

Charakterystyka proliferacji z dużych ziarnistych limfocytów T

Characteristics of T-cell large granular lymphocyte proliferations

Monika Prochorec-Sobieszek

Pracownia Patomorfologii Zakładu Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej
 Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Proliferacje z dużych ziarnistych limfocytów T (T-LGL, T-cell large granular lymphocytes) uważane są za rozrosty rzadko występujące. Wydaje się, że spowodowane to jest brakiem wiedzy o tej chorobie, która wywołuje niewyjaśnioną neutropenię i limfocytozę oraz towarzyszy chorobom autoimmunologicznym i układu krwiotwórczego. Pojawia się w różnych postaciach: jako przejściowa, odczynowa limfocytoza z poliklonalnych, cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺, jak i przewlekła oligoklonalna lub monoklonalna limfocytoza z T-LGL. Może też odpowiadać objawowej białaczce z T-LGL.

Ze względu na nieliczne i często dotyczące niewielkich grup chorych opracowania na temat proliferacji z T-LGL oraz pojawiające się nierzadko trudności diagnostyczne podjęto własne wielokierunkowe badania kliniczne, histopatologiczne i immunohistochemiczne trepanobiopsji szpiku oraz badania immunofenotypu krwi lub szpiku metodą cytometrii przepływową u 55 chorych z limfocytozą z T-LGL. Wykonano również badania molekularne rearanzacji genów kodujących części zmienne łańcuchów receptora komórek T (TCR, T-cell receptor) i immunoglobulin (IG). Umożliwiły one lepsze poznanie kliniki i patologii tej nierzadko pomijanej w diagnostyce jednostki chorobowej.

Rozrosty z T-LGL występowały u 0,4% badanych w Pracowni Patomorfologii chorych z podejrzeniem limfoproliferacji i/lub cytopenią. Rozpoznanie białaczki T-LGL ustalono u 43 chorych, a u 12 stwierdzono odczynową limfocytozę z T-LGL. Objawy kliniczne takie jak powiększenie śledziony (43% przypadków), nawracające zakażenia głównie dróg oddechowych (26%), osłabienie (19%) i zmiany skórne (12%) obserwowano u 71% chorych na białaczkę T-LGL. U wszystkich chorych stwierdzono przewlekłe cytopenie: neutropenię (93%), leukopenię (33%), niedokrwistość (29%) i małopłytkowość (38%). Chorzy z objawową odczynową limfocytozą z T-LGL charakteryzowali się obrazem klinicznym i nieprawidłowościami w badaniach laboratoryjnych podobnymi do obserwowanych w białaczce, z wyjątkiem niższej limfocytozy z T-LGL ($p = 0,000$) i rzadziej występującej neutropenii ($p = 0,036$).

Ważną cechą białaczki T-LGL były procesy związane z limfocytami B polegające na ich odczynowej aktywacji, pojawieniu się monoklonalności i następnie proliferacji. Wyrazem tego było występowanie chorób autoimmunologicznych u 50% chorych, najczęściej, u 36% chorych

Adres do korespondencji: dr n. med. Monika Prochorec-Sobieszek, Pracownia Patomorfologii Zakładu Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: monika.prochorec@interia.pl

reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), chociaż niekiedy zmiany stawowe odpowiadały nieklasyfikowalnemu zapaleniu (7%). Nieprawidłowości serologiczne (autoprzeciwiata i hiper-gammaglobulinemia poliklonalna) pojawiły się u 71% chorych, zarówno u tych, u których rozpoznano chorobę autoimmunologiczną, jak i bez jej objawów. Grudki chłonne będące morfologicznym wykładnikiem pobudzenia limfocytów B występowały w szpiku w 56% przypadków. U 18% chorych na białaczkę T-LGL rearanzacji genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR towarzyszyły rearanzacje genów kodujących części zmienne łańcuchów lekkich kappa i lambda IG świadczące o monoklonalności limfocytów B. U dwóch chorych rozwinęły się przewlekłe limfoprolifernacje z komórek B (przewlekła białaczka limfocytowa i chłoniak strefy brzeżnej). Związek proliferacji z T-LGL z patologią limfocytów B sugeruje ich wspólną patogenezę polegającą najprawdopodobniej na przewlekłej stymulacji (auto)antygenowej.

Chorzy na białaczkę T-LGL z towarzyszącą chorobą autoimmunologiczną różnili się od chorych na białaczkę T-LGL bez choroby współistniejącej obrazem klinicznym: częstszym występowaniem powiększenia śledziona, leukopenii, ciężkiej neutropenii, autoprzeciwiata, hiper-gammaglobulinemii poliklonalnej oraz mniejszą liczbą T-LGL ($p = 0,000$). Ponad połowa chorych na białaczkę i chorobę autoimmunologiczną nie spełniała ilościowego kryterium rozpoznania dotyczącego liczby T-LGL, co może odpowiadać klonalnej reakcji na chorobę podstawową. Natomiast obraz histopatologiczny szpiku, immunofenotyp limfocytów T i częstość rearanzacji poszczególnych regionów genów TCR były w obu grupach podobne. Zespół Felty'ego stanowił unikalny przykład występowania całego spektrum limfocytozy z T-LGL, od poliklonalnej, poprzez oligoklonalną i monoklonalną, aż do białaczki T-LGL. Najczęściej (80%) występowała monoklonalna limfocytoza. Świadczy to o ciągłości procesu autoimmunologicznego zakończonego rozrostem klonalnym.

Badanie histopatologiczne i immunohistochemiczne szpiku stanowiło ważny element w diagnostyce proliferacji z T-LGL. Charakterystyczne dla białaczki T-LGL były nacieki z limfocytów T o lokalizacji śródmiąższowej z tworzeniem skupień komórek (100% przypadków) i linijne wewnątrzatkowe (64%) o fenotypie: CD3⁺ (100%), CD4⁻ (91%), CD8⁺ (85%), CD57⁺ (85%) i granzym B⁺ (88%). Występowały również odczynowe grudki chłonne (56%) oraz zmniejszona liczba prekursorów granulocytów (53%) z przesunięciem dojrzewania w lewo. Różnice w obrazie histopatologicznym szpiku i ekspresji badanych antygenów u chorych na białaczkę T-LGL i u chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL dotyczyły częstości występowania nacieków linijnych wewnątrzatkowych ($p = 0,000$) i śródmiąższowych skupień z limfocytów T ($p = 0,000$) oraz ekspresji granzymu B ($p = 0,002$). Badania wpływu wybranych parametrów morfologicznych i immunofenotypowych na przebieg kliniczny nie wykazały związku pomiędzy stopniem zajęcia szpiku przez nacieki białaczkowe, typem nacieków białaczkowych (tylko śródmiąższowy v. śródmiąższowy i wewnątrzatkowy), czy też cytolitycznym fenotypem limfocytów T (granzym B⁺ v. granzym B⁻) a występowaniem niedokrwistości, leukopenii, neutropenii, małopłytkowości, objawów ogólnych i nawracających zakażeń. Stwierdzono tylko zależność pomiędzy pojawianiem się grudek chłonnych w szpiku a występowaniem hiper-gammaglobulinemii poliklonalnej.

Badanie metodą cytometrii przepływowej pozwalało na różnicowanie pomiędzy białaczką T-LGL a limfocytozą odczynową. Komórki białaczki T-LGL charakteryzowały się obniżoną ekspresją lub brakiem ekspresji jednego (100%) lub dwóch i więcej (66%) antygenów komórek T: CD5 (81%), CD7 (67%), CD43 (80%), CD2 (19%), CD3 (13%) oraz obecnością tylko jednej izoformy cząsteczki CD45 (CD45RA w 89% przypadków). Zaburzenia te nie występowały na odczynowych T-LGL. Komórki białaczki T-LGL wykazywały zmienną ekspresję antygenów komórek NK: CD16 (89%), CD56 (24%) i CD57 (74%). Antygeny te pojawiały się również na odczynowych T-LGL i nie miały znaczenia w różnicowaniu. Jednak ekspresja CD16 występowała częściej na komórkach białaczkowych ($p = 0,006$). Odrębności fenotypowe komórek białacz-

kowych w postaci ekspresji CD4 (9% chorych), TCR $\gamma\delta$ (31%) lub CD56 (24%) nie miały wpływu na obraz kliniczny choroby. Białaczka T-LGL z ekspresją TCR $\gamma\delta$ charakteryzowała się częstszym niż w postaci klasycznej (TCR $\alpha\beta^+$) występowaniem podwójnie ujemnego fenotypu: CD4⁻/CD8⁻ ($p = 0,007$) i ekspresji CD56 ($p = 0,02$). Monoklonalnej, jak i poliklonalnej limfocytozie z T-LGL CD4⁺ towarzyszyły chłoniaki z małych komórek B, które miały decydujący wpływ na przebieg kliniczny.

U chorych na białaczkę T-LGL najczęściej (71%) pojawiały się rearanżacje genów kodujących części zmienne jednocześnie łańcuchów beta i gamma TCR. Rearanżacje regionów genów kodujących części zmienne łańcucha TCR występowały w sposób przypadkowy, chociaż najczęściej (82% chorych) ulegał rearanżacji region V γ J γ , V γ ₁₀-J γ . W około 1/3 przypadków występowały biklonalne lub bialleliczne produkty rearanżacji genów TCR. W badaniach kariotypu nie stwierdzono zmian cytogenetycznych.

U większości chorych białaczka T-LGL miała łagodny przebieg. W okresie średnio 17-miesięcznej obserwacji 10% chorych zmarło, głównie w wyniku powikłań infekcyjnych związanych z neutropenią. Całkowitą lub częściową odpowiedź na leczenie udało się osiągnąć u 61% chorych. Dobre wyniki uzyskano po leczeniu cyklosporyną A: całkowitą odpowiedź hematologiczną u 1/9 chorych i częściową odpowiedź u 8/9 chorych oraz metotreksatem: częściową odpowiedź u 5/8 chorych. Leki stosowano w monoterapii lub łącznie z prednizonem i/lub czynnikiem stymulacyjnym kolonii granulocytowych.

Klinicznie i biologicznie białaczka T-LGL znajduje się na pograniczu procesów odczynowych i nowotworowych. Wskazuje na to jej łagodny przebieg nieprzypominający chorób nowotworowych i brak specyficznych dla tych chorób zaburzeń cytogenetycznych, przy jednocześnie potwierdzonej klonalności i inwazyjności wyrażającej się zajęciem narządów. Częste współistnienie z różnymi chorobami, głównie autoimmunologicznymi i układu krwiotwórczego, których objawy mogą być dominujące w obrazie klinicznym przy jednocześnie niewielkim i słabo widocznym zajęciu narządów przez nacieki białaczkowe, powoduje, że jednostka ta może być łatwo przeoczona lub niewzięta pod uwagę w rozważaniach diagnostycznych. Związek tej białaczki z licznymi chorobami sugeruje, że monoklonalna limfocytoza z T-LGL, niekiedy niespełniająca diagnostycznych kryteriów ilościowych białaczki, może być klonalną reakcją na chorobę podstawową. Dlatego też rozpoznanie białaczki T-LGL nie powinno opierać się tylko na jednym rodzaju badań. Badania histopatologiczne i cytometryczne wykazują cechy specyficzne dla tej choroby, ale rozpoznanie wymaga potwierdzenia obecności rearanżacji genów TCR. Z kolei same badania molekularne potwierdzające klonalność, przy ich dużej czułości, mogą ujawniać istnienie populacji monoklonalnych komórek, które nie spełniają kryteriów diagnostycznych białaczki T-LGL. Decydujące dla rozpoczęcia leczenia lekami immunosupresyjnymi są objawy kliniczne, które mogą pojawić się zarówno w białaczce, jak i w odczynowej limfocytozie z T-LGL.

Słowa kluczowe: białaczka z dużych ziarnistych limfocytów T, histopatologia, immunofenotyp, rearanżacje genów receptora komórek T, klonalna heterogenność, choroby autoimmunologiczne

Summary

T-cell large granular lymphocyte (T-LGL) proliferations are considered rare probably due to the lack of knowledge about this disorder as the cause of unexplained neutropenia and lymphocytosis, associated with autoimmune and hematological diseases. These proliferations may occur either as transient, reactive expansion of polyclonal CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes or chronic oligoclonal or monoclonal T-LGL lymphocytosis. They may also fit the criteria of clinically overt T-LGL leukemia.

Since publications on T-LGL proliferations are rather infrequent and often involve small groups of patients, while diagnostic problems are quite frequent, personal studies were undertaken. The aim was a multidirectional clinical, histopathological and immunohistochemical trephine biopsy studies as well as flow cytometry of peripheral blood and bone marrow of 55 patients with T-LGL lymphocytosis. The bone marrow samples were also evaluated for T-cell receptor (TCR) and immunoglobulin (IG) variable genes rearrangements. All this contributed to better knowledge of the clinical presentation and pathology of this often overlooked disease.

T-LGL proliferations occurred in 0.4% of patients evaluated in Department of Pathomorphology with suspicion of lymphoproliferations and/or cytopenia. T-LGL leukemia was recognized in 43 cases, 12 patients had reactive T-LGL lymphocytosis. The following clinical symptoms were observed in 71% of T-LGL leukemia patients: splenomegaly (in 43% of cases), recurrent infections mainly of respiratory tract (26%), fatigue (19%) and skin lesions (12%). All patients presented with chronic cytopenias: neutropenia (93%), leucopenia (33%), anemia (29%) and thrombocytopenia (38%). Patients with symptomatic reactive T-LGL lymphocytosis had similar clinical features and abnormalities in laboratory results to T-LGL leukemia patients except for lower T-LGL lymphocytosis ($p = 0.000$) and less frequent neutropenia ($p = 0.036$).

An important feature of T-LGL leukemia were B-cell processes with reactive activation, clonal evolution and proliferation. Autoimmune diseases were present in 50% of T-LGL leukemia patients, most often rheumatoid arthritis (RA) in 36% of cases; some (7%) corresponding to unclassified arthritis. Serological abnormalities (autoantibodies and polyclonal hypergammaglobulinemia) were observed in 71% of patients, both with diagnosed autoimmune disease or asymptomatic. Lymphoid nodules as a morphological parameter of B cell activation were present in bone marrow in 56% of cases. Moreover, 18% of patients demonstrated both TCR and IG kappa and lambda variable genes rearrangements characteristic for monoclonal B cells. Chronic B cell lymphoproliferations developed in 2 patients (chronic lymphocytic leukemia and marginal zone lymphoma). The association of T-LGL proliferations with B-cell pathology suggests their common pathogenesis most probably depending on chronic (auto)antigenic stimulation.

Patients with T-LGL leukemia and associated autoimmune disease displayed more often splenomegaly, leucopenia, severe neutropenia, higher incidence of autoantibodies, polyclonal hypergammaglobulinemia and lower count of T-LGL ($p = 0.000$) than T-LGL patients without associated disease. More than half of T-LGL leukemia and autoimmune disease patients did not fulfill the quantitative diagnostic criteria concerning the number of T-LGL, which suggests a clonal reaction to the underlying disease. However, the histopathological pattern of bone marrow infiltration, T-cell immunophenotype and frequency of rearrangements of individual regions of TCR genes were similar in both groups. Felty's syndrome displayed a spectrum of T-LGL proliferations from reactive, polyclonal through oligoclonal and monoclonal to T-LGL leukemia. Monoclonal lymphocytosis was most frequently observed (80%). It indicates that ongoing autoimmune process may terminate in clonal proliferation.

Histopathological and immunohistochemical evaluation of bone marrow biopsies was of important value in T-LGL proliferations diagnosis. Characteristic for T-LGL leukemia were infiltrations of T lymphocytes forming interstitial clusters (100% of cases) or in intravascular linear location (64%) expressing CD3⁺ (100%), CD4⁺ (91%), CD8⁺ (85%), CD57⁺ (85%), granzym B⁺ (88%). Reactive lymphoid nodules (56%) and lowered granulocyte precursors with left-shifted maturation (53%) were also present. Histopathological pattern and immunophenotype of bone marrow infiltration in T-LGL leukemia patients differ from patients with reactive T-LGL lymphocytosis by frequency of linear intravascular ($p = 0.000$) and interstitial with cluster formation ($p = 0.000$) infiltrations of T cells, and granzyme B expression ($p = 0.002$). The effect of selected morphological and immunophenotypical parameters on the clinical course of the disease was also investigated. No correlation was observed between the extent of bone

marrow infiltration with T-LGL leukemia cells, pattern of bone marrow infiltration (interstitial alone v. interstitial and intravascular), cytolytic T-cell phenotype (granzyme B⁺ v. granzyme B⁻) and the presence of anemia, leucopenia, neutropenia, thrombocytopenia, constitutional symptoms and recurrent infections. Only correlation between the presence of lymphoid nodules in the bone marrow and polyclonal hypergammaglobulinemia was noted.

Assessing phenotypic aberrancies by flow cytometry allowed to distinguish reactive from leukemic T-LGL populations. T-LGL leukemia cells demonstrated abnormalities (dim or negative) of one (100%) or two and more (66%) T-cell antigens: CD5 (81%), CD7 (67%), CD43 (80%), CD2 (19%), CD3 (13%) and the presence of one of the isoforms of CD45 molecule (CD45RA in 89% of cases). These abnormalities did not occur in reactive T-LGL. T-LGL leukemic cells showed varied expression of natural killer cells antigens such as CD16 (89%), CD56 (24%) and CD57 (74%). These antigens also appeared on reactive T-LGL, so they were of no importance for differentiation. However, CD16 expression was more frequent on leukemic cells ($p=0.006$). Immunophenotypic variants of T-LGL leukemia with CD4 (9% of patients), TCR $\gamma\delta$ (31%) or CD56 (24%) expression had no impact on the clinical presentation of the disease. For T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ leukemia, the frequency of double negative CD4⁻/CD8⁻ phenotype ($p = 0.007$) and CD56 expression ($p = 0.02$) was higher as compared to common TCR $\alpha\beta^+$ leukemia. Monoclonal as well as polyclonal T-LGL CD4⁺ lymphocytosis was associated with small B-cell lymphomas, which determined the clinical course of the disease.

Most frequently, 71% T-LGL leukemia patients revealed simultaneous rearrangements of TCRB and TCRG genes. The rearrangements occurred at a random pattern with V γ I μ , V γ 10-J γ region most frequently rearranged (82% of cases). In about 1/3 of cases, biclonal or biallelic TCR genes rearrangements were present. Classic cytogenetic tests showed normal karyotypes.

During 17 months of follow-up the disease remained indolent in the majority of T-LGL leukemia patients. Ten percent of patients died, mainly due to infections related to T-LGL leukemia-associated neutropenia. The overall response rate to therapy was 61%. Good response was for cyclosporine A with a complete hematologic remission in 1/9 cases, partial response (PR) in 8/9 cases as well as for methotrexate (PR in 5/8 patients). Both were administered either in monotherapy or in combination with prednisone and/or granulocyte-colony stimulating factor.

Clinically and biologically T-LGL leukemia is at the border of reactive and neoplastic processes. The disease is indolent, unlike neoplastic diseases and with no cytogenetic abnormalities specific for such diseases, but with confirmed clonality and invasion expressed by organ infiltration. T-LGL leukemia may be easily overlooked or not considered due to only minimal involvement of organs or the presence of a variety of other disorders, mainly autoimmune and hematologic, with their symptoms dominating in the clinical picture. The association of this type of leukemia with numerous diseases suggests that T-LGL monoclonal lymphocytosis, which sometimes does not fulfill the quantitative criteria for leukemia, may be a clonal reaction to the underlying disease. Thus, T-LGL leukemia diagnosis should not be based on one type of testing only. Histopathological and cytometric studies reveal certain disease-specific features, but TCR genes rearrangements need to be confirmed. On the other hand, the high sensitivity of molecular biology tests may reveal populations of monoclonal cells that do not meet the diagnostic criteria for T-LGL leukemia. The appearance of clinical symptoms observed both in leukemia and reactive T-LGL lymphocytosis is crucial for the starting treatment.

