

CITODIAGNOSTIKA NE-HODGKINOVIH LIMFOMOV

Marija Bizjak-Schwarzbartl

Ne-Hodgkinovi limfomi (NHL) so redka obolenja celic limforetikularnega sistema in zasedajo do 2% vseh malignih obolenj. So heterogena skupina obolenj, ki jih je morfološko težavno opredeliti. Številne klasifikacije dodatno povečujejo problem diagnosticiranja.

Ne-Hodgkinovih limfomov ne moremo klinično zanesljivo ločiti od številnih drugih obolenj, pri katerih se bezgavke tudi povečajo (limfadenitis, sarkoidoza, bruceloza, lues, zasevki itd.). Citologija je edina predoperativna mikroskopska diagnostična metoda, vendar imajo citologi v diagnostiki ne-Hodgkinovih limfomov še premalo izkušenj. Vseh bolnikov s to boleznijo ni možno operirati, posebno ne tistih z visokomalignim NHL, ki so večkrat zelo hitro v tako slabem kliničnem stanju, da operacija za biopsijo ni več možna. Vsem pa lahko vzamemo vzorce za mikroskopsko preiskavo s tanko iglo, zato moramo dobro poznati citomorfologijo ne-Hodgkinovih limfomov in tudi možnosti uporabe dodatnih diagnostičnih metod (citokemičnih, imunoloških itd.), ki lahko pripomorejo k izboljšanju diagnostike in njeni klasifikaciji. V citodiagnostiki tumorje najprej mikroskopsko ločimo med benigne in maligne, maligne oblike pa opredelimo še kot karcinome, sarkome, limfome itd. Z dobrim poznavanjem morfologije ter uporabo citokemičnih in imunoloških reakcij lahko ne-Hodgkinove limfome nadalje razvrščamo, kar je zlasti pomembno za bolnike, ki jih ne moremo operirati. Citologija je v diagnostiki ne-Hodgkinovih limfomov uporabna tudi za ugotavljanje razširjenosti obolenja in odločitev, katera od povečanih bezgavk je najprimernejša za histološko preverjanje procesa in mikroskopsko potrditev ponovitve obolenja.

Naši bolniki in metode dela

Za boljše poznavanje citomorfoloških, citokemičnih in imunoloških značilnosti ne-Hodgkinovih limfomov v vzorcih, dobljenih s tanko igelno aspiracijsko biopsijo (TIAB), določenih po Kielski klasifikaciji, smo pri 159 histološko ugotovljenih obolenjih (80 bolnikov je imelo NHL nizke stopnje in 79 NHL visoke stopnje malignosti) analizirali zastopanost posameznih vrst celic v vzorcih TIAB pri raznih podskupinah in opisali njihove morfološke značilnosti. Analizirali smo tudi citokemične in imunološke reakcije pri posameznih podskupinah ne-Hodgkinovih limfomov. Pri vseh bolnikih smo predhodno naredili citološko punkcijo s 3- do 4-centimetrsko iglo z zunanjim premerom 0,7 mm. Del s punkcijo dobljenega vzorca smo razmazali na objektna stekelca (4 razmaze smo posušili na zraku, enega ali več takoj fiksirali v Delounayevem fiksativu), preostanek pa izbrizgali v tekočino za spiranje. Za citomorfološko analizo smo uporabljali preparate, barvane po Giemsiju, za ocenitev hroma-

tinske strukture in položaja nukleolov pa tudi preparate, barvane po Papanicolaouju. Če smo imeli ustrezne preparate, smo opravili še citokemične reakcije: PAS, kisló fosfatazo (KF) in alfa-naftil-acetat esterazo (E). Iz vzorca, ki smo ga dali v raztopino, smo napravili preparate za imunološke preiskave. Način njihove priprave smo tako dolgo spreminjali, da smo dobili zadovoljive rezultate. Postopek je naslednji:

- vzorec damo v 3 ml tekočine za izpiranje,
- dobro premešamo s pipeto,
- centrifugiramo 5 minut pri 1500 obratih,
- odpipetiramo supernatant,
- ponovno dolijemo 3 ml tekočine za izpiranje,
- dobro premešamo s pipeto ter pripravimo preparate s citocentrifugo,
- 5 minut centrifugiramo pri 1500 obratih,
- najprej naredimo samo dva preparata z različnim številom kapljic,
- primernost preparata preverimo pod mikroskopom tako, da ga obarvamo s toluoidinom,
- pripravimo preparate iz preostalega vzorca (običajno 10 do 12),
- preparate takoj fiksiramo v Delaunayevem fiksativu najmanj 2 uri, najbolje čez noč, ali pa jih posušimo na zraku za drugačne fiksacije,
- fiksirane preparate barvamo po Papanicolaouju in jih pokrijemo.

