leukemic counterpart: differences in subtyping and assessment of leukemic spread. *Leukemia* 10:848-853, 1996.
7. Jaffe E, Harris N, Chan J, Stein H, Vardiman J. Proposed World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of Hematopoietic and Lymphoid Tissues Society of Hematopathology. Orlando, Florida 2/3/1997.