Key words: T-cell large granular lymphocyte leukemia, histopathology, immunophenotype, rearrangements of T-cell receptor genes, clonal heterogeneity, autoimmune disorders

1. Wstęp

Proliferacje z dużych ziarnistych limfocytów (LGL, *large granular lymphocytes*) wywodzą się głównie z dojrzałych, pobudzonych antygenowo, cytotoksycznych limfocytów T oraz rzadziej z komórek naturalnej cytotoksyczności (NK, *natural killers*) [1]. Limfocytoza z dużych ziarnistych limfocytów T (T-LGL, *T-cell large granular lymphocytes*) pojawia się w różnych chorobach, w patogenezie których występuje prawidłowa lub zaburzona stymulacja antygenowa, takich jak: zakażenia wirusowe, choroby autoimmunologiczne, stany po przeszczepieniu narządów; może mieć również charakter nowotworowy [1]. Stąd też jej heterogenność klonalna, od odczynowej-poliklonalnej, poprzez oligoklonalną i monoklonalną, do wymagającej leczenia objawowej białaczki [2].

W 1975 roku Brouet i wsp. [3] po raz pierwszy opisali zespół przewlekłej limfocytozy z dużych ziarnistych limfocytów, który określili terminem przewlekłej białaczki limfocytowej T-komórkowej. W 1977 roku przewlekła limfocytoza z T-LGL z towarzyszącą neutropenią została wyodrębniona jako oddzielna jednostka kliniczna przez McKennę i wsp. [4]. Termin białaczka z dużych ziarnistych limfocytów T (T-LGL, *T-cell large granular lymphocyte leukemia*) zaproponował w 1985 roku Loughran i wsp. [5], wskazując na monoklonalny charakter rozrostu z cytotoksycznych limfocytów T, jego inwazyjność wyrażającą się zajęciem szpiku, śledziony i wątroby oraz występowanie nieprawidłowości cytogenetycznych. W nowej klasyfikacji Nowotworów Układu Krwiotwórczego i Chłonnego Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) [6] białaczka T-LGL jest opisana jako oddzielna jednostka histo-kliniczna. Białaczka T-LGL jest rzadko występującą chorobą, stanowi jedynie 2–3% białaczek z małych limfocytów [6]. Do 2003 roku opublikowano około 400 takich przypadków [7]. Mimo że od jej opisanie minęło już 30 lat, ciągle wydaje się chorobą niedodiagnozowaną [8].

Białaczka T-LGL rozwija się najczęściej u osób starszych, średni wiek w chwili rozpoznania wynosi 55–60 lat, chociaż może pojawić się w każdym wieku, nawet u dzieci. Z tą samą częstością występuje u kobiet i mężczyzn. U większości chorych charakteryzuje się łagodnym i przewlekłym przebiegiem klinicznym [7, 9, 10], chociaż zdarzają się nieliczne przypadki o agresywnym przebiegu [11, 12]. Średni czas przeżycia wynosi więcej niż 10 lat [13]. Najbardziej typowy obraz kliniczny białaczki T-LGL to niewielka limfocytoza i często ciężka neutropenia, prowadząca do powstawania nawracających

zakażeń, głównie dróg oddechowych, co jest zwykle powodem rozpoczęcia leczenia przyczynowego u tych chorych [9, 10, 13, 14].

U około 1/3 chorych białaczka T-LGL przebiega bezobjawowo, stwierdza się u nich jedynie zmiany w morfologii krwi. U pozostałych chorych może pojawić się uczucie zmęczenia, gorączka będąca następstwem zakażeń i spadek wagi ciała. Powiększenie śledziony spotyka się dość często (20–50% przypadków), rzadziej powiększenie wątroby (< 20%) oraz sporadycznie powiększenie węzłów chłonnych. Do objawów laboratoryjnych choroby należą cytoopenie: leukopenia, niedokrwistość i małopłytkowość, które mogą pojawiać się w różnych jej okresach [7, 9, 10, 13]. Ze względu na towarzyszące białaczce T-LGL choroby autoimmunologiczne i układu krwiotwórczego podłoże cytoopenii może być wieloczynnikowe [9]. Zaobserwowano, że u kobiet z białaczką T-LGL ciąża może wpływać korzystnie na neutropenię [15].

Komórki białaczkowe wywodzą się z dużych ziarnistych limfocytów, które w warunkach prawidłowych stanowią około 10–15% limfocytów krwi obwodowej ($0,1-0,3 \times 10^9/l$). Są to średniej wielkości lub duże komórki charakteryzujące się obfitą obojętnochłonną cytoplazmą z rozproszonymi azurochłonnymi ziarnistościami oraz niewielkim, okrągłym jądrem ze skondensowaną chromatyną [16]. W prawidłowej krwi obwodowej większość LGL stanowią komórki NK ($CD3^+CD8^+$), mniej liczne są cytotoksyczne limfocyty T ($CD3^+CD8^+$) [1]. Jednak 85% białaczek z LGL powstaje z cytotoksycznych limfocytów T i one są przedmiotem tego opracowania [17]. Na podstawie cech cytomorfologicznych niemożliwe jest odróżnienie odczynowych od nowotworowych LGL [16]. Zgodnie z klasyfikacją WHO [6] kryterium rozpoznania białaczki T-LGL to trwająca co najmniej 6 miesięcy monoklonalna limfocytoza z T-LGL $> 2 \times 10^9/l$.

Mimo znacznego postępu wiedzy rozpoznanie białaczki T-LGL stanowi nadal nietatwe zadanie diagnostyczne. Przyczyną tego jest rzadkość występowania rozrostów z T-LGL, czasami niewielka liczba T-LGL we krwi obwodowej oraz podobieństwo morfologiczne dużych ziarnistych limfocytów do prekursorów granulocytów i monocytów w rozmazach szpiku. Ponadto, nie wszystkie T-LGL mają typową morfologię i mogą nie zawierać ziarnistości, wtedy można je zidentyfikować jedynie za pomocą badań immunofenotypowych. Słabo widoczny i subtelny typ naciekania szpiku w trepanobiopsjach praktycznie uniemożliwia rozpoznanie w rutynowych barwieniach hematoksyliną i eozyną (HE). Utrudnieniem jest również brak ogólnie dostępnych

markerów określających klonalność komórek T, a także występowanie limfocytozy z T-LGL w przebiegu procesów odczynowych [1, 9, 17].

W przeciwieństwie do innych chorób limfoproliferacyjnych (głównie z komórek B), gdzie zmiany w szpiku są dość specyficzne i dokładnie opisane, istnieje jedynie kilka publikacji poświęconych utkaniu histopatologicznemu szpiku w białaczce T-LGL [13, 18–22]. W pracach z 1989 [18] i 1994 [13] roku zajęcie szpiku określano jako rozlane lub śródmiąższowe i ze względu na to, że nacieki były słabo widoczne w rutynowych barwieniach, znajdowano je jedynie u 25% badanych chorych. Możliwość wykonywania badań immunohistochemicznych na skrawkach parafinowych znacznie poprawiła rozpoznawalność tej białaczki [20]. Prace z ostatnich lat koncentrowały się na określeniu architektoniki zajęcia szpiku z charakterystycznymi śródmiąższowymi naciekami z tworzeniem skupień komórek oraz linijnymi naciekami wewnątrzzatokowymi, a także częstym występowaniu odczynowych grudek chłonnych [21, 22].

Białaczkowe T-LGL posiadają wiele cech pobudzonych antygenowo, cytotoksycznych komórek T i w badaniach immunohistochemicznych trepanobiopsji szpiku wykazują najczęściej ekspresję CD3 i CD8 oraz zawierają w cytoplazmie cytotoksyczne ziarnistości barwiące się granzymem B, TIA-1 (*T-cell intracellular antigen-1*) i perforyną [21, 22]. Odczyn z CD57 jest zmienny [21]. Antygen CD57 charakteryzuje efektorowe komórki T CD8⁺, w związku z tym w większości przypadków komórki białaczkowe mają cechy limfocytów efektorowych, w innych, bez ekspresji CD57 komórek pamięci [23, 24]. Zwykle obserwuje się brak antygenu CD4, choć może on występować w rzadkich podtypach białaczki: CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺ [25]. Opisywane są również białaczki z podwójnie ujemnym fenotypem: CD4⁻/CD8⁻ [26]. Ekspresja CD56 może pojawić się w części przypadków [27]. Gentile i wsp. [12] zasugerowali, że białaczka T-LGL z koekspresją CD56 charakteryzuje się bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym. Większość przypadków białaczki T-LGL wykazuje ekspresję receptora komórek T (TCR, *T-cell receptor*) $\alpha\beta$ ⁺, co można ujawnić za pomocą barwienia z przeciwciałem β F1 [27]. Opisano również rzadki podtyp białaczki TCR $\gamma\delta$ ⁺, który stanowi około 5% białaczek T-LGL [26]. W 2007 roku stwierdzono w białaczce T-LGL występowanie ekspresji granzymu M, nowego białka cytotoksycznego typowego dla komórek NK i cytotoksycznych dziewiczych limfocytów T [28].

Zmiany histopatologiczne w śledzionie u chorych na białaczkę T-LGL charakteryzują się wystę-

powaniem nacieków z limfocytów T w sinusoidach miazgi czerwonej. Identyfikacja tych nacieków wymaga zastosowania barwień immunohistochemicznych. W miazdze białej śledziony obserwowano wzrost grudek chłonnych z ośrodkami rozmnażania, a niekiedy jej zanik [29]. W węzłach chłonnych nacieki białaczkowe zlokalizowane są w zatokach i strefie międzygrudkowej, natomiast w wątrobie w zatokach i w postaci skupień w przestrzeniach wrotno-żółciowych [27].

Badania krwi i szpiku metodą cytometrii przepływowej (FCM, *flow cytometry*) pozwalają na wykazanie zaburzeń w ekspresji antygenów komórek białaczki T-LGL [30, 31]. Prawidłowe duże ziarniste limfocyty T są komórkami T CD8⁺ o fenotypie: CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD5⁺, CD7⁺, CD16⁻, CD56⁻, CD57^{+/-} [32]. Lundell i wsp. [31] wykazali, że 80% komórek białaczki T-LGL posiada nieprawidłową ekspresję (obniżoną lub ujemną) antygenów komórek T, najczęściej CD5 i CD7, chociaż zdarza się również ekspresja typu *bright* [30, 33]. Rzadziej obserwuje się obniżoną ekspresję CD2 i CD3 oraz innych antygenów komórek T [31]. Występowanie antygenów komórek NK: CD16 (w około 80% przypadków), CD57 (prawie w 100% przypadków) i rzadziej CD56 jest charakterystyczne dla komórek białaczki, chociaż spotyka się je również w podtypie prawidłowych limfocytów cytotoksycznych, tj. komórkach typu NK [34]. Zaburzona jest także ekspresja CD94 i innych receptorów dla antygenów głównego układu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex*) I klasy [31]. Występowanie antygenu CD26 uważane jest za niekorzystny czynnik rokowniczy [35].

Innym istotnym elementem w diagnostyce cytometrycznej białaczki T-LGL są badania receptorów immunoglobulinopodobnych (KIR, *killer cell immunoglobulin-like receptors*), które biorą udział w procesach rozpoznawania antygenów MCH I klasy i własnej tolerancji na antygen. Występują one na komórkach T i NK, należą do nadrodziny immunoglobulin i są kodowane przez pojedynczy gen zlokalizowany na chromosomie 19p13.4. W komórkach białaczki T-LGL obserwowana jest nieprawidłowa, jednakowa ekspresja pojedynczych antygenów KIR lub całkowity brak tej ekspresji [36].

Wykazanie monoklonalności jest ważnym elementem diagnostycznym w rozpoznaniu białaczki T-LGL [37]. Ontogeneza limfocytów T związana jest z rearanżacją genów kodujących receptor *TCR* i powstaniem specyficznych populacji limfocytów T charakteryzujących się unikalną molekularną sekwencją nukleotydów. Receptor TCR jest błonowym heterodimerem składającym się z dwóch

łańcuchów polipeptydowych α/β lub γ/δ [38]. Podczas rozwoju limfocytów T rearanżacja genów *VDJ* kodujących łańcuchy α/β i genów *VJ* kodujących łańcuchy γ/δ TCR zapewnia różnorodność molekularną tych komórek [38, 39]. Ponadto dodanie lub usunięcie nukleotydów w regionach łączących geny *V(D)J* oraz przypadkowe kombinacje genów *TCRB*, *TCRG*, *TCRD* zwiększają różnorodność receptora TCR. Ocenia się, że w wyniku tych mechanizmów powstaje 10^{18} unikalnych receptorów TCR [40]. W rozwoju limfocytów TCR $\gamma\delta$ najpierw występują rearanżacje z udziałem *TCRD*, a potem *TCRG*. Podobnie w przypadku limfocytów TCR $\alpha\beta$ geny *TCRB* ulegają rearanżacji przed *TCRA* [41].

Rozrost monoklonalny polega na nadmiernej proliferacji jednej populacji komórek ze specyficznym i jednakowo zrearanżowanym receptorem TCR [42, 43]. Do wykrywania klonalności limfocytów wskazane jest badanie genów *TCRG* i *TCRB*, ponieważ rearanżacje z ich udziałem mogą być obecne nie tylko w limfocytach TCR $\gamma\delta$, ale także w TCR $\alpha\beta$ jako niefunkcjonalne rearanżacje [44, 45].

Rearanżacje genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR potwierdzające klonalność limfocytów T wykrywa się najczęściej metodą Southern blot i reakcją łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) [1]. Technika Southern blot, uważana do niedawna za złoty standard, jest czasochłonna i wymaga znacznej ilości dobrej jakości DNA. Multipleksowa metoda PCR charakteryzuje się dużą czułością i wymaga niewielkiej ilości DNA, który można uzyskać nawet z materiału utrwalonego i zatopionego w parafinie. Alternatywną metodą jest cytometria przepływowa z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych rozpoznających fragmenty łańcuchów β regionów zmiennych receptora TCR. Wykazanie przeważającej obecności jednego z fragmentów łańcuchów świadczy o monoklonalności limfocytów T. Jest to jednak mniej czuła metoda określania klonalności limfocytów T [46].

Przy użyciu opisanych powyżej czułych metod biologii molekularnej można wykryć nawet niewielką liczbę komórek monoklonalnych, które wcale nie muszą spełniać kryteriów diagnostycznych białaczki T-LGL. Opisano przypadki graniczne z oligoklonalną limfocytozą o wartościach od 0,5 do $2 \times 10^9/l$, w których pojawiała się zmienna liczba komórek monoklonalnych. Taka oligoklonalna/monoklonalna limfocytoza z T-LGL może występować w przebiegu prawidłowych i patologicznych odpowiedzi immunologicznych [47–65] (tab. 1.1).

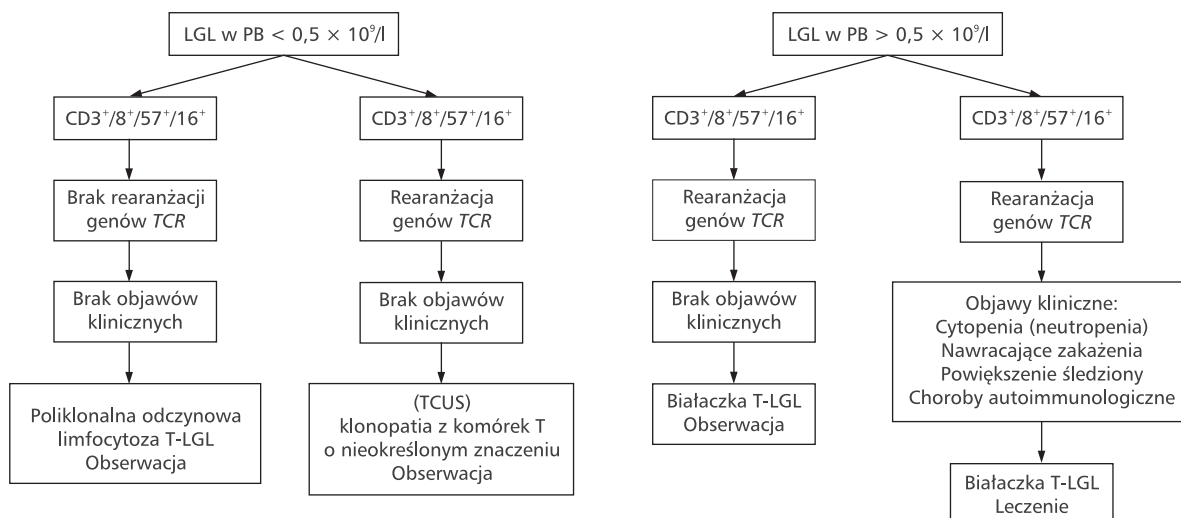
Niejasne jest znaczenie kliniczne takiej odczynowej limfocytozy, ponieważ chorzy są zwykle bezobjawowi. Uważa się, że w części przypadków może

Tabela 1.1. Stany kliniczne związane z odczynową oligoklonalną/monoklonalną limfocytozą z T-LGL

Reakcje immunologiczne u zdrowych osób w podeszłym wieku
Immunosupresja
Choroby autoimmunologiczne:
reumatoidalne zapalenie stawów
autoimmunologiczne zapalenie tarczycy
pierwotna marskość żółciowa wątroby
twardzina
Zakażenia wirusowe:
EBV
HIV
CMV
wirus odry
Zespoły mielodysplastyczne
Rozrosty nowotworowe
Stany po allogenicznym przeszczepach komórek krwiotwórczych
Stany po przeszczepach narządowych
Stan po splenektomii

EBV (*Epstein-Barr virus*) — wirus Ebsteina-Barr; HIV (*human immunodeficiency virus*) — ludzki wirus upośledzonej odporności; CMV (*cytomegalovirus*) — wirus cytomegalii

ona stanowić fazę wstępną dla rozwoju białaczki T-LGL. Dhodapkar i wsp. [13] zaproponowali dla tego stanu określenie „klonopatia z komórek T o nieokreślonym znaczeniu” (*TCUS, T-cell clonopathy of undetermined significance*) jako analogię do „monoklonalnej gammopatii o nieokreślonym znaczeniu”. Pomimo stwierdzenia w tych przypadkach monoklonalnej rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR, liczba monoklonalnych T-LGL może być niewielka i wtedy trudno jest zidentyfikować w badaniach histopatologicznych i cytometrii przepływowej fenotypowo diagnostyczną dla rozrostów nowotworowych populację komórek [21]. Trzeba podkreślić, że samo wykazanie klonalności, które jest kluczowym elementem w diagnostyce procesu nowotworowego, jest niewystarczające dla rozpoznania białaczki T-LGL. Niezbędne do ustalenia rozpoznania są wielokierunkowe badania histopatologiczne, immunofenotypowe i molekularne łącznie z danymi klinicznymi [1]. Nie mniej jednak Lamy i Loughran [7] podkreślają, że granica pomiędzy białaczką T-LGL a odczynową klonalną limfocytozą jest trudna do zdefiniowania. Co więcej, przebieg kliniczny i zmiany hematologiczne w tej postaci białaczki odbiegają znacznie od występujących w procesach złośliwych. Na ogół nie obserwuje się postępującego rozrostu komórek



Rycina 1.1. Algorytm diagnostyczny w białaczce T-LGL [1]. PB (*peripheral blood*) — krew obwodowa; TCR (*T-cell receptor*) — receptor komórek T; TCUS (*T-cell clonopathy of undetermined significance*) — klonopatia z komórek T o nieokreślonym znaczeniu; T-LGL (*T-cell large granular lymphocytes*) — duże ziarniste limfocyty T

nowotworowych ani progresji w postaci bardziej agresywne, a komórki białaczkowe są dobrze zróżnicowane i przypominają prawidłowe, pobudzone antygenowo, efektorowe limfocyty T CD8⁺/CD57⁺ [7].