Tako pripravljene preparate so uporabni za imunološke reakcije tudi več let.

Imunološka metoda, ki se je pokazala za uspešno pri tako pripravljenih preparatih, je metoda avidin-biotin-kompleks (metoda ABC). Imunološke reakcije smo opravili z naslednjimi protitelesi znamke DACO: LCA /CD 45/ (anti-human leucocyte common antigen), CK 1 (anti-human cytokeratin), lambda (lahke verige), kapa (lahke verige), L 26 (anti-human B cell), UCHL 1 (CD 45 RO) (anti-human T cell), CD 30 (Ki-1 antigen), MT1 (anti-human T cell), MB2 (anti-human B cell).

Uporabljali smo Kielsko klasifikacijo, ki vse ne-Hodgkinove limfome imunološko deli glede na celice B in T ter malignostno stopnjo (nizka in visoka). Kielska klasifikacija je navedena v tabeli 1.

Citomorfološko lahko pri ne-Hodgkinovem limfomu razlikujemo naslednje celice: zrele limfocite, prolimfocite, centrocite, centroblaste, imunoblaste, paraimunoblaste, limfoblaste, plazmocitoidne celice, mastocite, plazmatke in retikulumske celice ter blastne celice. Zanesljivo razlikovanje je možno na ravni svetlobnega mikroskopa le pri imerzijski povečavi.

Kljub dobremu poznavanju citoloških značilnosti posameznih tipov celic obstaja nevarnost zamenjav različnih vrst celic.

Tabela 1. *Kielska klasifikacija*

Ne-Hodgkinov limfom celic B

nizke stopnje malignosti

limfocitni limfom

 kronična limfatična levkemija (KLL)

 prolimfocitna levkemija

 lasasto celična levkemija

limfoplazmocitni/limfoplazmocitoidni (LP imunocitom) limfom

plazmocitom

centrocitni limfom

centroblastno-centrocitni limfom

visoke stopnje malignosti

centroblastni limfom

imunoblastni limfom

velikocelični anaplastični (Ki-1 +) limfom

Burkittov limfom

limfoblastni limfom

redki tipi

Ne-Hodgkinov limfom celic T

nizke stopnje malignosti

limfocitni limfom

kronična limfocitna in prolimfocitna levkemija

malocelični cerebritiformni limfom

mycosis fungoides

Sezaryjev sindrom

limfoepiteloidni (Lennertov) limfom

angioimunoblastni limfom

limfom cone T

visoke stopnje malignosti

pleomorfni malocelični (HTLV-1 +) limfom

imunoblastni limfom (HTLV-1 +)

velikocelični anaplastični (Ki-1 +)

limfoblastni limfom

redki tipi

Zamenjave so možne med:

- *prolimfociti in centroцитi*. Obe vrsti celic imata približno enako velika jedra, ki jih razlikujemo: 1) po obliki, pri prolimfocitih so okrogla, pri centroцитih pa zažeta; 2) po količini kromatina: prolimfociti so normokromni, centroцитi hipokromni; 3) po količini citoplazme: prolimfociti imajo ozek rob svetle citoplazme, centroцитi so običajno brez vidne citoplazme.
- *Limfoblasti B in centroblasti*. Limfoblasti B imajo običajno okrogla jedra, ki so redko zažeta; vsi so približno enake velikosti, s slabše vidnim nukleolom ter ozkim robom citoplazme, v kateri pri Burkittovem ne-Hodgkinovem limfomu najdemo tudi drobne 1 do 2 μ velike vakuole. Tudi centro-

blasti imajo lahko prav tako okrogla jedra, vendar različno velika in pomaknjena na en pol celice. Njihova citoplazma je obilnejša, blede bazofilna.