Oprócz rozrostów monoklonalnych i oligoklonalnych może występować poliklonalna, odczynowa, przejściowa limfocytoza z T-LGL, w której brak jest monoklonalnych rearanzacji genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR. Liczba dużych ziarnistych limfocytów we krwi obwodowej jest mniejsza niż $0,5 \times 10^9/l$. Opisano ją w przebiegu ostrych zakażeń, chorób autoimmunologicznych oraz powszechnego zmiennego niedoboru odporności (CVID, *common variable immunodeficiency*) [66–68].

Rycina 1.1 przedstawia prosty algorytm rozpoznawania białaczki T-LGL. Opiera się on na następujących kryteriach: liczbie T-LGL we krwi obwodowej (PB, *peripheral blood*), charakterystycznym fenotypie T-LGL, określeniu ich klonalności i objawach klinicznych towarzyszących limfocytozie z T-LGL.

Zmiany cytogenetyczne wykrywane metodami klasycznej cytogenetyki są wyjątkowo rzadkie u chorych na białaczkę T-LGL, opisano jedynie około 20 takich przypadków [69]. Polegały one na inwersji chromosomu 7(p15q22) i 14(q11q32) (obie aberracje dotyczyły *locus* genu receptora TCR) oraz delecji w obrębie chromosomu 6 i 5q. Inne opisane nieprawidłowości to trisomia chromosomu 3, 8 i 14 oraz t(11;12) [5, 69, 70]. Nie wyodrębniono do tej pory genetycznego „markera” dla tej białaczki.

Wykonane przez Kothapalli i wsp. [71] badania mikromacierzy wykazały, że w białaczce T-LGL

występuje nadmierna ekspresja wielu genów kodujących proteazy związane z funkcją cytotoksyczną limfocytów: granzymów (A, B, H, K), katepsyn (C i W), perforyny, kaspazy-8 i kalpajny.

Patogeneza białaczki T-LGL nie jest do końca poznana. Epling-Burnette i wsp. [72] oraz Zambello i wsp. [73] sugerują, że przewlekła stymulacja autoantygenami lub antygenami wirusowymi jest czynnikiem inicjującym rozrost T-LGL. Według O’Keefe i wsp. [74] oraz Włodarskiego i wsp. [75] początkowo poliklonalna lub oligoklonalna proliferacja może doprowadzić do rozrostu jednego klonu komórkowego, czyli monoklonalnej transformacji. Nie wiadomo, czy potrzebny jest drugi czynnik molekularny do powstania w pełni nowotworowego rozrostu. Cytowani powyżej autorzy uważają, że białaczka T-LGL może być chorobą autoimmunologiczną wywołaną przez przewlekłą stymulację antygenową, która doprowadza do rozrostu tylko jednego klonu cytotoksycznych limfocytów T. Współistnienie białaczki T-LGL z licznymi chorobami autoimmunologicznymi może potwierdzać tę hipotezę [76]. W opublikowanej w 2008 roku pracy Włodarski i wsp. [77] wykazali różnice w ekspresji genów pomiędzy komórkami białaczki T-LGL i prawidłowymi limfocytami cytotoksycznymi. Dotyczyło to nieprawidłowej ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną na antygen i zakażenie wirusowe, co jest kolejnym dowodem na udział tych czynników w patogenezie choroby.

Chociaż w białaczce T-LGL nie wyodrębniono DNA ani RNA wirusa powodującego klonalną trans-

formację, na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że ludzki wirus limfotropowy (HTLV-I, *Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus Type I*) lub inny limfotropowy retrowirus lub herpeswirusy γ mogą mieć udział w jej patogenezie [78, 79]. Badania serologiczne Loughrana i wsp. [79] wykazały u chorych na białaczkę T-LGL obecność przeciwciał skierowanych przeciwko białku env p21e wirusa HTLV-I (a szczególnie jego epitopowi BA21), co sugeruje, że białko komórkowe lub wirusowe wykazujące homologię z BA21 może odgrywać ważną rolę w patogenezie tej choroby.

Wyniki badań ostatnich lat dowodzą, że sygnały wewnątrzkomórkowe indukowane przez receptor TCR mogą mieć znaczenie w rozwoju tej białaczki [75]. Zgodnie z badaniami Włodarskiego i wsp. [75] proliferacja cytotoksycznych limfocytów T wywołana działaniem nieznanego dotychczas antygeny może poprzedzać pojawienie się czynników onkogennych odpowiedzialnych za zaburzenia wzrostu i apoptozy, prowadzące do nowotworowej transformacji i rozwoju białaczki T-LGL. Jednak poszukiwania potencjalnego antygeny odpowiedzialnego za rozwój monoklonalnej proliferacji T-LGL przez analizę sekwencji nukleotydów regionu CDR3 (*complementarity-determining region 3*) łańcuchów β genu *TCR* odpowiedzialnego za wiązanie antygeny, przyniosły sprzeczne wyniki. Przeprowadzone przez O'Keefe i wsp. [74] i Davey i wsp. [80] badania sekwencji nukleotydowych w regionie CDR3 w białaczce T-LGL nie wykazały widocznych podobieństw klonotypów. Natomiast Sandberg i wsp. [26] zaobserwowali, że w połowie przypadków białaczki T-LGL $TCR\gamma\delta^+$ monoklonalne komórki T wykazywały ten sam immunofenotyp ($TCR-V\gamma9/V\delta2$) i posiadały podobne sekwencje nukleotydów w regionie $V\delta2-J\delta1$. Również przeprowadzona przez Garrido i wsp. [81] analiza chorych z monoklonalną limfocytosą $TCR\alpha\beta^+/CD4^+$ wykazała, że komórki $TCR-V\beta13.1^+/CD4^+$ posiadają taki sam haplotyp HLA-DRB1*0701 i wykazują podobne sekwencje nukleotydowe w rejonie CDR3 genu *TCRB*, co sugeruje działanie podobnego antygeny.

Wydaje się, że wśród wielu różnych czynników, w patogenezie białaczki T-LGL odgrywają również ważną rolę zaburzenia w ścieżce sygnałowej Fas/Fas ligand prowadzące do zaburzeń apoptozy. Wiadomo, że w prawidłowo przebiegającej odpowiedzi immunologicznej stymulacja antygenowa powoduje poliklonalny rozrost komórek T $CD8^+$, a następnie ich różnicowanie w komórki efektorowe zwane cytotoksycznymi. W kolejnym etapie specyficzne antygenowo efektorowe cytotoksyczne limfocyty T są stopniowo usuwane w mechanizmie apoptozy związanej

z Fas, a pozostają tylko nieliczne komórki pamięci [82]. Hipotetycznie zakłada się, że zakłócenia w fizjologicznej odpowiedzi na antygen mogą spowodować przetrwałą klonalną ekspansję komórek cytotoksycznych i wywołać autoimmunologiczną lub nowotworową proliferację T-LGL [77]. Klonalna proliferacja cytotoksycznych limfocytów T w białaczce T-LGL reprezentuje patologiczny odpowiednik rozrastających się cytotoksycznych limfocytów efektorowych [83]. W przeciwieństwie do prawidłowych limfocytów cytotoksycznych komórki białaczki T-LGL są odporne na apoptozę związaną z Fas, pomimo wysokiej ekspresji Fas i jego ligandu na powierzchni komórek białaczkowych [84]. Mechanizmy oporności na apoptozę są nadal niejasne. Być może wysokie poziomy rozpuszczalnego Fas, które obecne są również w surowicy u chorych z białaczką T-LGL, blokują apoptozę komórek białaczki związanej z Fas i przyczyniają się do rozwoju limfoproliferacji [85]. Wykazano związek pomiędzy poziomem ligandu Fas w surowicy i aktywnością choroby oraz normalizację jego poziomu po leczeniu [86]. Badania metodą mikromacierzy z 2008 roku [87] również wskazują na zaburzenia ekspresji wielu genów związanych z apoptozą. Zachwiana jest równowaga pomiędzy pro- i antyapoptotycznymi ścieżkami sygnałowymi związanymi ze sfingolipidami [87].

Epling-Burnette i wsp. [72, 88] zaproponowali teorię o zaburzonej funkcji czynników transkrypcyjnych w ścieżkach sygnałowych apoptozy w białaczce T-LGL. Komórki białaczki T-LGL znajdują się głównie w fazie G_0/G_1 cyklu komórkowego i ich klonalny rozrost może także być wyrazem nadmiernej ekspresji czynników transkrypcyjnych ułatwiających ich przeżycie i hamujących apoptozę, co prowadzi do nagromadzenia tych komórek. Wykazano, że STAT3 razem z aktywacją rodziny kinaz Src bierze udział w transformacji komórkowej i wydaje się, że czynniki te są zaktywowane w komórkach białaczki T-LGL [72, 88]. Zakłada się hipotetycznie, że aktywacja STAT3 w T-LGL może hamować ścieżkę apoptozy przez indukcję białka MCL-1 należącego do rodziny anty-apoptotycznego białka BCL-2 [88].

Według Włodarskiego i wsp. [89] mechanizmy patogenetyczne białaczki T-LGL leżą pomiędzy zaburzeniami regulacji wzrostu komórek spotykanyymi w rozrostach nowotworowych, a zaburzeniami immunologicznymi charakterystycznymi dla chorób autoimmunologicznych. Klinicznie białaczka nie przebiega jak typowy proces nowotworowy, przypomina raczej chorobę autoimmunologiczną.

W kontekście patogenetycznego związku pomiędzy białaczką T-LGL a procesami immunolo-

gicznymi zrozumiąle jest jej częste współlistnienie z różnymi zaburzeniami i chorobami autoimmunologicznymi. U około 30% chorych występuje reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), które poprzedza lub pojawia się jednocześnie z zaburzeniami hematologicznymi typowymi dla białaczki [7, 9, 13, 76]. Chorzy na białaczkę T-LGL i towarzyszące RZS klinicznie bardzo przypominają chorych z zespołem Felty'ego (FS, *Felty's syndrome*), który jest rzadko występującą chorobą autoimmunologiczną charakteryzującą się triadą objawów: neutropenią, RZS i powiększeniem śledziony [90]. Podobieństwa pomiędzy obiema jednostkami dotyczą zarówno obrazu klinicznego, jak i cech immunogenetycznych takich, jak na przykład częstsze niż w prawidłowej populacji występowanie allelu HLA-DR4 [91–93]. Ponadto, u około 1/3 chorych z zespołem Felty'ego występuje monoklonalna limfocytoza z T-LGL [91, 94–96]. Burks i Loughran [97] sugerują, że ze względu na podobieństwo immunogenetyczne oraz podobny typ rozrostu cytotoksycznych klonalnych limfocytów T obie jednostki stanowią warianty tego samego procesu kliniczno-patologicznego. Białaczce T-LGL mogą również towarzyszyć inne choroby autoimmunologiczne [7, 76, 98–101] (tab. 1.2). Chorzy z białaczką T-LGL często też wykazują różne nieprawidłowości serologiczne [9, 102] (tab. 1.3).

Białaczka T-LGL może również współlistnieć z różnymi chorobami układu krwiotwórczego i limfoproliferacyjnymi [13, 103–110] (tab. 1.4).

Zwykle w chorobach układu krwiotwórczego nie obserwuje się bezwzględnej limfocytozy, chociaż liczba monoklonalnych T-LGL we krwi i szpiku zidentyfikowanych za pomocą badań immunohistochemicznych i cytometrycznych może być znaczna [104, 105].

U chorych z białaczką T-LGL obserwuje się też występowanie różnych rozrostów z komórek B [108]. Biorąc pod uwagę wyraźny związek białaczki T-LGL z rozrostem i aktywnością komórek B, polegający na współlistnieniu z chorobami autoimmunologicznymi, wytwarzaniem przeciwciał, hipergammaglobulinemii poliklonalnej i przewlekłych monoklonalnych limfoproliferacji z limfocytów B oraz komórek plazmatycznych, można przypuszczać, że rozrosty zarówno z komórek B jak i T może wywoływać podobny czynnik patogenetyczny powodujący przetrwałą stymulację antygenową [108]. Pewnym potwierdzeniem tej teorii są wyniki przeprowadzonych ostatnio przez Volkheimera i wsp. [111] badań molekularnych regionu wiążącego antygen genów łańcuchów ciężkich i lekkich immunoglobulin w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL). Wykazały one, że podobnie jak w białaczce

Tabela 1.2. Choroby autoimmunologiczne towarzyszące białaczce T-LGL

Reumatoidalne zapalenie stawów i zespół Felty'ego
Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy typu Hashimoto
Zespół Sjögrena
Toczeń rumieniowaty układowy
Twardzina układowa
Wrzodziejące zapalenie jelita grubego
Autoimmunologiczne zapalenie wątroby
Łuszczyca
Nawracające zapalenie tęczówki

Tabela 1.3. Nieprawidłowości serologiczne u chorych na białaczkę T-LGL

Czynnik reumatoidalny
Przeciwciała przeciwjądrowe
Przeciwciała przeciwplytkowe
Przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrocytów
Dodatni bezpośredni test antyglobulinowy
Hiper- i hipogammaglobulinemia poliklonalna
Krążące kompleksy immunologiczne
Podwyższone stężenie β_2 -mikroglobuliny

Tabela 1.4. Choroby układu krwiotwórczego i limfoproliferacyjne towarzyszące białaczce T-LGL

Autoimmunologiczna niedokrwistość hemolityczna
Aplazja czysto czerwonokrwinkowa
Niedokrwistość aplastyczna
Nocna napadowa hemoglobinuria
Małopłytkowość immunologiczna
Cykliczna neutropenia dorosłych
Zespoły mielodysplastyczne
Białaczka włochatokomórkowa
Przewlekła białaczka limfocytowa
Gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu
Szpiczak mnogi
Chłoniak Hodgkina

T-LGL, gdzie występują identyczne sekwencje nukleotydowe w regionie CDR3 łańcuchów β genów TCR, w PBL obserwuje się podobieństwo nukleotydowych sekwencji w regionie CDR3 genów IG. Sugeruje to działanie czynnika antygenowego mogącego inicjować ten rozrost.

Opisano przypadki białaczki T-LGL po przeszczepach nerek i wątroby, a także po allogenicznym przeszczepach komórek krwiotwórczych [112–115]. Stanowią one przykład poprzyszczepowej łagodnej choroby limfoproliferacyjnej. W przypadku przeszczepów narządowych sugerowano w patogenezie rolę stymulacji rozrostu z T-LGL przez alloantygeny lub czynniki zakaźne, takie jak wirus Epsteina-Barr.

Według Burksa i Loughrana [97] cytopenia w białaczce T-LGL jest wynikiem humoralnych i komórkowych mechanizmów immunologicznych, w następstwie których monoklonalne T-LGL powodują apoptozę prekursorów komórek krwiotwórczych w szpiku zarówno w mechanizmie bezpośredniej cytotoksyczności związanej z receptorem TCR, jak i przez wydzielane cytokiny. Włodarski i wsp. [89] zaproponowali hipotezę, że jeżeli celem działania monoklonalnych T-LGL jest multipotencjalna hemopoetyczna komórka pnia, wszystkie linie krwiotworzenia są uszkodzone, co powoduje pancytopenię. Jeżeli celem ataku są komórki progenitorowe na wyższym szczeblu dojrzewania, dochodzi do zahamowania wzrostu i dojrzewania, jednej z linii, na przykład niedokrwistości w wyniku uszkodzenia komórek progenitorowych linii czerwono-krwinkowej. Perzova i Loughran [116] uważają, że komórki białaczki T-LGL mogą hamować proliferację i różnicowanie granulocytów w mechanizmie związanej z Fas apoptozy prekursorów granulocytów, co tłumaczyłoby hipoplazję linii granulocytowej i brak postaci dojrzałych w szpiku. Stwierdzili, że komórki białaczki T-LGL posiadają ekspresję ligandu Fas, który po związaniu się z Fas powoduje apoptozę komórki docelowej [116]. Maciejewski i wsp. [117] zaobserwowali, że w warunkach *in vitro* komórki progenitorowe szpiku CD34⁺ mogą wykazywać ekspresję Fas po stymulacji czynnikiem martwicy nowotworów-alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*) i interferonem gamma (INF- γ , *interferon-gamma*). Wiadomo z kolei, że komórki białaczki T-LGL mogą spontanicznie lub po stymulacji wydzielać TNF- α i INF- γ [118]. Tak więc, wydzielane przez nie cytokiny uaktywniają ekspresję Fas na komórkach progenitorowych, które stają się celem dla komórek białaczki. Ten proces związany z aktywnością cytotoksycznych limfocytów T może być także odpowiedzialny za wystąpienie cytopenii, nawet przy braku przeważającej liczby komórek monoklonalnych, czyli przed wystąpieniem monoklonalnej transformacji [89].

Jak wynika z pracy Osuji i wsp. [119], która zawiera dane dotyczące leczenia 29 chorych na bia-

łaczkę T-LGL i przegląd piśmiennictwa, aktualnie nie ma standardowego schematu leczenia tej białaczki. Dane z literatury są ograniczone do opisów przypadków, badań retrospektywnych i nielicznych prospektywnych, dotyczących jednak niewielu chorych i leczonych różnymi lekami. Nierzadko leczenie jest modyfikowane przez fakt częstego współistnienia innych chorób. Celem leczenia w białaczce T-LGL jest wyrównanie cytopenii, szczególnie neutropenii oraz zmniejszenie powikłań infekcyjnych. Poprawę cytopenii można uzyskać bez eradykacji komórek białaczkowych, które zwykle są odporne na terapię [120]. W leczeniu stosuje się czynnik stymulacyjny kolonii granulocytowych, leki immunosupresyjne (cyklosporynę A, małe dawki metotretksatu, cyklofosfamid), steroidy, leki cytotoksyczne (analogi puryn, leki alkilujące) oraz splenektomię [119, 121–123].

2. Cel pracy

Celem pracy jest wielokierunkowa analiza chorych z limfocytozą z dużych ziarnistych limfocytów T uwzględniająca ocenę:

- stanu klinicznego i nieprawidłowości hematologicznych oraz serologicznych u chorych;
- obrazu histopatologicznego i badań immunohistochemicznych szpiku w trepanobiopsjach;
- immunofenotypu w badaniach krwi obwodowej lub szpiku metodą cytometrii przepływową;
- rearanzacji genów kodujących części zmienne łańcuchów receptora komórek T oraz immunoglobulin w badaniach molekularnych.

3. Materiał i metody

3.1. Charakterystyka kliniczna chorych

W latach 2006–2008 zbadano retrospektywnie i prospektywnie grupę 96 chorych z podejrzeniem procesu rozrostowego z dużych ziarnistych limfocytów T wysuniętym na podstawie badania morfologii krwi, w której obserwowano limfocytozę i cytopenię (głównie neutropenię) oraz cech klinicznych (występowanie chorób autoimmunologicznych, głównie RZS, nawracających zakażeń i powiększenia śledziony). W Przychodni Specjalistycznej i Klinice Chorób Wewnętrznych i Hematologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) diagnozowano i leczono 79 chorych, w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie (COI) 12 oraz w Katedrze i Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób We-

wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 5 chorych. Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na przeprowadzenie badań diagnostycznych i leczenie. Badanie zostało zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną IHiT.

Na podstawie badań krwi i szpiku, w tym badań cytomorfologicznych (rozsmaz barwiony wg metody May-Grünwald-Giemza), histopatologicznych (badanie histopatologiczne i immunohistochemiczne szpiku) oraz immunofenotypowych (badanie metodą cytometrii przepływowej z użyciem panelu przeciwciał do analizy limfocytów T i NK) stwierdzono u 55 chorych limfocytozę z dużych ziarnistych limfocytów T i ta grupa będzie przedmiotem dalszej analizy.

Kryteria włączenia chorych do badania były następujące:

1. Białaczkę z dużych ziarnistych limfocytów T rozpoznawano zgodnie z kryteriami WHO [6], to jest morfologicznej i immunofenotypowej identyfikacji populacji dużych ziarnistych limfocytów T ($CD3^+/CD16^+/CD57^+/TCR\alpha\beta^+/\gamma\delta^+$) we krwi obwodowej i/lub szpiku oraz wykazaniu monoklonalnej rearanzacji genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*. Zgodnie ze zmodyfikowanymi kryteriami [124] do rozpoznania włączono przypadki z limfocytozą z T-LGL we krwi obwodowej większą niż $2 \times 10^9/l$, jak również chorych z leukopenią i względną limfocytozą z T-LGL, mniejszą niż $2 \times 10^9/l$. T-LGL stanowiły więcej niż 50% wszystkich limfocytów we krwi obwodowej. Część chorych wymagała rozpoczęcia leczenia wkrótce po rozpoznaniu choroby, w związku z tym nie u wszystkich uwzględniono kryterium o minimalnym okresie trwania monoklonalnej limfocytozy z T-LGL wynoszącym 6 miesięcy. U badanych chorych wyłączono możliwość aktywnej choroby zakaźnej lub towarzyszącej choroby nowotworowej. Nie mieli oni cech mielodysplazji w szpiku.
 2. Odczynową limfocytozę z dużych ziarnistych limfocytów T rozpoznawano w przypadkach z obecnością populacji dużych ziarnistych limfocytów T o charakterystycznej morfologii i fenotypie ($CD3^+/CD16^{+/-}/CD57^{+/-}/TCR\alpha\beta^+/\gamma\delta^+$) we krwi obwodowej i/lub szpiku, w których nie stwierdzono rearanzacji genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*. Liczba T-LGL we krwi obwodowej była większa niż $0,2 \times 10^9/l$ i stanowiły one więcej niż 25% wszystkich limfocytów.
- Dane kliniczne chorych, takie jak stan chorych w chwili przyjęcia, choroby towarzyszące oraz wy-

niki badań laboratoryjnych, uzyskano z dostępnej dokumentacji klinicznej.

U wszystkich chorych wykonano morfologię krwi obwodowej z rozmazem. Rozmazy krwi barwiono według metody May-Grünwald-Giemza i badano w kierunku obecności dużych ziarnistych limfocytów, określając ich procent w stosunku do wszystkich limfocytów.

Zmiany w morfologii krwi obwodowej definiowano następująco:

- leukopenię, gdy liczba krwinek białych $< 4 \times 10^9/l$,
- neutropenię — liczba granulocytów obojętnochłonnych $< 1,5 \times 10^9/l$,
- ciężką neutropenię — liczba granulocytów obojętnochłonnych $< 0,5 \times 10^9/l$,
- niedokrwistość — hemoglobina (Hb) < 13 g/dl dla mężczyzn i < 11 g/dl dla kobiet,
- ciężką niedokrwistość — Hb < 8 g/dl,
- małopłytkowość — liczba płytek $< 150 \times 10^9/l$,
- ciężką małopłytkowość, gdy liczba płytek $< 20 \times 10^9/l$.

W badaniach obrazowych (ultrasonografia, tomografia komputerowa) zwracano uwagę na wielkość śledziony, przyjmując jej wymiar w długiej osi większy niż 140 mm jako kryterium powiększenia.

Chorzy z podejrzeniem choroby autoimmunologicznej byli konsultowani w Klinice Reumatologii Instytutu Reumatologii w Warszawie. Obecność 4 lub więcej kryteriów diagnostycznych *American Rheumatism Association* (ARA) [125] umożliwiała rozpoznanie reumatoidalnego zapalenia stawów. Rozpoznanie innych autoimmunologicznych chorób tkanki łącznej ustalono na podstawie kryteriów ARA dla poszczególnych jednostek. Zespół Felty'ego rozpoznawano zgodnie ze zmodyfikowanymi kryteriami tej jednostki [126].

W zależności od objawów klinicznych oceniano również wybrane parametry odpowiedzi humoralnej:

1. przeciwciała przeciwjądrowe (ANA, *antinuclear antibodies*) oznaczane metodą immunoenzymatyczną Colorzyme na komórkach linii Hep-2. Wartości dodatnie uznawano dla rozcieńczeń powyżej 1:160;
2. czynnik reumatoidalny w klasie IgM (RF, *rheumatoid factor*) oznaczany analizatorem nefelometrycznym. Za dodatnie uważano wartości powyżej 34 IU/L;
3. przeciwciała antycytrulinowe (ACPA, *anti-citrullinated protein antibodies*) oznaczane zestawem do oznaczania trzeciej generacji Quantana Life CCP3 IgG ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) firmy Inova;

4. przeciwciała antykardiolipinowe (aCL, *anticardiolipin antibodies*) klasy IgG i IgM oznaczano testem ELISA opartym na metodzie Harrisa;
5. przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrocytów (ANCA, *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) oznaczane metodą ELISA zestawem firmy HVD.

Czas przeżycia chorych oceniany był od daty rozpoznania do daty ostatniej wizyty kontrolnej lub zgonu. Kryteria odpowiedzi na leczenie oparte na propozycjach Osuji i wsp. [119] były następujące:

- całkowita odpowiedź hematologiczna (CHR, *complete hematologic response*): prawidłowa morfologia krwi: Hb \geq 13 g/dl (mężczyźni), \geq 11 g/dl (kobiety), granulocyty ($> 2 \times 10^9/l$); limfocyty ($< 3,5 \times 10^9/l$), płytki ($> 150 \times 10^9/l$), brak organomegalii i objawów ogólnych;
- częściowa odpowiedź (PR, *partial response*): poprawa wyjściowych parametrów hematologicznych o 50% lub Hb \geq 12 g/dl (mężczyźni), 11g/dl (kobiety), granulocyty ($\geq 2 \times 10^9/l$), limfocyty ($< 15 \times 10^9/l$), płytki ($\geq 100 \times 10^9/l$), zmniejszenie organomegalii o 50% i brak objawów ogólnych;
- brak odpowiedzi (NR, *no response*): brak poprawy wyjściowych parametrów, jednak bez ich pogorszenia.

3.2. Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne

U 45 chorych rozpoznanie ustalono na podstawie badań histopatologicznych szpiku. Badania wykonano w Pracowni Patomorfologii IHiT. Trepanobiopsje utrwalano w utrwalczu oksfordzkim (formaldehyd 40%, kwas octowy lodowaty, NaCl, H₂O destylowana). Następnie odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu i acetonu, prześwietlano w ksylenie i zatapiano w parafinie. Błoczki parafinowe krojono na skrawki grubości 4 μ m i nanoszono na szkiełka podstawowe. W przypadku barwień immunohistochemicznych szkiełka pokryte były 2-procentowym roztworem 3-aminopropyltrietyloksylanu (Sigma A3648) w acetonie. Skrawki poddawano inkubacji w cieplarni w temperaturze 60°C przez 12–16 godzin, następnie odparafinowywano i uwadniano. Tkanki barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (HE). Wykonywano również barwienia immunohistochemiczne z użyciem zestawu uwidaczniającego EnVision^{TM+}/HRP Mouse lub EnVision^{TM+}/HRP Rabbit Detection System, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark (DAKO). Rodzaj i reaktywność używanych przeciwciał poli- i monoklonalnych przedstawiono w tabeli 3.2.1.

Badania immunohistochemiczne przy użyciu przeciwciał anti-CD20 i CD3 miały na celu ujawnienie obecności, nasilenia i lokalizacji nacieków z limfocytów B i T. Populacja limfocytów T CD3⁺ była dalej identyfikowana przy użyciu panelu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom specyficznym dla limfocytów T cytotoksycznych: CD8, CD57 i granzymowi B, jak również przeciwko CD4. Przeciwciała przeciwko mieloperoksydazie i hemoglobinie umożliwiały dokładniejszą ocenę stanu hemopozy w szpiku.

Oznaczenie ekspresji poszczególnych antygenów wykonywano zgodnie z następującą procedurą:

1. Odkrywanie antygenów:
 - metoda termiczna — gotowanie preparatu w buforze EDTA pH 9,0 w łaźni wodnej w temp. 96–98 °C przez 30 minut (przy zastosowaniu przeciwciała anti-CD20, CD3, CD8, CD4, CD57, granzym B);
 - metoda enzymatyczna — nałożenie na preparat roztworu trypsyny na 15 minut (Trypsin Tablets; Sigma; T-7168); płukanie pod bieżącą wodą przez 5 minut (przy zastosowaniu przeciwciała przeciwko hemoglobinie);
 - przeciwciała przeciwko mieloperoksydazie nie wymaga stosowania powyższych metod.
2. Płukanie w wodzie destylowanej.
3. Zanurzenie preparatu w 3-procentowym roztworze H₂O₂ na 5 minut w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy.
4. Dwukrotne płukanie w wodzie destylowanej, a następnie przez 5 minut w roztworze TBS z BSA, pH 8,0 (*Tris Buffered Saline with BSA*; Sigma; T-6789).
5. Nałożenie rozcieńczonego w roztworze TBS z BSA przeciwciała (tab. 3.2.1) i inkubacja w komorze pod przykryciem w temperaturze pokojowej przez 60 minut.
6. Spłukanie przeciwciała roztworem TBS z BSA, następnie płukanie w nim preparatu przez 5 minut.
7. Nałożenie odczynnika uwidaczniającego: EnVision^{TM+}/HRP Mouse (DAKO; K 4001) lub EnVision^{TM+}/HRP Rabbit (DAKO; K 4003) (w zależności od klonalności przeciwciała) i inkubacja w komorze pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze pokojowej.
8. Spłukanie odczynnika uwidaczniającego roztworem TBS z BSA i płukanie preparatu w roztworze przez 5 minut.
9. Wywoływanie barwnej reakcji (kompleks antygen–przeciwciało) z wykorzystaniem 3,3-diaminobenzyny jako chromogenu (Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System; DAKO, K 3468).
10. Barwienie w hematoksylinie Harrisa przez 1 minutę, różnicowanie Ebnerem (kwaśny al-

Tabela 3.2.1. Zestawienie przeciwciał wykorzystanych do przeprowadzenia badań immunohistochemicznych

Przeciwciało	Klon	Symbol	Rozcieńczenie	Producent	Reaktywność
CD20	L 26	M0755	1:50	DAKO	Wszystkie limfocyty B
CD3	Poliklonalne	A0452	1:50	DAKO	Wszystkie limfocyty T
CD8	C8/144B	M7103	1:20	DAKO	Limfocyty T supresorowo/cytotoksyczne
CD4	4B12	NCL-L-CD4-368	1:10	Novocastra	Limfocyty T pomocnicze
CD57	NK-1	NCL-NK1	1:50	Novocastra	Komórki o aktywności komórek NK, część supresorowych limfocytów T
Granzym B	11F1	NCL-L-GRAN-B	1:40	Novocastra	Granzym B — proteaza magazynowana w ziarnistościach litycznych limfocytów cytotoksycznych i komórek NK
Hemoglobina	Poliklonalne	A0118	1:100	DAKO	Prekursory krwinek czerwonych
Mieloperoksydaza	Poliklonalne	N1578	Gotowe do użycia	DAKO	Prekursory granulocytów w szpiku

Tabela 3.2.2. Zestawienie tkanek stosowanych do wykonania kontroli pozytywnej

Przeciwciało	Rodzaj tkanki	Kontrola wewnętrzna
CD20	Odczynowy węzeł chłonny	Limfocyty strefy B
CD3	jw.	Limfocyty strefy T
CD8	jw.	jw.
CD4	jw.	jw.
CD57	Migdałek	Komórki NK, supresorowe limfocyty T
Granzym B	Migdałek	Limfocyty cytotoksyczne i komórki NK
Hemoglobina	Prawidłowy szpik kostny	Prekursory krwinek czerwonych
Mieloperoksydaza	Prawidłowy szpik kostny	Prekursory granulocytów

kohol), płukanie pod bieżącą wodą, odwodnienie, prześwietlenie i zamknięcie w medium.

Uzyskiwano barwne (brązowe) odczyny błonowe w przypadku przeciwciał: anty-CD20, CD3, CD4, CD8, CD57, odczyny cytoplazmatyczne w przypadku mieloperoksydazy i hemoglobiny oraz odczyny ziarniste, cytoplazmatyczne w barwieniach z granzymem B.

Zgodnie z przedstawionymi wcześniej procedurami ujawniania poszczególnych antygenów wykonano kontrolę negatywną przez poddanie preparatu obróbce termicznej lub bezpośrednio przechodzą do punktu 3, po czym kontynuowano barwienia immunohistochemiczne, z tym że w punkcie 5 zamiast przeciwciała pierwotnego nakładano roztwór TBS z BSA, pH 8,0. W żadnym z preparatów stanowiących kontrolę negatywną nie zauważono odczy-

nu barwnego z poszczególnymi przeciwciałami. Przeprowadzono również kontrole pozytywne. Zestawienie tkanek stosowanych do wykonywania kontroli pozytywnej, jak i elementów komórkowych stanowiących kontrolę wewnętrzną przy zastosowaniu poszczególnych przeciwciał zestawiono w tabeli 3.2.2. We wszystkich wycinkach kontrolnych obserwowano silną ekspresję poszczególnych antygenów w większości komórek stanowiących kontrolę wewnętrzną.

W każdym przypadku oceniano: komórkowość szpiku, stan hemopoezy (linie granulocytową, czerwonekrwinkową i megakariocyty) oraz procentowy udział nacieków limfocytarnych o określonym fenotypie i ich lokalizację. Komórkowość i hemopoeza oceniane były w odniesieniu do odpowiednich wielokowo prawidłowych szpików.

Tabela 3.3.1. Przeciwciała stosowane w badaniach metodą cytometrii przepływowej

Przeciwciało	Klon	Producent	Reaktywność
CD45 FITC	2D1	BD	Wspólny antygen leukocytów
CD45 RA FITC	L48	BD	Limfocyty B i dziewicze limfocyty T
CD45 RO PE	UCHL1	BD	Limfocyty B i limfocyty T pamięci
CD2 PE	S5.2	BD	Limfocyty T i większość komórek NK
CD3 PerCP	UCHT1	DAKO	Powierzchniowa ekspresja na dojrzałych limfocytach T, cytoplazmatyczna ekspresja w niedojrzałych komórkach T
CD4 FITC	4SK3	BD	Limfocyty T pomocnicze, monocyty, niedojrzałe komórki mieloidalne
CD5 FITC	L17F12	BD	Tymocyty, dojrzałe limfocyty T, podgrupa komórek B
CD7 FITC	4-H9	BD	Limfocyty T, komórki NK, podgrupa niedojrzałych komórek mieloidalnych
CD8 PE i PerCP	SK1	BD	Limfocyty T cytotoksyczno/supresorowe, podgrupa komórek NK
CD16 RPE	DJ130c	DAKO	Komórki NK, komórki T typu NK podgrupa monocytów
CD56 PE	NCAM16.2	BD	Komórki NK, limfocyty T typu NK
CD57 FITC	NHK-1	Sigma-Aldrich	Komórki NK, limfocyty T typu NK
CD25 PE	2A3	BD	Aktywowane limfocyty T i B
CD43 RPE	L10	SEROTEC	Limfocyty T, komórki linii mieloidalnej, monocyty
HLADR PE	HLADR-L243	BD	Aktywowane limfocyty T, mieloblasty, monocyty, wszystkie limfocyty B
TCR $\alpha\beta$ FITC	WT31	BD	Większość limfocytów T
TCR $\gamma\delta$ PE	11F2	BD	Podgrupa limfocytów T

3.3. Badania metodą cytometrii przepływowej

Badania metodą cytometrii przepływowej (FCM) wykonano u 40 chorych w Pracowniach Cytometrii Przepływowej COI oraz IHiT. U 26 chorych zbadano krew obwodową, a u 14 aspirat szpiku. Immunofenotypowanie komórek limfoidalnych przeprowadzono, wykorzystując 3-kolorową FCM z użyciem panelu przeciwciał do analizy limfocytów T i NK. Zawiesinę komórek w PBS znakowano przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z fluorochromami o trzech zakresach emisji: izotiocyanem fluoresceiny (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), fikoerytryną (PE, *phycoerythrin*) lub R-pochodną fikoerytryny (RPE) i peridyną-chlorofilem (PerCP, *peridinin chlorophyll protein*). Panel przeciwciał monoklonalnych przeciwko określonym antygenom różnicowania (CD, *cluster of differentiation*) zestawiono w tabeli 3.3.1.

Kontrole negatywne inkubowano z połączoną z fluorochromami immunoglobuliną o identycznym izotypie jak pozostałe przeciwciała: simultest firmy Becton Dickinson (BD) i IgG1 PerCP (BD). Antygeny komórek wyznakowane ww. przeciwciałami

rutynowo analizowano w ciągu godziny przy użyciu cytometru przepływowego FACScalibur (BD), San Jose, CA, USA z laserem argonowym o długości fali 488 nm, ustawiając bramkę na populacji komórek limfoidalnych (5000 komórek/próbkę). Bramka na komórkach limfoidalnych została ustawiona na podstawie wielkości (FSC, *forward scatter channel*) i ziarnistości cytoplazmatycznych komórek (SSC, *side scatter channel*) z wykorzystaniem przeciwciał CD45/CD14, które pozwalają na dokładne zlokalizowanie badanych komórek limfoidalnych CD45⁺/CD14⁻ w analizowanej próbce. Ekspresję antygenów powierzchniowych oceniano na skali logarytmicznej. Do analizy wyników użyto programu *CellQuest*. Ekspresję powierzchniową oceniano na podstawie porównania mediany intensywności fluorescencji (MFI, *median fluorescence intensity*) badanego antygeny na komórkach białaczki T-LGL z intensywnością fluorescencji w próbce zawierającej kontrolę izotypową i MFI antygenów na prawidłowych limfocytach T z krwi obwodowej lub szpiku współistniejących z T-LGL. Przyjęto, że komórki badane wykazują ekspresję analizowanego antygeny, jeżeli odsetek komórek wykazujących

fluorescencję jest wyższy niż kontrola izotypowa i wynosi nie mniej niż 20 procent. Ustalono, że ekspresja antygenów pan-T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD43) na komórkach białaczki T-LGL może mieć następujący charakter: 1) jednopikowy typu *bright*, taki sam jak na prawidłowych limfocytach T (+); 2) mglisty typu *dim*, obniżony w stosunku do prawidłowych limfocytów T na 100% komórek T-LGL (+ ↓); 3) mglisty typu *dim*, obniżony w stosunku do prawidłowych limfocytów T na części (> 20 < 100%) komórek T-LGL (+/- ↓) oraz 4) komórki T-LGL nie wykazują ekspresji badanego antygeny (-). Dodatkowo, ekspresję antygenów innych niż pan-T (CD45 i jego izoformy, CD16, CD56, CD57, CD25 i HLADR) oceniano na komórkach białaczki T-LGL w podobny sposób: jako dodatnią na wszystkich komórkach (+), na części komórek (> 20 < 100%) (+/-) i brak ekspresji (-).