- *velikimi centrociti in centroblasti*. Centrociti pri anaplastičnem centrocitnem limfomu in centroblasti imajo približno enako velika jedra, vendar pri centrocitih običajno ne vidimo citoplazme. Pri posameznih anaplastičnih centrocitnih limfomih je citoplazma sicer vidna, vendar svetla in neizrazita, zato si pomagamo s celično sestavo vzorca.
- *centroblasti in imunoblasti*. Med seboj jih ločimo predvsem po položaju in številu nukleolov, kadar ti niso vidni, jih je težavno ločiti.
- *blastnimi celicami pri ne-Hodgkinovem limfomu Ki-1 + in histocitnem limfomu*. Morfološko jih ne moremo razlikovati, zato si pri njih pomagamo s citokemičnimi in imunološkimi reakcijami.

Pri razvrščanju ne-Hodgkinovih limfomov si pomagamo s citokemičnimi in imunološkimi reakcijami, in sicer:

- PAS: znotrajjedrne in intracitoplazmatske ter zunajcelične na PAS pozitivne globule so značilne za LP imunocitom,
- KF — izrazito pikčasto pozitivna reakcija pri T-limfoblastnem ne-Hodgkinovem limfomu,
- difuzno pozitivna reakcija pri limfomu cone T,
- pozitivna reakcija retikulumskih celic, ki so številnejše pri centrocitnem kot limfocitnem ne-Hodgkinovemu limfomu,
- α -naftil-acetat esteraza izrazito pozitivna reakcija pri histiocitnem limfomu.

Vloga imunoloških reakcij pri diagnostiki ne-Hodgkinovih limfomov (potrditev limfoma):

- restrikcija lahkih verig kapa ali lambda,
- pozitivna reakcija z limfomskimi markerji in
- negativna reakcija z drugimi markerji,
- klasifikacija ne-Hodgkinovih limfomov glede na celice T in B s pomočjo markerjev T in B.

Pri analiziranju citomorfoloških, citokemičnih in imunoloških lastnosti smo prišli do naslednjih značilnosti za posamezne podskupine ne-Hodgkinovih limfomov, s katerimi se pogosteje srečujemo v njihovi citodiagnostiki.

Limfocitni — dobro diferencirani limfom — kronična limfatična levkemija (B-KLL)

Prevladujejo prolimfociti (X-469/1000 celic) in limfociti (X-407/1000 celic). Diagnostično pomembni so paraimunoblasti, ki jih najdemo samo pri kronični limfatični levkemiji (KLL). Redke so retikulumske celice, ki jih bolje vidimo v preparatih, kjer je bila narejena reakcija na kislno fosfatazo. Razen paraimunoblastov celice ne presegajo velikosti 11 μ . Centroblastov, imunoblastov in plazmocitoidnih celic v naših vzorcih ni. Diferencialno diagnostično pride v poštev malocelični centrocitni limfom.

Limfoplazmocitni/limfoplazmocitoidni limfom – LP imunocitom

Pravladujejo centroцити (X 487/1000 celic), pri vseh primerih so prisotni tudi limfociti, prolimfociti in plazmocitoidne celice. Najdemo tudi centroblaste, plazmatke, imunoblaste, mastocite in retikulumske celice. Celice niso večje od 20 μ . Najdemo na PAS pozitivne intranuklearne vključke, ki jih pri drugih ne-Hodgkinovih limfomih ni najti. Prisotni so lahko tudi intracitoplazmatski vključki ter zunajcelični globuli. V zelo redkih primerih je PAS reakcija povsem negativna. Za potrditev diagnoze LP imunocitoma je potrebno z imunološkimi metodami dokazati restrikcijo lahkih verig. Diferencialno diagnostično je potrebno misliti na reaktivni limfadenitis ter centroblastno/centrocitni ne-Hodgkinov limfom.

Plazmocitom

Za plazmocitom so značilne plazmatkam podobne celice (X 452/1000 celic) in gola jedra (X 508/1000 celic), ki ležijo med krvnimi celicami. Običajno je citološka slika dokaj enovita in lahko razpoznavna. Celice so velike do 15 μ . Pri posameznih primerih so izrazite razlike v velikosti, saj nekatere celice dosegajo velikost do 25 μ . Reakcija na kisló fosfatazo je pozitivna. Pri vseh plazmocitomih (razen pri anaplastični varianti) je prisotna restrikcija lahkih verig.