3.4. Badania genetyczne

3.4.1. Badania metodami biologii molekularnej

U 47 chorych wykonano badania molekularne w Pracowni Genetyki IHiT w celu wykazania klonalności procesu. Badano rearanżacje genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*: *TCR beta* (*TCRB*), *TCR delta* (*TCRD*) i *TCR gamma* (*TCRG*) oraz immunoglobulin (*IG*): łańcuchów ciężkich (*IGH*), łańcuchów lekkich kappa (*IGK*) i lambda (*IGL*). Zbadano krew obwodową (20 przypadków) lub aspirat szpiku kostnego (27 przypadków), z których izolowano komórki jednojądrowe na gradiencie gęstości 1,077 g/ml (Gradisol L, Biomed). DNA izolowano metodą kolumnkową (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Startery i parametry reakcji rearanżacji genów *IG/TCR* zostały ustalone według protokołu BIOMED-2 [127].

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzano w termocyklerze Tuchgene Gradient Techné w końcowej objętości 25 μ l (50–100 ng DNA, ABI Buffer II lub ABI Buffer Gold, 10 pmol każdego ze starterów 3' i 5', dNTP w stężeniu końcowym 200 μ mol/l, $MgCl_2$ w stężeniu końcowym 1,5–3,0 mmol/l, polimeraza AmpliTaq Gold 0,5–1 IU na jedną reakcję). Reakcja PCR polegała na wstępnej aktywacji (7 min w 95°C) i kolejnych 35 cyklach amplifikacji, każdy złożony z fazy denaturacji (30 s w 94°C), przyłączania (30 s w 60°C), wydłużania (30 s w 72°C) oraz końcowego wydłużania (10 min w 72°C).

Rearanżacje genów kodujących część zmienną *TCRB* badano w trzech multipleksowych reakcjach PCR, w tym *TCRB-A* z użyciem 23 starterów $V_{\beta 2-24}$

i 9 starterów $J_{\beta 1.1-2.7}$, *TCRB-B* z użyciem 23 starterów $V_{\beta 2-24}$ i 4 starterów $J_{\beta 1.1-2.5}$ i *TCRB-C* z użyciem 2 starterów $D_{\beta 1}$, $D_{\beta 2}$ oraz 13 starterów $J_{\beta 1.1-2.7}$. Reakcje ujawniające rearanżacje genów kodujących część zmienną łańcucha *TCRG* zostały wykonane w 2 multipleksowych reakcjach PCR: *TCRG-A* z użyciem 2 starterów $V_{\gamma 9}$ i $V_{\gamma 10}$ oraz dwóch $J_{\gamma 1.1/2.1}$ i $J_{\gamma 1.3/2.3}$ oraz *TCRG-B* z użyciem 2 starterów $V_{\gamma 9}$ i $V_{\gamma 11}$ oraz dwóch $J_{\gamma 1.1/2.1}$ i $J_{\gamma 1.3/2.3}$. Identyfikację rearanżacji genów kodujących część zmienną łańcucha *TCRD* wykonano w multipleksowej reakcji PCR z użyciem 7 starterów $D_{\delta 1-6}$ i $D_{\delta 2}$ oraz 5 starterów $J_{\delta 1-4}$ i $D_{\delta 3}$.

Identyfikację rearanżacji genów kodujących *IGH* wykonano w 3 multipleksowych reakcjach PCR (kompletna), w tym *IGH-A* z użyciem 6 starterów forward $V_{H1-6-FR1}$ i 1 reverse J_H consensus, *IGH-B* z użyciem 7 starterów forward $V_{H1-7-FR2}$ i 1 reverse J_H consensus, *IGH-C* z użyciem 7 starterów forward $V_{H1-7-FR3}$ i 1 reverse J_H consensus. Badanie niekompletnej rearanżacji *IGH* wykonano w 2 reakcjach PCR: *IGH-D* z użyciem 6 starterów forward D_{H1-6} i 1 reverse J_H consensus oraz *IGH-E* z użyciem startera forward D_{H7} i reverse J_H consensus.

Rearanżacje genów kodujących łańcuch lekki — *IGK* przeprowadzono w 2 multipleksowych reakcjach PCR: *IGK-A* z użyciem 6 starterów forward V_{K1-7} i 2 reverse J_{K1-4} i J_{K5} oraz *IGK-B* z użyciem 7 starterów forward V_{K1-7} i INTR i 1 reverse Kde. Rearanżacje genów kodujących łańcuch lekki — *IGL* przeprowadzono w multipleksowej reakcji z użyciem 2 starterów forward $V_{L1/2/3}$ oraz 1 startera reverse $J_{L1/2/3}$.

Produkty PCR poddawano analizie heterodupleksowej przez denaturację w 95°C przez minutę, a następnie ponowną renaturację w 4°C przez 60 min. Produkty PCR rozdzielano przy użyciu elektroforezy w 6-procentowym żelu poliakrylamidowym i 0,5 x buforze TBE (Tris-Borate-EDTA) przez 50 min, przy napięciu 150 mV. Żele barwiono przez 10 min w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5 μ g/ml, a wyniki odczytywano w świetle lampy UV.

Każdorazowo wykonywano kontrole dodatnie (DNA izolowane z linii komórkowej Jurkat, DNA pacjentów z obecnością monoklonalnych rearanżacji) i kontrole ujemne (bez DNA oraz DNA zdrowych dawców).

Wykrycie na żelu jednego wyraźnego prążka świadczyło o obecności monoklonalnej rearanżacji. Jeśli dochodziło do rearanżacji *locus TCR* na obu kopiach chromosomu występowała rearanżacja bialleliczna, co uwidaczniało się na żelu w postaci dwóch wyraźnych prążków. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku występowania dwóch fenotypowo różnych populacji komórek białaczkowych. Tak

więc, próbki, w których analizie wykryto dwa różne prążki, określane były jako bialleliczne/biklonalne [127].

3.4.2. Badania cytogenetyczne

Badania cytogenetyczne wykonano u 15 chorych w Samodzielnej Pracowni Cytogenetyki COI. Na komórkach aspiratu szpiku oceniano kariotyp metodą prążkową, a wyniki analizowano zgodnie z Międzynarodowym Systemem Nomenklatury Cytogenetycznej (2005).

3.5. Analiza statystyczna

Metody statystyczne

Do wykonania analizy materiału wykorzystano następujące metody statystyczne: statystykę opisową, testy statystyczne dla tabel liczości i tabel wielodzzielczych. Statystyka opisowa dotyczyła wyliczenia średniej, odchylenia standardowego, minimum, maksimum i mediany. Tabele liczości zawierały liczby przypadków (liczbę obserwacji w grupach) oraz wskaźniki struktury w ujęciu procentowym. Do badania relacji pomiędzy zmiennymi kategoriami stosowano w pierwszej kolejności statystykę Chi-kwadrat. Gdy niespełnione były warunki stosowania, dla tabel 2×2 używano dokładny test Fishera. Jeśli powiązanie między zmiennymi (grupami) okazywało się istotne, za miarę siły powiązania przyjmowano współczynnik Fi-kwadrat Yule'a. Do tabel o większej liczbie kolumn lub wierszy niż 2 stosowano rozszerzony test dokładny dwukrotnie różnymi algorytmami opisanymi w punkcie „narzędzia”. Za miarę siły przyjmowano V kwadrat Cramera. Dla zmiennych ciągłych badano, czy rozkłady w grupach są normalne (testem Shapiro-Wilka) i jednorodność wariancji (testem Levene'a). Gdy spełnione były oba warunki, stosowano test Studenta. Gdy warunki nie były spełnione, stosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Za granicę istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$. W tabelach i opisach podano rzeczywistą, obliczoną wartość p .

Narzędzia

Do przetworzenia danych, wykonania analiz i sporządzenia dokumentów końcowych wykorzystano aplikacje pakietu MS Office 2002 (XP) Professional: MS Excel 2002, MS Access 2002 i MS Word 2002. Ponadto zastosowano Pakiet statystyczny Statistica 6 PL, Pakiet R, Program SISA Tables. Oprogramowanie udostępnione jest w internecie — <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>.

4. Wyniki

Limfocytozę z dużych ziarnistych limfocytów T stwierdzono u 55 chorych na podstawie badań krwi i szpiku, w tym badań cytomorfologicznych, histopatologicznych i immunofenotypowych. Badania molekularne potwierdziły rozpoznanie białaczki T-LGL w 43 przypadkach, dwunastu chorych bez rearanzacji genów *TCR* miało odczynową limfocytozę z T-LGL. U 12 chorych z limfocytozą i cytopenią zbadanych retrospektywnie skorygowano poprzednie rozpoznania. I tak u 4 chorych rozpoznanie odczynowej limfocytozy towarzyszącej RZS, u 4 chorych idiopatycznej neutropenii, zespołu mielodysplastycznego u 3 oraz u 1 chorego białaczki prolimfocytowej z komórek T zmieniono na rozpoznanie białaczki T-LGL. U jednego z 43 chorych na białaczkę T-LGL rozpoznano jednocześnie białaczkę T-LGL i przewlekłą białaczkę limfocytową. Został on wyłączony z przedstawionego badania.

Wśród 9 857 badań trepanobiopsji szpiku ocenianych w tym okresie w Pracowni Patomorfologii IHiT u chorych z podejrzeniem limfoproliferacji i/lub cytopenią jedynie 38 (0,4%) dotyczyło limfocytozy z T-LGL.

4.1. Charakterystyka kliniczna chorych i wyniki badań laboratoryjnych

Omawiana grupa obejmuje **42 chorych** (29 kobiet i 13 mężczyzn) **na białaczkę T-LGL** w wieku od 28–87 lat (średnia $60,7 \pm 14,8$). U większości chorych chorobę wykryto przypadkowo podczas rutynowych badań morfologii krwi. Objawy ogólne, takie jak osłabienie i spadek masy ciała, miało tylko 8 chorych (19%). Część z nich skarżyła się na uczucie pełności i bóle brzucha, spowodowane powiększeniem śledziony, które obserwowano u 18 chorych (42,9%). Przyczyną zgłoszenia się do lekarza były też nawracające zakażenia układu oddechowego (zapalenie gardła, zatok, oskrzeli i płuc), ropień stopy oraz ropowica ręki i towarzysząca temu gorączka. Powikłania infekcyjne pojawiły się jedynie u 11 chorych (26,2%), pomimo występującej u prawie wszystkich chorych neutropenii. Zmiany skórne typu wysypki plamisto-grudkowej obserwowano u 5 chorych (11,9%). Żaden z chorych nie miał powiększonej wątroby ani węzłów chłonnych. Dwunastu chorych (29%) w chwili rozpoznania nie wykazywało żadnych objawów klinicznych, poza nieprawidłowościami w morfologii krwi obwodowej (tab. 4.1.1).

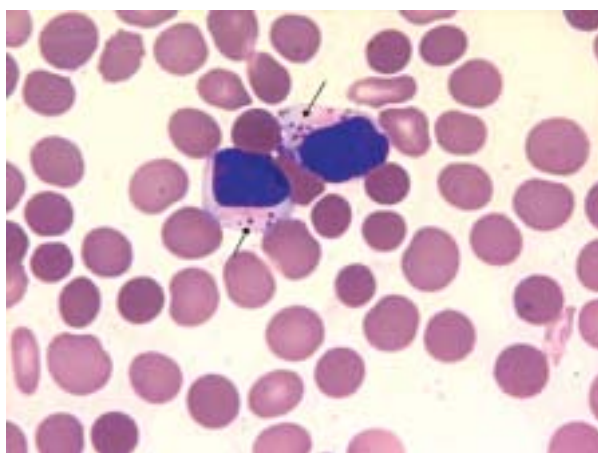
Wszyscy chorzy mieli nieprawidłowe wyniki morfologii i rozmazu krwi. Bez względu na liczbę limfocytów we krwi obwodowej wahała się od 0,6 do

Tabela 4.1.1. Cechy kliniczne i zajęcie narządów u 42 chorych na białaczkę T-LGL

Cecha	Chorzy	
	Liczba	Odsetek
Średnia wieku (zakres) w latach	60,7 ± 14,8 (28–87)	
Płeć (kobiety/mężczyźni)	29/13	
Objawy ogólne	8	19,0
Nawracające zakażenia	11	26,2
Powiększenie śledziony	18	42,9
Zmiany skórne	5	11,9
Zajęcie szpiku	42	100
Powiększenie wątroby	0	0
Powiększenie węzłów chłonnych	0	0

Tabela 4.1.2. Zaburzenia hematologiczne u 42 chorych na białaczkę T-LGL

Cecha	Chorzy	
	Liczba	Odsetek
Limfocytoza z T-LGL (0,5–2 × 10 ⁹ /l)	15	35,7
Limfocytoza z T-LGL (2–4 × 10 ⁹ /l)	5	11,9
Limfocytoza z T-LGL (> 4 × 10 ⁹ /l)	22	52,4
Neutropenia	39	92,9
Ciężka neutropenia	22	52,4
Niedokrwistość	12	28,6
Leukopenia	14	33,3
Małopłytkowość	15/40	37,5

**Rycina 4.1.1.** Rozmaz krwi obwodowej chorej na białaczkę T-LGL. Dwa duże ziarniste limfocyty z okrągłym jądrem i skondensowaną chromatyną oraz obojętnochłonną obfitą cytoplazmą zawierającą azurochłonne ziarnistości (strzałki). Barwienie May-Grünwald-Giemza, × 1000

34,5 × 10⁹/l (średnio 7,2 ± 6,8 × 10⁹/l). W badaniu cytologicznym rozmazu krwi większość limfocytów stanowiły duże ziarniste limfocyty (ryc. 4.1.1).

LGL stanowiły od 55% do 95% (średnio 79% ± 23%) wszystkich limfocytów, co odpowiadało od 0,5 do 26,9 × 10⁹ LGL na liter (średnio 5,1 ± 5,3 × 10⁹/l). Wysokie wartości limfocytozy z T-LGL (> 4 × 10⁹/l) miało 22 chorych (52,4%), ale u 15 (35,7%) obserwowano limfocytozę mniejszą niż 2 × 10⁹/l. Poza limfocytozą najczęściej obserwowaną nieprawidłowością w morfologii krwi była neutropenia. Występowała u 39 chorych (92,9%), a u 22 (52,4%) była znacznego stopnia. Średnia liczba gra-

Tabela 4.1.3. Zaburzenia hematologiczne u 42 chorych na białaczkę T-LGL cd.

Cecha	Średnia	Mini-mum	Maksi-mum
Hemoglobina, g/dl	11,0 ± 2,7	4,5	14,9
Liczba krwinek białych, × 10 ⁹ /l	9,2 ± 9,8	0,8	51,6
Liczba granulocytów, × 10 ⁹ /l	1,1 ± 3,0	0,1	19,6
Liczba limfocytów, × 10 ⁹ /l	7,2 ± 6,8	0,6	34,5
Liczba T-LGL, × 10 ⁹ /l	5,1 ± 5,3	0,5	26,9
Liczba płytek, × 10 ⁹ /l	176,9 ± 87,8	21,0	406,0

nulocytów obojętnochłonnych wynosiła 1,1 ± 3,0 × 10⁹/l (zakres 0,1–19,6 × 10⁹/l). U części chorych zanotowano inne cytopenie. Leukopenię stwierdzono u 14 chorych (33,3%). Niedokrwistość obserwowano u 12 chorych (28,6%). Średnie wartości hemoglobiny wynosiły 11,0 ± 2,7 g/dl (zakres 4,5–14,9 g/dl). Ciężka, wymagająca przetoczeń niedokrwistość występowała tylko u 7 chorych (16,6%). U 7 chorych rozpoznano niedokrwistość normocytarną, u 3 makrocytarną, a u 2 mikrocytarną. Małopłytkowość pojawiła się u 15/40 chorych (37,5%), średnia liczba płytek wynosiła 176,9 ± 87,8 × 10⁹/l (zakres 21–406 × 10⁹/l). Tylko 1 chory miał ciężką małopłytkowość (tab. 4.1.2 i 4.1.3).

Zauważono istotny związek między powiększeniem śledziony a występowaniem leukopenii (tab. 4.1.4). Nie stwierdzono natomiast istotnego

Tabela 4.1.4. Zależność występowania leukopenii od powiększenia śledziony u chorych na białaczkę T-LGL

Powiększenie śledziony	Leukopenia	Prawidłowa liczba krwinek białych
Nie	3	21
Tak	11	7
χ^2 Pearsona	10,94	df = 1 p = 0,001

Tabela 4.1.5. Zależność występowania małopłytkowości od powiększenia śledziony u chorych na białaczkę T-LGL

Powiększenie śledziony	Małopłytkowość	Prawidłowa liczba płytek
Nie	7	16
Tak	8	9
χ^2 Pearsona	1,15	df = 1 p = 0,283

związku pomiędzy występowaniem małopłytkowości a powiększeniem śledziony (tab. 4.1.5).

Towarzyszące białaczkę T-LGL choroby autoimmunologiczne, charakteryzujące się wieloletnim przebiegiem występowały u 21 chorych (50%). Najczęściej, u 15 chorych (35,7%), rozpoznano reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Nieklasfikowalne zapalenie stawów rozpoznano u 3 chorych (7,1%), autoimmunologiczne zapalenie tarczycy z podwyższonym mianem przeciwciał przeciwtruczycowych u 6 (14,3%), a w pojedynczych przypadkach wtórny do RZS zespół Sjögrena, twardzinę (postać ograniczoną — skórną) oraz mieszaną chorobę tkanki łącznej. Trwające od 1 roku do 43 lat (średnio 12,8 roku) RZS spełniające kryteria diagnostyczne ARA, z obecnością nadżerek powierzchni stawowych w obrazie radiologicznym, zwykle wyprzedzało pojawienie się objawów hematologicznych o 10 miesięcy do 42 lat (średnio 12,7 roku). U jednej chorej oba schorzenia wystąpiły jednocześnie. Ze względu na towarzyszącą neutropenię i powiększenie śledziony u wszystkich chorych na RZS rozpoznano zespół Felty'ego. U trzech chorych występowało nieklasfikowalne zapalenie stawów przypominające RZS, ale niespełniające kryteriów ARA. Zapalenie stawów było symetryczne i obwodowe, z bolesnością stawów, sztywnością, okresowymi obrzękami i podchrzęstnymi torbielami w badaniu USG, ale bez nadżerek. U dwóch chorych artropatia pojawiła się 9 i 2 lata przed zaburzeniami hematologicznymi, a u jednego chorego pojawiła się

Tabela 4.1.6. Choroby towarzyszące u 42 chorych na białaczkę T-LGL

Choroba	Chorzy	
	Liczba	Odsetek
Reumatoidalne zapalenie stawów	15	35,7
Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy	6	14,3
Nieklasfikowalne zapalenie stawów	3	7,1
Wtórny zespół Sjögrena	1	2,4
Twardzina	1	2,4
Mieszana choroba tkanki łącznej	1	2,4
Zapalenie naczyń	1	2,4

Tabela 4.1.7. Nieprawidłowości serologiczne u chorych na białaczkę T-LGL

Cecha	Chorzy	
	Liczba	Odsetek
Czynnik reumatoidalny	19/32	59,4
Przeciwciała przeciwjądrowe	20/34	58,8
Przeciwciała antycytrulinowe	16/20	80
Przeciwciała antykardiolipinowe	8/10	80
Hipergammaglobulinemia poliklonalna	26/40	65,0
Przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrocytów	2/17	11,8

po 17 latach utrzymującej się leukopenii, limfocytozy i neutropenii. Jedna z chorych miała zmiany w mózgu i skórze odpowiadające zapaleniu naczyń (tab. 4.1.6).

Nieprawidłowości serologiczne występowały u 30 chorych (71,4%), zarówno u tych, u których rozpoznano chorobę autoimmunologiczną, jak i bez jej objawów. W badaniu elektroforetycznym białek surowicy u 26/40 chorych (65%) stwierdzono hipergammaglobulinemię poliklonalną. Obecność czynnika reumatoidalnego (RF-IgM) wykazano u 19/32 badanych chorych (59,4%), przeciwciał antycytrulinowych u 16/20 (80%), przeciwciał przeciwjądrowych u 20/34 (58,8%), przeciwciał antykardiolipinowych u 8/10, przeciwciał przeciw płytkowych u 1/10 oraz przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrocytów u 2/17 badanych chorych (tab. 4.1.7).

Drugą badaną grupę stanowiło **12 chorych** ze zwiększoną liczbą T-LGL w krwi obwodowej i z towarzyszącą cytopenią, u których rozpoznano **odczynową limfocytozę z T-LGL**. W 10 przypadkach udało się ustalić jej etiologię. U 6 chorych limfocyto-

Tabela 4.1.8. Choroby towarzyszące u 12 chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL

Choroba	Liczba chorych
Reumatoidalne zapalenie stawów	3
Powszechny zmienny niedobór odporności	2
Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy	1
Nieklasfikowalne zapalenie stawów	1
Pierwotny zespół Sjögrena	1
Stan po przeszczepieniu wątroby	1
Aplazja czysto czerwonekrwinkowa	1
Chłoniak strefy brzeżnej	1

za pojawiła się w przebiegu choroby autoimmunologicznej. U 3 chorych limfocytozie towarzyszyły trwające 5–15 lat RZS, a w pojedynczych przypadkach nieklasfikowalne zapalenie stawów, autoimmunologiczne zapalenie tarczycy i zespół Sjögrena. U 2 chorych limfocytoza z T-LGL pojawiła się w przebiegu powszechnego zmiennego niedoboru odporności (CVID), a u jednej chorej po przeszczepie wątroby. U jednej chorej z odczynową limfocytozą T-LGL i towarzyszącą aplazją czysto czerwonekrwinkową w ciągu 2-letniej obserwacji ujawnił się chłoniak strefy brzeżnej. W pozostałych 2 przypadkach nie udało się ustalić powiązania limfocytozy T-LGL z żadną inną chorobą (tab. 4.1.8).

Część badanych chorych ze współistniejącą chorobą zapalną stawów została wcześniej opisana w aspekcie powiązań proliferacji z T-LGL z RZS [76].

Średnia wieku chorych z odczynową limfocytozą T-LGL wynosiła $49 \pm 12,3$ roku (zakres 35–71). Dwóch chorych miało nawracające zakażenia górnych dróg oddechowych i płuc. U 5 chorych (42%) obserwowano powiększenie śledziony, a u 2 chorych z CVID dodatkowo powiększenie wątroby i węzłów chłonnych.

Wszyscy chorzy mieli nieprawidłowości w morfologii i rozmazie krwi. Limfocytoza we krwi obwodowej wynosiła od 0,7 do $4,2 \times 10^9/l$ (średnio $2,1 \pm 1,5 \times 10^9/l$), a liczba T-LGL wahała się od 0,2 do $1,9 \times 10^9/l$ (średnio $0,73 \pm 0,5 \times 10^9/l$). Neutropenia występowała u 8 chorych (67%) i u 4 była dużego stopnia. Średnia liczba neutrofilów wynosiła $1,0 \pm 0,7 \times 10^9/l$, (zakres $0,14$ – $2,1 \times 10^9/l$). Leukopenię obserwowano u 5 chorych, niedokrwistość pojawiła się u 1, a małopłytkowość u 6 chorych.

Porównano dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych u 42 chorych na białaczkę T-LGL i 12 chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL. Chorzy na białaczkę byli starsi ($60,7 \pm 14,8$ v. $49 \pm 12,3$

roku, $p = 0,016$). W badaniach laboratoryjnych u chorych na białaczkę obserwowano istotnie większą średnią liczbę limfocytów ($7,2 \pm 6,8$ v. $2,1 \pm 1,5 \times 10^9/l$, $p = 0,002$) i T-LGL ($5,1 \pm 5,3$ v. $0,73 \pm 0,5 \times 10^9/l$, $p = 0,000$). U żadnego z chorych z odczynową limfocytozą T-LGL liczba T-LGL nie była większa niż $2 \times 10^9/l$. Ponadto, u chorych na białaczkę istotnie częściej występowała neutropenia (93% v. 67%, $p = 0,036$).

Objawy kliniczne i inne badania laboratoryjne były podobne w obu grupach. Dotyczyło to częstości występowania powiększenia śledziony (43% v. 42%; $p = 0,942$), nawracających zakażeń (26% v. 17%; $p = 0,398$), towarzyszących chorób autoimmunologicznych (RZS: 36% v. 25%; $p = 0,487$), obecności autoprzeciwciał: czynnika reumatoidalnego (59% v. 36%; $p = 0,187$), przeciwciał przeciwjądrowych (59% v. 36%; $p = 0,194$) oraz hipergammaglobulinemii poliklonalnej (65% v. 33%; $p = 0,051$), leukopenii (33% v. 42%; $p = 0,594$), niedokrwistości (29% v. 8%; $p = 0,143$) i małopłytkowości (38% v. 50%; $p = 0,439$).

4.2. Obraz histopatologiczny i immunohistochemiczny trepanobiopsji szpiku

Szpik badany był u 34 chorych na białaczkę T-LGL. Najczęściej (w 18 przypadkach) zanotowano zwiększoną komórkowość szpiku, chociaż u 12 chorych komórkowość była prawidłowa, a u 4 zmniejszona. U wszystkich chorych obserwowano śródmiąższowe nacieki z małych limfocytów, ale były one słabo widoczne i trudne do wykrycia w rutynowym barwieniu HE. Ponadto, u 19 chorych (56%) obserwowano niewielkie grudkowe, międzybeleczkowe nacieki limfocytarne. Ocena hemopoety w szpiku wykazała zmniejszoną liczbę prekursorów granulocytów w 53% przypadków i przesunięcie dojrzewania granulocytów w lewo u 44% chorych. Erytropoeza i megakariopoeza były prawidłowe lub niekiedy zmniejszone, bez zaburzeń w dojrzywaniu.

Podobnie u 11 chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL szpik najczęściej wykazywał zwiększoną komórkowość. Liczba prekursorów granulocytów była zwykle zmniejszona, a megakariopoeza prawidłowa. Liczba prekursorów linii czerwonekrwinkowej była prawidłowa lub zmniejszona, a u jednej chorej obserwowano tylko pojedyncze erytroblasty, co odpowiadało rozpoznaniu aplazji czysto czerwonekrwinkowej. Widoczne w barwieniu HE subtelne, śródmiąższowe nacieki limfocytarne obecne były w 5 przypadkach (45%). Ponadto u 5 pacjentów obserwowano grudkowe skupienia limfocytów (tab. 4.2.1).

Tabela 4.2.1. Cechy morfologiczne szpiku 34 chorych na białaczkę T-LGL i 11 chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL

	Komórkowość n (%)	Erytropoeza n (%)	Granulopoeza n (%)	Megakariocyty n (%)
Białaczka T-LGL				
— zwiększona	18 (53)	–	1 (3)	–
— prawidłowa	12 (35)	25 (74)	15 (44)	31 (91)
— zmniejszona	4 (12)	9 (26)	18 (53)	3 (9)
Odczynowa limfocytoza z T-LGL				
— zwiększona	7 (64)	–	2 (18)	–
— prawidłowa	3 (27)	9 (82)	4 (36)	11 (100)
— zmniejszona	1 (9)	2 (18)	5 (45)	–

Barwienia immunohistochemiczne wykonane u 33 chorych na białaczkę T-LGL przy użyciu panelu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom specyficznym dla cytotoksycznych limfocytów T: CD3, CD8, CD57, granzymu B oraz CD4 ujawniły zajęcie szpiku przez limfocyty T. Stanowiły one średnio 29% wszystkich komórek (zakres 15–80%) i miały dwojakie rozmieszczenie.

U wszystkich chorych na białaczkę obecne były nacieki śródmiąższowe z tworzeniem skupień po kilka komórek. Drugi typ zajęcia szpiku był znacznie subtelniejszy i ujawnił się w barwieniach immunohistochemicznych u 21 chorych (64%) w postaci nacieków o charakterystycznym liniowym układzie w świetle zatok.

Zarówno w naciekach śródmiąższowych, jak i wewnątrzatkowych u 25 chorych (76%) limfocyty T wykazywały ekspresję CD3⁺/CD8⁺/CD4⁻. Ekspresja CD57 była różnorodna: dodatnia na wszystkich limfocytach T u 20 chorych (61%), dodatnia na części komórek w 8 przypadkach i ujemna u 5 chorych. Odczyn z granzymem B był dodatni we wszystkich limfocytach T w 16 przypadkach (49%). U 13 chorych ekspresja granzymu B pojawiała się jedynie na części komórek, a u 4 odczyn był ujemny (ryc. 4.2.1. A–F). U 7 chorych obserwowano rzadko spotykane fenotypy białaczki T-LGL. U jednego chorego fenotyp CD4⁺/CD8⁻, u dwóch CD4⁺/CD8⁺ i u czterech CD4⁻/CD8⁻ (tab. 4.2.2).

Grudkowe nacieki limfocytarne w lokalizacji międzybeleckowej, które występowały zarówno u chorych na białaczkę, jak i z odczynową limfocytozą, morfologicznie i fenotypowo odpowiadały odczynowym grudkom chłonnym. W centrum grudek znajdowały się limfocyty B (CD20⁺), które w dwóch przypadkach tworzyły ośrodki rozmnażania. Otoczone były przez małe limfocyty T (CD3⁺), głównie CD4⁺

i nieliczne CD8⁺. Odczyn z CD57 i granzymem B był dodatni w pojedynczych komórkach (ryc. 4.2.2. A–F).

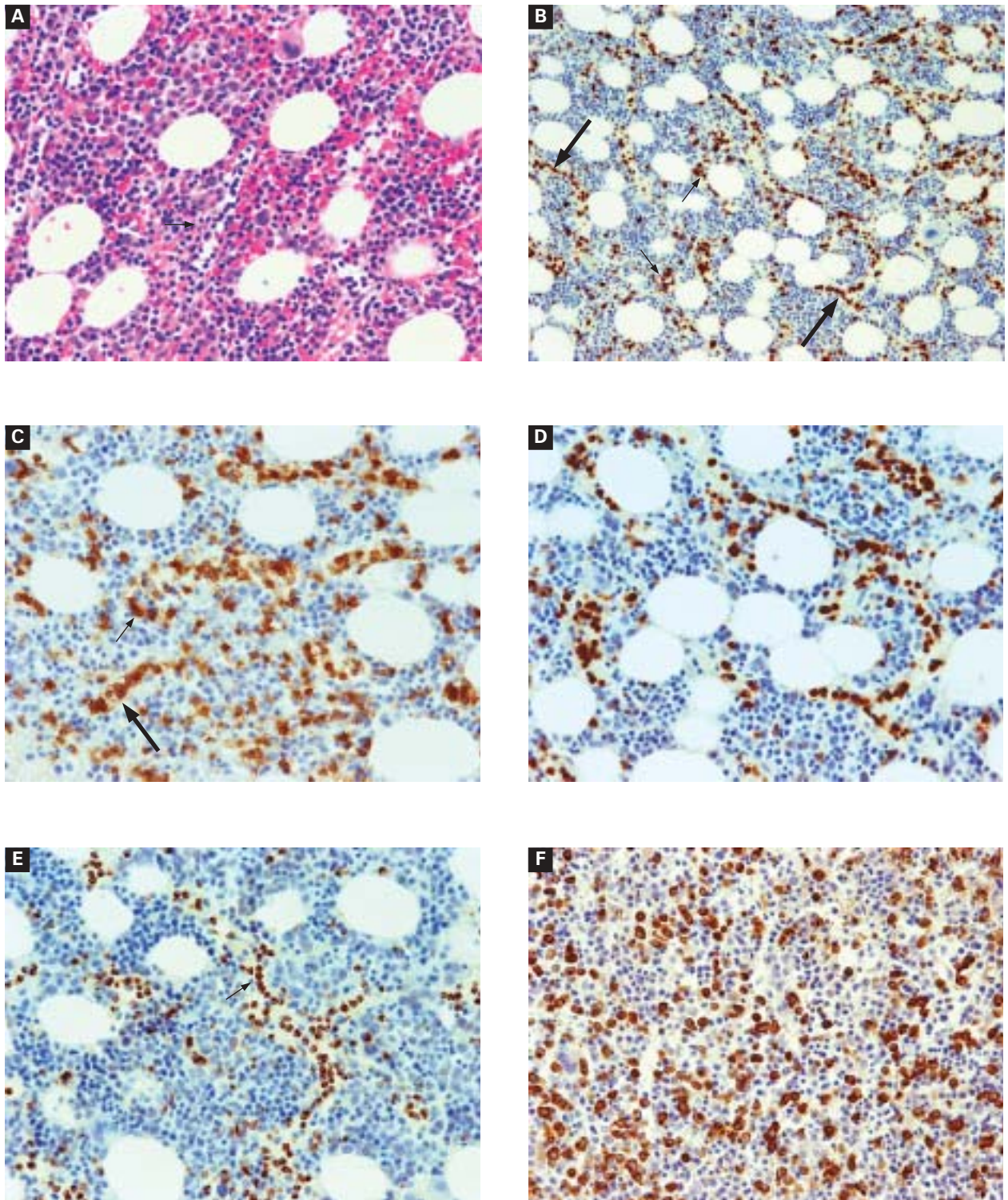
Barwienia immunohistochemiczne wykonano również u 11 chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL, używając takiego samego panelu przeciwciał. W większości przypadków nacieki z limfocytów T były rozproszone. Nacieki śródmiąższowe z tworzeniem skupień pojawiły się u 5 chorych z większymi naciekami z limfocytów T w szpiku. W żadnym przypadku nie stwierdzono nacieków wewnątrzatkowych. W 9 przypadkach limfocyty T wykazywały ekspresję CD3⁺/CD8⁺/CD4⁻, w dwóch CD3⁺/CD4⁺/CD8⁻. Odczyn z CD57 był dodatni w 8 przypadkach, ale tylko na części komórek. Ekspresja granzymu B była obserwowana w 4 przypadkach, tylko w części limfocytów T (ryc. 4.2.3. A–D).

W badaniach statystycznych istotne różnice w obrazie histopatologicznym i ekspresji badanych antygenów w szpiku chorych na białaczkę T-LGL i chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL dotyczyły częstości występowania nacieków z limfocytów T w lokalizacji wewnątrzatkowej ($p = 0,000$) i śródmiąższowych z tworzeniem skupień komórek ($p = 0,000$) oraz ekspresji granzymu B ($p = 0,002$) (tab. 4.2.3).

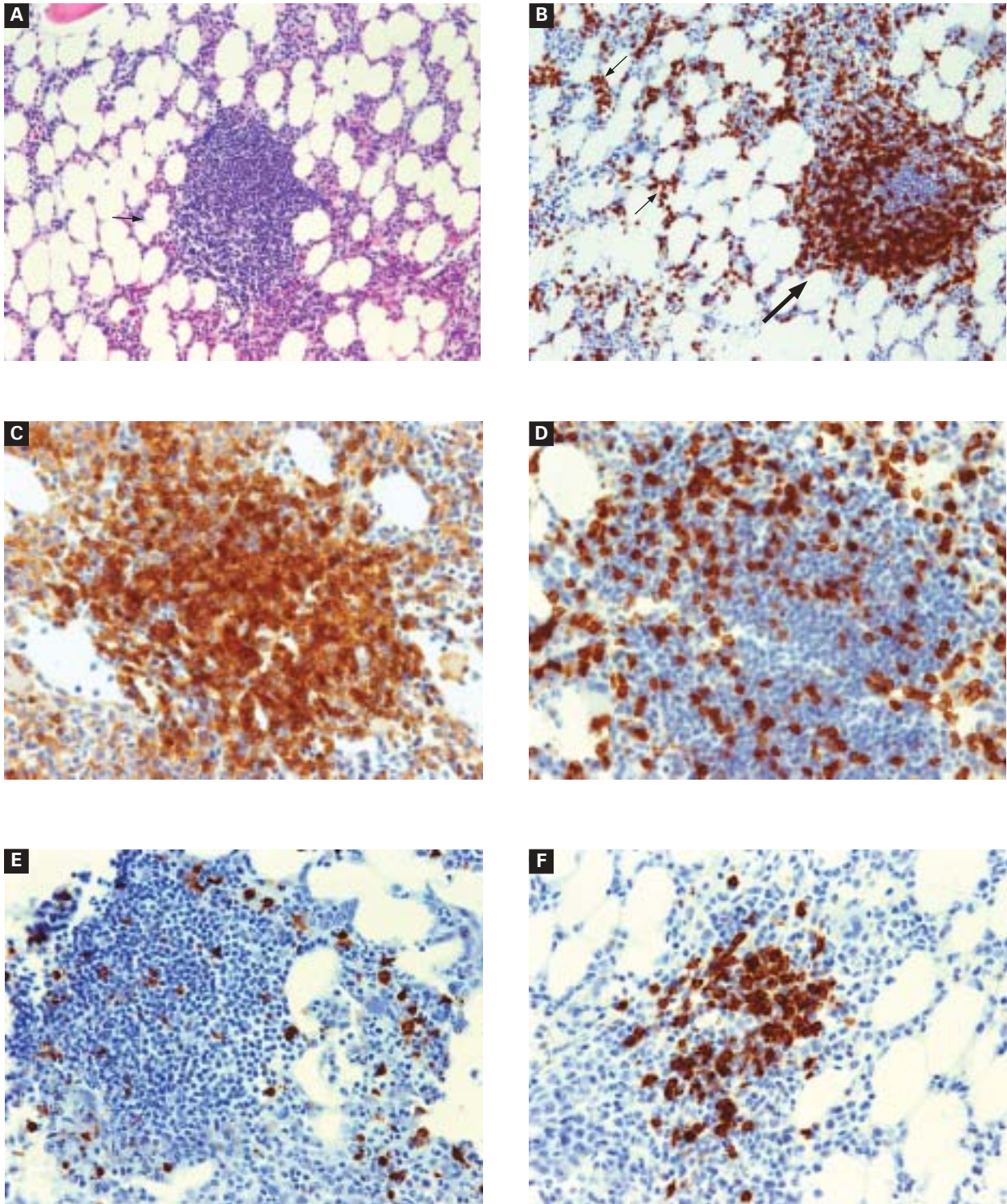
Oceniono wpływ wybranych parametrów morfologicznych i immunofenotypowych szpiku na przebieg kliniczny białaczki T-LGL (tab. 4.2.4).

Nie stwierdzono związku pomiędzy stopniem zajęcia szpiku przez nacieki białaczki T-LGL, typem naciekania szpiku (nacieki tylko śródmiąższowe *v.* śródmiąższowe i wewnątrznaczyniowe) i cytolitycznym fenotypem komórek białaczkowych (granzym B⁺ *v.* granzym B⁻) a występowaniem niedokrwistości, leukopenii, neutropenii, małopłytkowości, objawów ogólnych i nawracających zakażeń.