Centrocitni ne-Hodgkinov limfom

Prevladujejo centroцити (X 805/1000). Če je več kot 86% centroцитov, je to centrocitni limfom. Pri vseh primerih najdemo tudi limfocite. Prisotni so lahko tudi prolimfociti, centroblasti, retikulumske celice, posamezne plazmatke in eozinofilni granulociti. S citokemičnimi metodami lahko lepo prikažemo retikulumske celice, ki so običajno dokaj številne in pomagajo pri diferenciaciji med KLL in centrocitnim limfomom. Reakciji z L 26 in LCA sta pozitivni. Diferencialno diagnostično pridejo v poštev KLL; mikrocelularni karcinom ter pri anaplastični različici centrocitnega ne-Hodgkinovega limfoma tudi centroblastni NHL.

Centroblastno centrocitni ne-Hodgkinov limfom

Prevladujejo centroцити (X 545/1000 celic), vendar pri vseh primerih najdemo tudi centroblaste, limfocite in prolimfocite. Pogosto so prisotne tudi retikulumske celice ter eozinofilni in nevtrofilni granulociti. V posameznih primerih najdemo tudi plazmatke in plazmocitoidne celice ter imunoblaste. Za potrditev diagnoze je pomemben imunološki dokaz restrikcije lahkih verig. Diferencialno diagnostično je treba misliti na LP imunocitom in reaktivni limfadenitis.

Centroblastni ne-Hodgkinov limfom

Prevladujejo centroblasti (X 462/1000 celic). Vedno so prisotni tudi limfociti, običajno pa še prolimfociti in centroцити. Najdemo lahko tudi imunoblaste, retikulumske celice in eozinofilne granulocite. Centroblasti so velikosti do 24 μm, izjemoma do 35 μm. Imunološka reakcija z markerjem B — L 26 je vedno pozitivna, z markerjem T — UCHL1 pa negativna. Restrikcija lahkih verig ni potrjena pri vseh primerih.

Burkittov ne-Hodgkinov limfom

Prevladujejo limfoblasti B (X 952/1000). Vedno najdemo tudi limfocite in posamezne retikulumske celice, v posameznih primerih pa tudi prolimfocite. Celice so velike do 17 μm, običajno do 15 μm. Citokemične reakcije (PAS, KF in E) so negativne. Imunološka reakcija z L 26 in LCA je pozitivna, UCHL1 pa negativna. Diferencialno diagnostično pride v poštev centroblastni limfom.

T-limfoblastni konvolutni ne-Hodgkinov limfom

Prevladujejo limfoblasti T (X 894/1000 celic). V vseh vzorcih so prisotni tudi limfociti, v posameznih tudi retikulumske celice. Celice ne presegajo velikosti 15 μ. Diagnostično pomembna je kislota fosfatna reakcija, ki je izrazito pikčasto pozitivna, lahko je tudi v obliki drobnih zrn, razporejenih po vsej citoplazmi. Imunološka reakcija z L 26 in UHCL 1 je negativna. Diferencialno diagnostično je treba upoštevati reaktivni limfadenitis.

Imunoblastni ne-Hodgkinov limfom

Prevladujejo imunoblasti (X 894/1000 celic). V vseh vzorcih so prisotni tudi limfociti. Običajno najdemo tudi prolimfocite, centroцитe, eozinofilne granulocite, retikulumske celice, centroblaste, plazmocitoidne celice in mastocite. Celice ne presegajo velikosti 25 μ. Reakcija na PAS je običajno pozitivna. Pozitivni sta imunološki reakciji LCA in L 26. Diferencialno diagnostično pride v poštev centroblastni ne-Hodgkinov limfom.

Velikocelični Ki1+ ne-Hodgkinov limfom

Celični vzorec je sestavljen iz blastnih celic, limfocitov in eozinofilnih granulocitov. Najdemo tudi prolimfocite in retikulumske celice. Blastne celice so pleomorfne in merijo do 35 μ. KF je v blastnih celicah izrazito pozitivna, blede pozitivni sta tudi reakcija na PAS in E. Imunološka reakcija z LCA je negativna ali blede pozitivna, reakcija s CD 30 pa izrazito pozitivna. Diferencialno diagnostično upoštevajmo histiocitni ne-Hodgkinov limfom, Hodgkinovo bolezen in slabo diferenciran karcinom.