Ponieważ grudki chłonne są morfologicznym wykładnikiem autoimmunizacji, zbadano związek pomiędzy ich występowaniem w szpiku a pojawia-



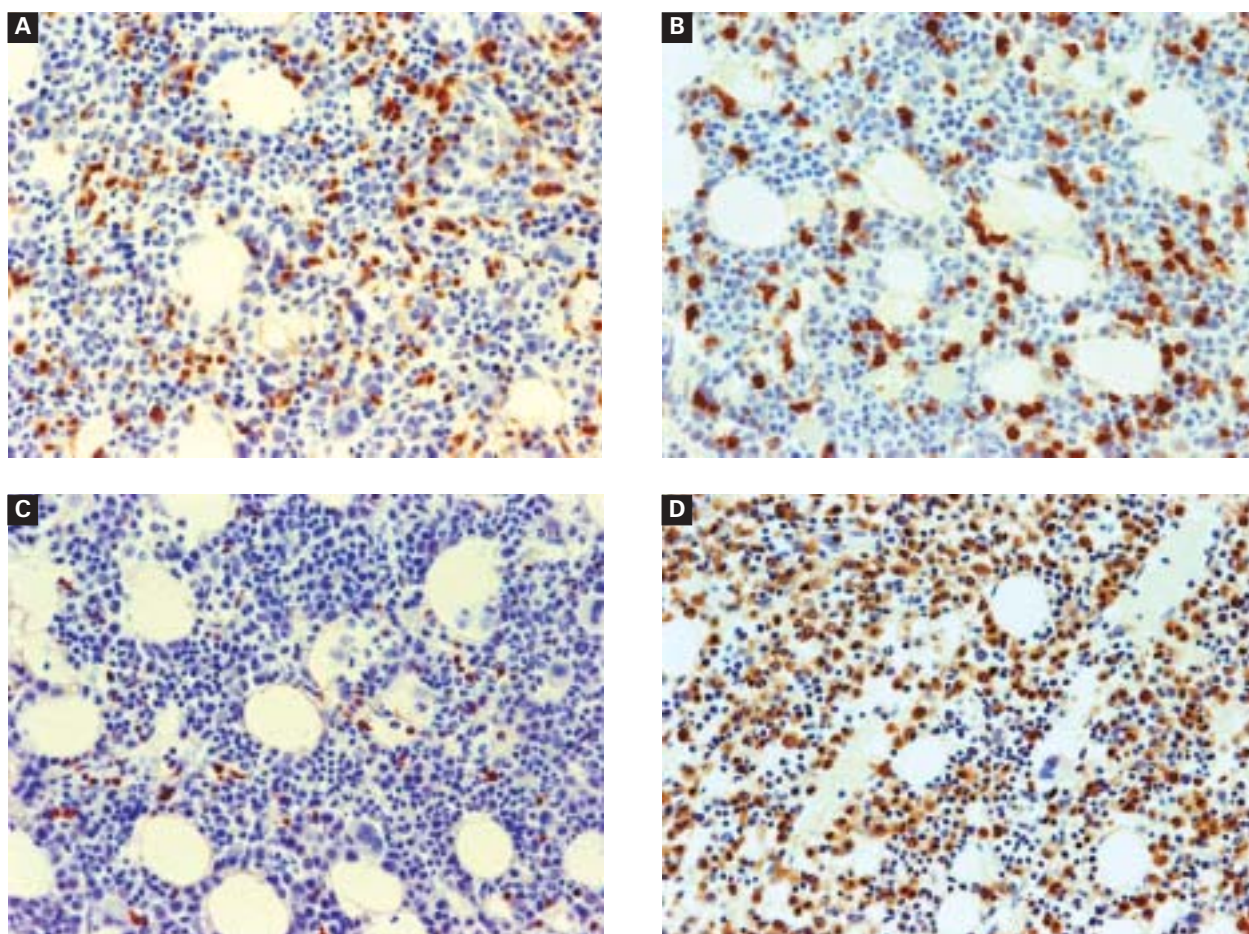
Rycina 4.2.1. Obraz histopatologiczny i immunohistochemiczny szpiku chorej na białaczkę T-LGL. **(A)** Szpik o zwiększonej komórkowości. Limfocyty w świetle naczyń zatokowych (strzałka). Barw. HE, $\times 200$; **(B)** Barwienie immunohistochemiczne z CD3 ujawnia śródmiąższowe skupienia (krótkie strzałki) i wewnątrzzatokowe linijne nacieki z limfocytów T. Barw. EnVision, $\times 100$; **(C)** Odczyn z CD8 na limfocytach T występujących zarówno w skupieniach (krótka strzałka), jak i układających się liniowo w zatokach (długa strzałka); **(D)** Ekspresja CD57 na limfocytach T zlokalizowanych w zatokach i śródmiąższowo; **(E)** Odczyn z granzymem B, ujawniający ziarnistości cytotoksyczne w cytoplazmie limfocytów T, znajdujących się głównie w zatokach (strzałka); **(F)** Zmniejszona liczba niedojrzałych postaci granulocytów wykazujących ekspresję mieloperoksydazy. Barw. EnVision, $\times 200$



Rycina 4.2.2. Odczynowe grudki chłonne w szpiku u chorego na białaczkę T-LGL bez choroby autoimmunologicznej. (A) Odczynowa grudka chłonna zlokalizowana międzybeleczkowo (strzałka). Barw. HE, $\times 100$; (B) Barwienie immunohistochemiczne z CD3 ujawnia zarówno odczynowe limfocyty T w grudce (długa strzałka), jak i białaczkowe T w lokalizacji śródmiaższowej i wewnątrzatokowej (krótkie strzałki) Barw. EnVision, $\times 100$; (C) Większość limfocytów T w grudce wykazuje ekspresję CD4; (D) Nieliczne limfocyty T CD8⁺ w nacieku grudkowym; (E) Pojedyncze limfocyty T CD57⁺, (F) W części centralnej grudki nieliczne limfocyty B (CD20⁺). Barw. EnVision, $\times 200$

Tabela 4.2.2. Ocena ekspresji diagnostycznych antygenów w badaniach immunohistochemicznych w 33 przypadkach białaczki T-LGL

Antygen	Ekspresja na wszystkich komórkach n (%)	Ekspresja na części komórek n (%)	Brak ekspresji n (%)
CD3	33 (100)	–	–
CD4	3 (9)	–	30 (91)
CD8	27 (82)	1 (3)	5 (15)
CD57	20 (61)	8 (24)	5 (15)
Granzym B	16 (49)	13 (39)	4 (12)

**Rycina 4.2.3.** Obraz histopatologiczny i immunohistochemiczny szpiku chorej z odczynową limfocytozą z T-LGL w przebiegu zespołu Felty'ego. Odczyn z CD3 (A) i CD8 (B) ujawniają zwiększoną liczbę rozproszonych limfocytów T; (C) Odczyn z CD57 dodatni w nielicznych komórkach; (D) Zwiększona liczba niedojrzałych prekursorów granulocytów wykazujących ekspresję mieloperoksydazy. Barw. EnVision, $\times 200$.

niem się klinicznych i serologicznych cech świadczących o autoimmunizacji (tab. 4.2.5).

Stwierdzono statystycznie istotny związek między obecnością grudek chłonnych a występowaniem hiper gammaglobulinemii poliklonalnej ($p = 0,003$). Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem

niem grudek chłonnych a obecnością czynnika reumatoidalnego, przeciwciał przeciwjądrowych i towarzyszących chorób autoimmunologicznych.

U dwóch chorych limfocytozie z T-LGL towarzyszyły chłoniaki z komórek B. U jednego obecne były śródmiąższowe nacieki białaczki T-LGL

Tabela 4.2.3. Porównanie cech histopatologicznych oraz częstości ekspresji wybranych antygenów na limfocytach T w szpiku u 34 chorych na białaczkę T-LGL i u 11 z odczynową limfocytozą z T-LGL

	Białaczka T-LGL	Odczynowa limfocytoza T- LGL	P
Nacieki wewnątrzszatkowe*	21/33 (64%)	0 (0%)	**p = 0,000
Nacieki śródmiąższowe z tworzeniem skupień komórek*	33/33 (100%)	5 (45%)	**p = 0,000
Grudki chłonne	19/34 (56%)	5 (45%)	**p = 0,547
Zmniejszona liczba prekursorów granulocytów	18/34 (53%)	5 (45%)	**p = 0,665
CD8	28/33 (85%)	9 (82%)	***p = 0,571
Granzym B	29/33 (88%)	4 (36%)	***p = 0,002
CD57	28/33 (85%)	8 (73%)	***p = 0,313

*CD8⁺ lub CD57⁺ lub granzym B⁺ (ekspresja na wszystkich lub na części komórek); ** χ^2 Pearsona; ***dokładny test Fishera

Tabela 4.2.4. Zależność występowania niedokrwistości, leukopenii, neutropenii, małopłytkowości, objawów ogólnych i nawracających zakażeń od stopnia zajęcia szpiku przez nacieki białaczki, typu naciekania szpiku (nacieki tylko śródmiąższowe v. śródmiąższowe i wewnątrzszatkowe) oraz cytolitycznego fenotypu komórek białaczkowych (granzym B⁺ v. granzym B⁻)

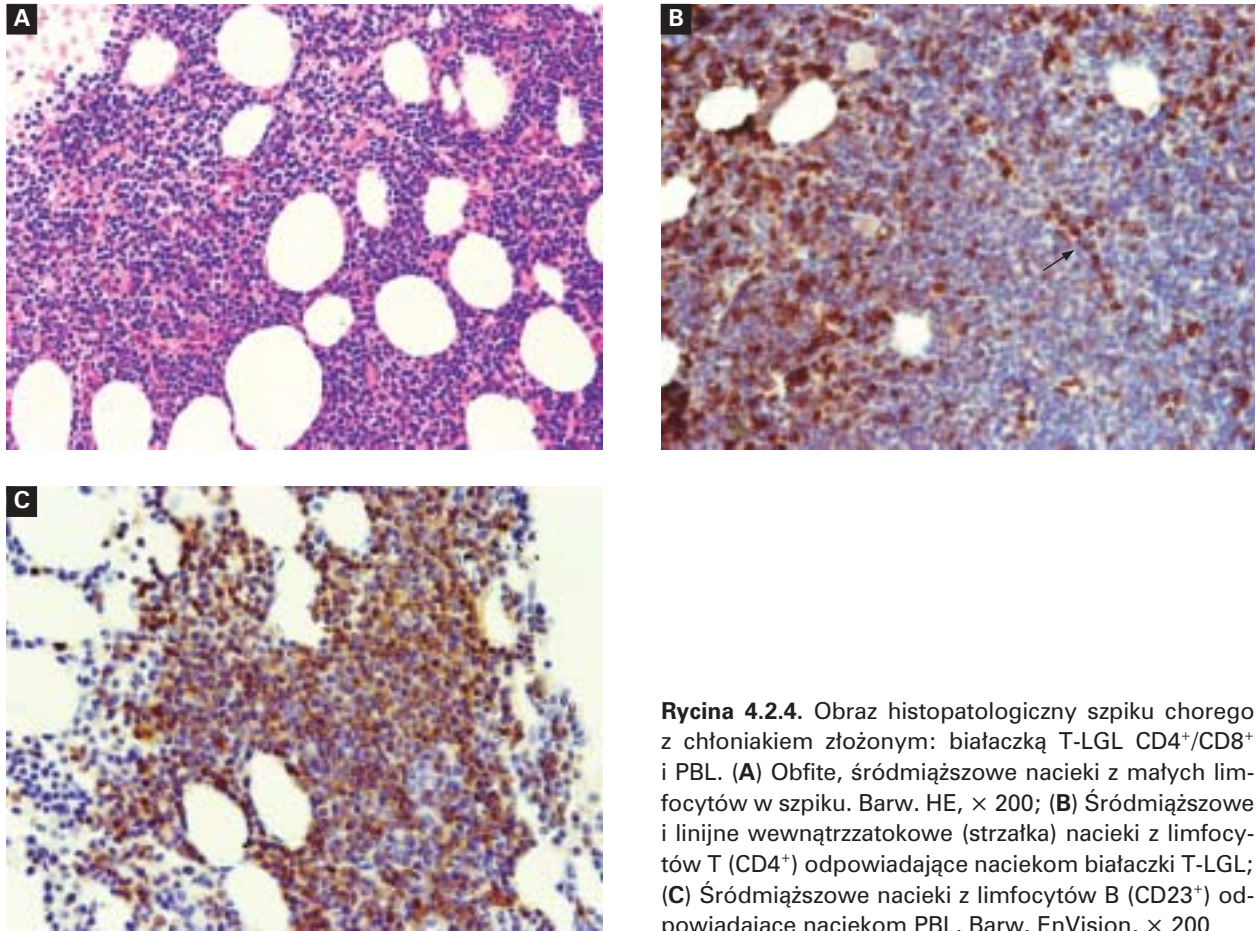
		Stopień zajęcia szpiku			Typ zajęcia szpiku			Ekspresja granzymu B		
		≤ 30% n	> 30% n	p	Ś + W n	Ś n	p	Ekspresja n	Brak n	p
Niedokrwistość	TAK	7	3	*,341	5	5	,246	7	3	,073
	NIE	12	11		16	7		22	1	
Leukopenia	TAK	4	7	*,081	5	6	,250	10	1	,593
	NIE	15	7		16	6		19	3	
Neutropenia	TAK	17	13	*,517	7	6	*,346	11	2	,519
	NIE	2	1		14	6		18	2	
Małopłytkowość	TAK	6	6	*,470	7	5	*,788	11	1	,493
	NIE	12	7		12	7		16	3	
Objawy ogólne	TAK	3	3	,510	4	2	,626	5	1	,571
	NIE	16	11		17	10		24	3	
Nawracające zakażenia	TAK	6	2	*,234	5	3	,627	7	1	,691
	NIE	13	12		16	9		22	1	

Ś — śródmiąższowy; W — wewnątrzszatkowy; p — dokładny test Fishera; *p — χ^2 Pearsona

Tabela 4.2.5. Zależność pomiędzy występowaniem grudek chłonnych w szpiku a obecnością czynnika reumatoidalnego, hipergammaglobulinemii poliklonalnej, przeciwciał przeciwjądrowych i chorób autoimmunologicznych u 34 chorych na białaczkę T-LGL

	Czynnik reumatoidalny	Hipergammaglobulinemia poliklonalna	Przeciwciała przeciwjądrowe	Choroby autoimmunologiczne
Grudki chłonne (n = 19)	10/17 (59%)	17/18 (94%)	10/18 (56%)	10/19 (53%)
Brak grudek chłonnych (n = 15)	7/10 (70%)	7/15 (47%)	7/11 (64%)	9/15 (60%)
p	*p = 0,437	*p = 0,003	**p = 0,668	**p = 0,667

*dokładny test Fishera; ** χ^2 Pearsona



Rycina 4.2.4. Obraz histopatologiczny szpiku chorego z chłoniakiem złożonym: białaczką T-LGL CD4⁺/CD8⁺ i PBL. (A) Obfite, śródmiąższowe nacieki z małych limfocytów w szpiku. Barw. HE, × 200; (B) Śródmiąższowe i linijne wewnątrzatkowe (strzałka) nacieki z limfocytów T (CD4⁺) odpowiadające naciekom białaczki T-LGL; (C) Śródmiąższowe nacieki z limfocytów B (CD23⁺) odpowiadające naciekom PBL. Barw. EnVision, × 200

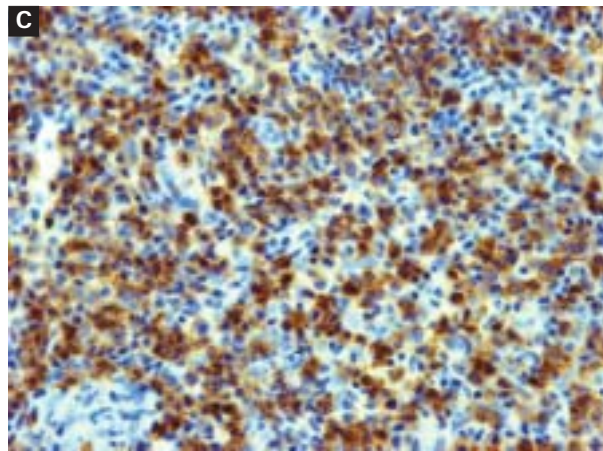
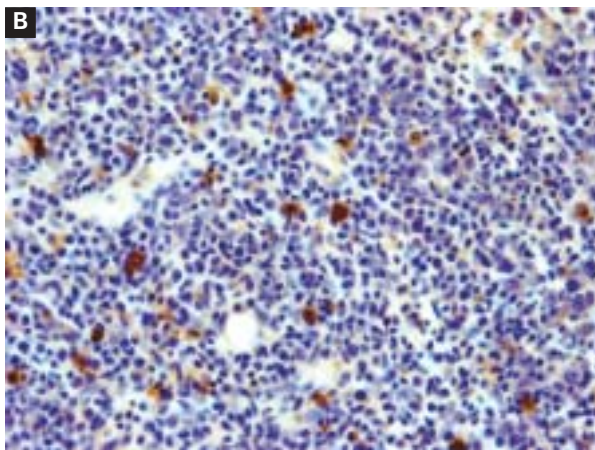
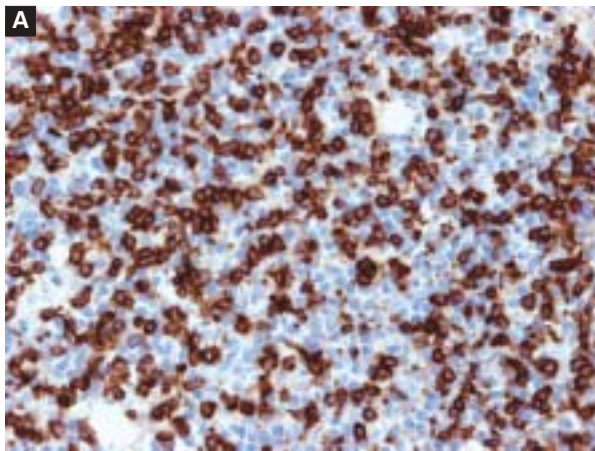
(CD4⁺/CD8⁺/CD57^{+/-}/granzym B^{+/-}), które stanowiły około 40% wszystkich komórek szpiku oraz śródmiąższowe nacieki z limfocytów B CD20⁺/CD5⁺/CD23⁺ (ok. 40% komórek) odpowiadające przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL) (ryc. 4.2.4. A–C). Odpowiadały one chłoniakowi złożonemu.

U drugiej chorej oprócz dość obfitych (ok. 50% komórek szpiku), śródmiąższowych, odczynowych nacieków z T-LGL (CD3⁺/CD4⁺/CD8^{+/-}/CD57^{+/-}/granzym B^{+/-}) obecne były nieliczne, rozproszone, małe limfocyty B (CD20⁺) stanowiące do 10% wszystkich komórek. W okresie 2-letniej obserwacji liczba śródmiąższowych nacieków z limfocytów B (CD20⁺/CD5⁻/CD23⁻/cyklinaD1⁻/CD10⁻/bcl2⁺/bcl6⁻) w szpiku zwiększyła się do 35%. Rozpoznano nacieki chłoniaka strefy brzeżnej prawdopodobnie pierwotnego śledziony. Pozostał odczynowy nacieki z T-LGL (ryc. 4.2.5. A–C).