Sklep

Z dobrim poznavanjem morfologije in uporabo citokemičnih in imunoloških reakcij je možno v visokem odstotku postaviti citološko diagnozo ne-Hodgkinovega limfoma in ga tudi uvrstiti po Kielski klasifikaciji. Do podobnih spoznanj smo prišli tudi pri naših predhodnih analizah (2, 13), kar potrjujejo avtorji, ki se posebej ukvarjajo s citodiagnostiko ne-Hodgkinovih limfomov, kot so Oertel (14), Aratake (1), Tani (17, 18) in Sneige (15, 16).

Literatura

1. Aratake Y, Tamura K, Kotani T, Ohtaki S. Application of the avidin-biotin-complex method for the light microscopic analysis of lymphocyte subsets with monoclonal antibodies on air-dried smears. *Acta Cytol* 1988; 32: 117—22.
2. Bizjak-Schwarzbartl M. Citološke karakteristike malignih limfomov ne-Hodgkinovega tipa v vzorcih aspiracijske biopsije bezgavk s tanko iglo. Dipl. delo akad. spec. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1984, 61 str.
3. Bizjak-Schwarzbartl M. Citološke karakteristike centroblastnocentrocitnega limfoma. V: Program i zbornik rezimea. 3. kongres Udruženja kliničkih citologa Jugoslavije, Skopje 1987: 52.
4. Bizjak-Schwarzbartl M, Ruparčič-Oblak L. The value of cytochemical reactions in the classification of non-Hodgkin lymphomas in FNAB samples of the lymph nodes. 11th European congress of pathology, Prague 1987. *Pathol Res Pract* 1987; 182: 468.
5. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphologic characteristics of FNAB specimens from benign lymph node lesions. V: Abstracts. 16th European congress of cytology, Budapest 1988: 37.
6. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphologic characteristics of non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Cytol* 1988; 32: 216—20.
7. Bizjak-Schwarzbartl M. Aspiracijska biopsija s tanko iglo v diagnostiki malignih limfomov ne-Hodgkinovega tipa pri otrocih. V: Zbornik izvelečkov. 7. simpozij JSDHIO (Jugoslovenska sekcija za otroško hematologijo, imunologijo in onkologijo); Bled 1989: 7.
8. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphologic characteristics of non-Hodgkin lymphomas of high grade malignancy in FNAB samples. Abstracts. 12th European congress of pathology, Porto 1989 *Pathol Res Pract* 1989; 185: 19.
9. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphologic characteristics of Kiel positive non-Hodgkin lymphoma. 3rd meeting of the European Association for Hematopathology, Wurzburg 1990: S5—22.
10. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphologic characteristics of Burkitt non-Hodgkin's lymphoma. Rare tumor symposium. Burkitt-like lymphoma in Central Europe. Ljubljana 1990: 17.
11. Bizjak-Schwarzbartl M. Diagnosis and classification of non-Hodgkin's lymphomas in cytologic samples. V: Abstracts. 13th European congress of pathology, Ljubljana 1991. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 659.
12. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphologic characteristics of non-Hodgkin's lymphomas of low-grade malignancy. Abstracts. 19th European congress of cytology, Turku 1991: 43.

13. Bizjak-Schwarzbartl M. Cytomorphological characteristics of centrocytic lymphoma in fine needle aspiration biopsy (FNAB). 6th International meeting of the Adriatic Society of Pathology, Udine 1991. *Il Friuli Medico* 1991; 46: 1, Suppl: 17.
14. Oertel J, Oertel B, Kastner M, Huhn D. The value of immunocytochemical staining of lymph node aspirates in diagnostic cytology. *Br J Haematol* 1988; 79: 307—16.
15. Sneige N. Diagnosis of lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia by immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol* 1990a; 6: 39—43.
16. Sneige N, Dekmezian RH, Katz RL, Fanning TV, Lukeman JL, Ordonez NF, Cabanillas FF. Morphologic and immunocytochemical evaluation of 220 fine needle aspirates of malignant lymphoma and lymphoid hyperplasia. *Acta Cytol* 1990b; 34: 311—22.
17. Tani E, Skoog L. Fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry in the diagnosis of lymphoid lesions of the thyroid gland. *Acta Cytol* 1989a; 33: 48—52.
18. Tani E, Loewhagen T, Nasiell K, Ost A, Skoog L. Fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry of large cell lymphomas expressing the Ki—1 antigen. *Acta Cytol* 1989b; 33: 359—62.