4.3. Wyniki immunofenotypowania w cytometrii przepływowej

Komórki białaczki T-LGL wykazywały najczęściej ekspresję: CD45^{+bright}, CD2^{+bright}, CD3^{+bright},

CD4⁻, CD8^{+bright}. Ekspresja antygenów CD5 i CD7 była różna (*bright*, *dim* lub ujemna) na wszystkich lub na części komórek białaczki. W większości przypadków, u 25/31 chorych (81%) obserwowano zaburzenia ekspresji CD5. Miała ona charakter mglisty typu *dim*, obniżony w stosunku do prawidłowych komórek T (CD57⁺, CD57⁻ lub CD8⁺) na wszystkich komórkach białaczkowych u 8/31 chorych (26%) lub na części komórek u 10/31 chorych (32%), oraz była ujemna w 7/31 przypadkach (23%). U 6/31 chorych ekspresja CD5 była porównywalna z ekspresją na prawidłowych limfocytach T. Obniżona ekspresja CD7, podobna do CD5, obecna była u 21/31 chorych (67%). Brak ekspresji obserwowano w 6/31 przypadków (19%) oraz obniżoną na wszystkich komórkach białaczkowych u 5/31 (16%) chorych i na części komórek u 10/31 (32%) chorych. U 6 chorych limfocyty T charakteryzowały się całkowitym brakiem antygenów CD5 i CD7. W 8/10 badanych przypadków komórki białaczkowe wykazywały nieznacznie niższą ekspresję CD43 w porównaniu z ekspresją CD43^{bright} na prawidłowych limfocytach T. Nieprawidłowa, obniżona ekspresja CD2 występo-



Rycina 4.2.5. Obraz szpiku chorej z odczynową limfocytotą z T-LGL CD4⁺/CD8^{+/-}/CD57^{+/-}/granzym B^{+/-}, chłoniakiem strefy brzeżnej i aplazją czysto czerwonokrwinkową. (A) Śródmiąższowe nacieki z odczynowych limfocytów T CD4⁺; (B) Śródmiąższowe nacieki z małych limfocytów B (CD20⁺) odpowiadające naciekom chłoniaka; (C) Pojedyncze komórki prekursorowe linii erytroidalnej wykazujące ekspresję hemoglobiny. Barw. EnVision, × 200.

wała u 6 chorych (19%), a CD3 w 4 przypadkach (13%). W większości badanych przypadków, u 25/28 chorych (89%) pojawiała się ekspresja CD16. Jednak w 14 przypadkach obserwowano ją tylko na części (> 20 < 100%) komórek białaczkowych. Ekspresja CD56 była ujemna w 22 przypadkach, u 7 chorych pojawiła się na więcej niż 50% komórek białaczkowych. W 20/27 przypadków (74%) 20–100% komórek białaczki wykazywało ekspresję CD57, brak ekspresji tego antygeny obserwowano u 7 chorych. Antygen HLA DR był obecny w 18/22 przypadkach na różnej liczbie komórek. We wszystkich badanych przypadkach pojawiała się ekspresja tylko jednej z izoform CD45, częściej CD45RA u 17/19 chorych (89%), rzadziej CD45RO u 2/19 chorych (11%). U żadnego z 20 badanych chorych nie stwierdzono obecności antygeny CD25. Białko TCR badane było w 32 przypadkach. U 22 chorych (69%) obserwowano ekspresję TCR $\alpha\beta$, a u 10 (31%) TCR $\gamma\delta$ (tab. 4.3.1, ryc. 4.3.1).

We wszystkich analizowanych przypadkach oprócz komórek białaczkowych CD57⁺ znajdowała się populacja prawidłowych limfocytów T CD57⁺. W przeciwieństwie do komórek białaczki nie wyka-

zywały one zaburzeń w ekspresji antygenów komórek T (ryc. 4.3.1. F).

U jednej chorej opisaney wcześniej [128] występowały dwie immunofenotypowo różne populacje komórek białaczki T-LGL (ryc. 4.3.2.). Komórki jednej populacji wykazywały ekspresję CD3⁺/CD4⁻/CD8^{dim}/CD57⁺/CD5^{dim} i stanowiły 24% wszystkich limfocytów. Druga większa populacja (48% limfocytów) charakteryzowała się fenotypem: CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻/CD57⁻/CD5⁻. Ponadto komórki obu populacji posiadały ekspresję CD16^{-/+}, CD56^{-/+}, CD45RA⁺, CD2^{dim}, CD7^{dim}, CD43⁺, HLA-DR⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺. Odczyn z CD45RO, CD25, TCR $\alpha\beta$ były ujemne.

U innego chorego oprócz komórek białaczki T-LGL o fenotypie CD45RA⁺, CD2⁺, CD3⁺, CD4^{dim}, CD5^{dim}, CD7^{+/-dim}, CD8⁺, CD16⁺, CD56⁻, CD57^{+/-}, które stanowiły 38% wszystkich limfocytów, obecna była populacja limfocytów (ok. 40% komórek szpiku) o fenotypie odpowiadającym przewlekłej białaczce limfocytowej: CD19⁺, CD20^{dim}, CD5^{dim}, CD23⁺ (ryc. 4.3.3).

U 8 chorych z odczynową limfocytotą z T-LGL limfocyty T wykazywały prawidłową ekspresję antygenów pan-T. Charakteryzowały się też jedno-

Tabela 4.3.1. Ocena ekspresji diagnostycznych antygenów w 32 przypadkach białaczki T-LGL badanych metodą cytometrii przepływowej

Antygen (n)	Ekspresja na 100% komórek n (%)	Ekspresja na > 20 < 100% komórek n (%)	Nieprawidłowa ekspresja dim n (%)	Brak ekspresji n (%)
CD2 (n = 32)	26 (81)	–	6 (19)	–
CD3 (n = 32)	28 (88)	–	4 (13)	–
CD4 (n = 32)	1 (3)	–	1 (3)	30 (94)
CD5 (n = 31)	6 (19)	–	18 (58)	7 (23)
CD7 (n = 31)	10 (32)	–	15 (48)	6 (19)
CD8 (n = 32)	25 (78)	1 (3)	1 (3)	5 (16)
CD16 (n = 28)	11 (39)	14 (50)	–	3 (11)
CD56 (n = 29)	1 (3)	6 (21)	–	22 (76)
CD57 (n = 27)	9 (33)	11 (41)	–	7 (26)
CD43 (n = 10)	2 (20)	–	8 (80)	–
CD45RA (n = 19)	17 (89)	–	–	2 (11)
CD45RO (n = 19)	2 (11)	–	–	17 (89)
HLADR (n = 22)	8 (36)	10 (45)	–	4 (18)
CD25 (n = 20)	–	–	–	20 (100)
TCR $\alpha\beta$ (n = 32)	22 (69)	–	–	10 (31)
TCR $\gamma\delta$ (n = 32)	10 (31)	–	–	22 (69)

czesną ekspresją obu izoform cząsteczki CD45 zarówno CD45RA, jak i CD45RO. Najczęściej spotykany był następujący fenotyp limfocytów T: CD45⁺bright, CD45RA⁺bright, CD45RO⁺bright, CD2⁺bright, CD3⁺bright, CD4⁻, CD5⁺bright, CD7⁺bright, CD8⁺bright, CD25⁻, CD43⁺bright, HLADR^{+/-}, TCR $\alpha\beta$ ⁺. Ekspresja CD16 była dodatnia na części komórek w 3/8 przypadkach, CD56 w 2/8, a CD57 u 5/8 chorych (tab. 4.3.2).

W celu wykazania charakterystycznych cech immunofenotypowych dla białaczki T-LGL porównano częstość i rodzaj ekspresji tego samego panelu antygenów u chorych na białaczkę i u chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL (tab. 4.3.3).

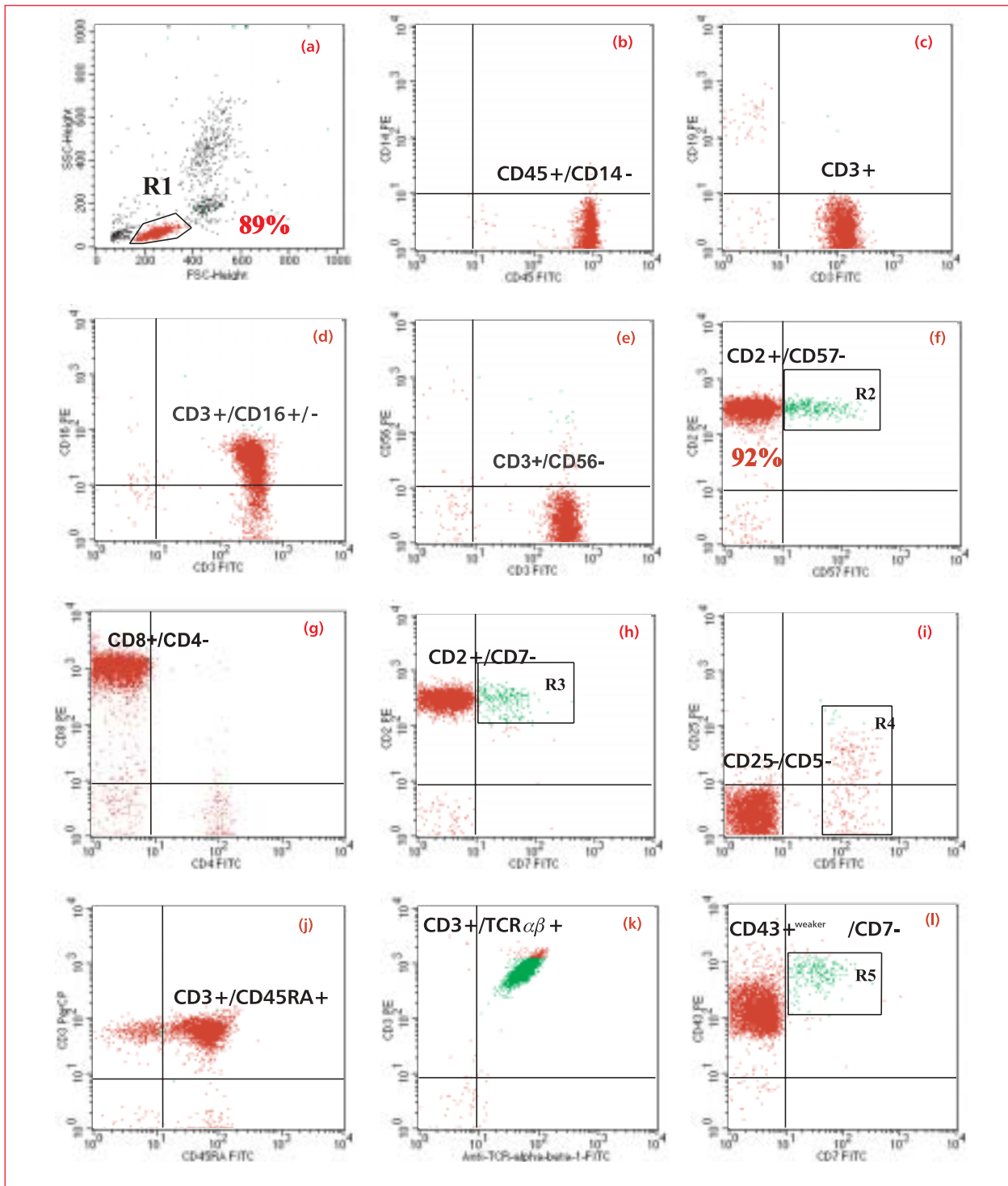
We wszystkich przypadkach komórki białaczkowe wykazywały zaburzenia ekspresji jednego, a w 21/32 (66%) dwóch lub więcej antygenów komórek T w porównaniu z prawidłowymi limfocytami T CD57⁺, najczęściej CD5 (81%), CD7 (67%) i CD43 (80%), oraz występowała tylko jedna z izoform cząsteczki CD45, najczęściej CD45RA (89%). Istotne różnice w ekspresji badanych antygenów u chorych na białaczkę T-LGL i u chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL dotyczyły występowania nieprawidłowej (obniżonej lub braku) ekspresji antygenów komórek T: CD5 (p = 0,000), CD7 (p = 0,001) i CD43 (p = 0,035) oraz pojawiania się tylko jednej izoformy CD45 (p = 0,000) w białaczce T-LGL. Natomiast antygeny CD16, CD56 i CD57 obecne były zarówno na białaczkowych, jak i odczyn-

nowych limfocytach T i nie stanowiły elementu różnicowania, chociaż ekspresja CD16 pojawiała się istotnie częściej (p = 0,006) na komórkach białaczkowych.

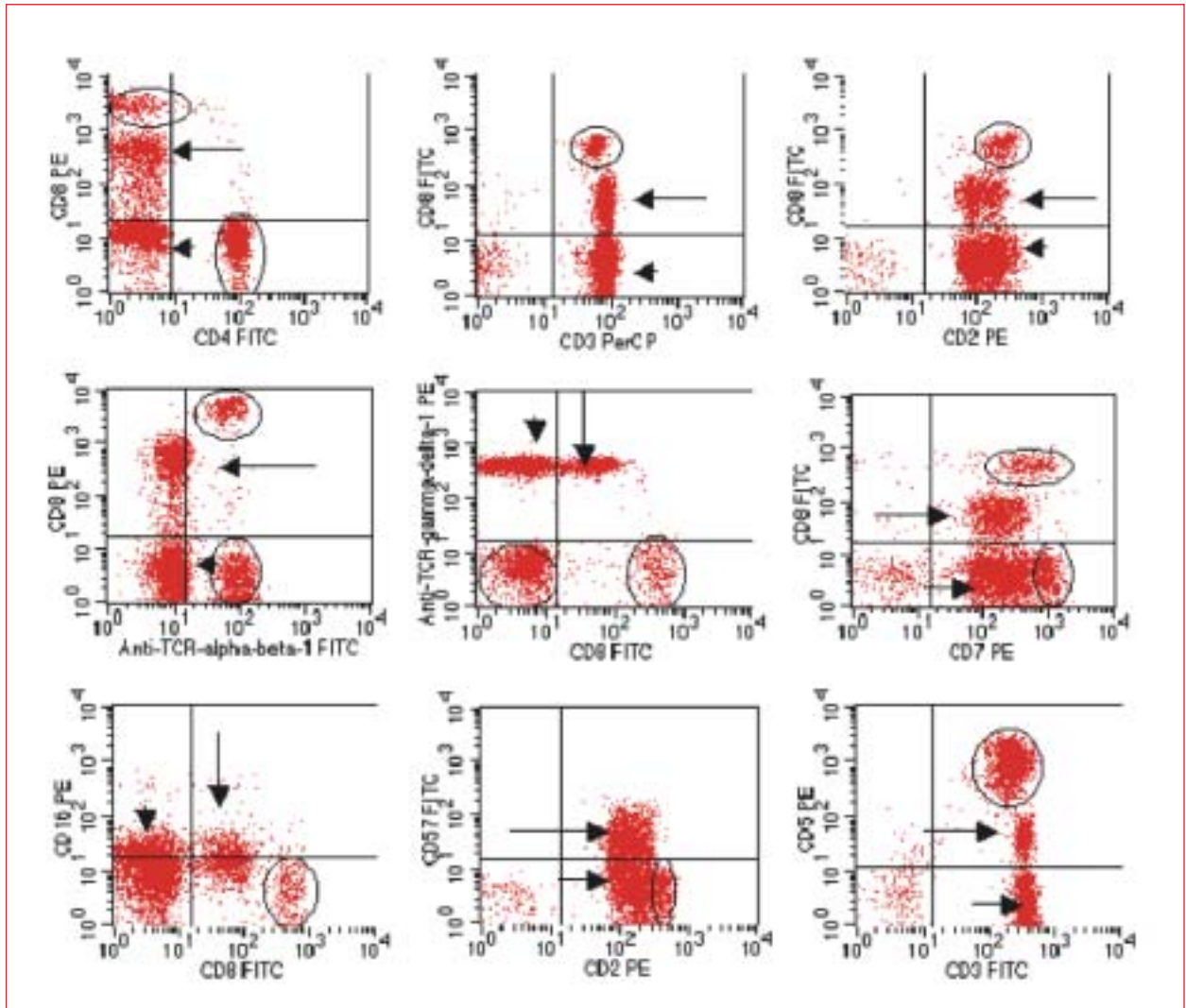
Komórki białaczki T-LGL najczęściej charakteryzowały się następującym fenotypem: CD45RA⁺bright, CD2⁺bright, CD3⁺bright, CD4⁻, CD5^{+/-}dim, CD7^{+/-}dim, CD8⁺bright, CD16^{+/-}, CD56⁻, CD57^{+/-}, CD43^{dim}, CD25⁻, HLADR^{+/-}, TCR $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁻.

Wśród chorych na białaczkę T-LGL wyodrębniono trzy rzadkie warianty fenotypowe na podstawie badań immunohistochemicznych i immunofenotypowych szpiku: białaczkę T-LGL CD4⁺, białaczkę T-LGL TCR $\gamma\delta$ ⁺ i białaczkę T-LGL z koekspresją CD56⁺.

I. Podtyp z ekspresją antygeny CD4: CD4⁺/CD8⁻ oraz CD4⁺/CD8⁺ występował u 4/42 chorych (9%). Chorzy na białaczkę T-LGL CD4⁺/CD8^{+/lub}/TCR $\alpha\beta$ ⁺ stanowili heterogenną klinicznie grupę. Dwie chore miały bardzo podobny obraz kliniczny: nieklasyfikowalne zapalenie stawów przypominające RZS, autoprzeciwciała, obwodową limfocytozę z T-LGL < 2 × 10⁹/l, leukopenię, ciężką neutropenię i związane z nią nawracające zakażenia dróg oddechowych, zmiany skórne i znaczne powiększenie śledziony. W badaniach molekularnych obserwowano u nich rearanzację genu tylko łańcucha beta TCR. U jednej z chorych nieprawidłowości hematologiczne wystąpiły po 7 latach trwania artropatii, u dru-



Rycina 4.3.1. Cytogram chorej na białaczkę T-LGL. **(A)** Obraz FSS/SSC (wielkość/ziarnistość) — w regionie R1 małe limfocyty stanowiące 89% wszystkich komórek krwi obwodowej; **(B)** CD45 v. CD14. Silna ekspresja CD45 na limfocytach; **(C)** CD3 v. CD19. Limfocyty T CD3⁺ stanowią 97% wszystkich komórek; **(D)** Populacja komórek z ekspresją CD3 i CD16; **(E)** Limfocyty T CD3⁺/CD56⁻ odpowiadające komórkom białaczkowym; **(F)** Komórki białaczkowe z ekspresją CD2⁺/CD57⁻. W regionie R2 prawidłowe limfocyty T CD2⁺CD57⁺; **(G)** CD8⁺/CD4⁻ komórki białaczkowe; **(H)** CD2⁺/CD7⁻ komórki białaczkowe i wykazująca ekspresję obu antygenów populacja odpowiadająca prawidłowym limfocytom T w regionie R3; **(I)** CD5⁺/CD25⁻ komórki białaczkowe. W regionie R4 prawidłowe limfocyty z ekspresją CD5 i CD25; **(J)** Komórki białaczkowe z ekspresją CD3 i CD45RA; **(K)** Komórki białaczkowe wykazują ekspresję CD3 i TCR $\alpha\beta$; **(L)** Komórki białaczkowe CD7⁻ wykazują nieznacznie słabszą ekspresję CD43 niż na znajdujących się w regionie R5 prawidłowych limfocytach CD7⁺/CD43⁺. FITC — izotiocyjan fluoresceiny, PE — fikoerytryna, PerCP-peridina-chlorofil TCR — receptor komórek T



Rycina 4.3.2. Biklonalna białaczka T-LGL $TCR\gamma\delta^+$. Cytoqram przedstawiający główne cechy fenotypowe dwóch populacji komórek białaczkowych: $CD3^+/CD4^+/CD8^{+dim}/CD57^+/CD5^{+dim}$ (24% wszystkich limfocytów) (długa strzałka); $CD3^+/CD4^+/CD8^+/CD57^+/CD5^-$ (48% wszystkich limfocytów) (krótka strzałka) w porównaniu z prawidłowymi limfocytami T ($CD8^{+bright}$, $CD4^+$) (komórki w elipsach)

giej zmiany stawowe pojawiły się po 17 latach leukopenii i neutropenii. U dwóch innych chorych jedyną nieprawidłowością stwierdzoną w badaniach laboratoryjnych była limfocytoza z T-LGL. W badaniu klinicznym nie było powiększenia śledziony ani węzłów chłonnych, ani też objawów chorób autoimmunologicznych. U jednego z tych chorych jednocześnie występowała przewlekła białaczka limfocytowa.

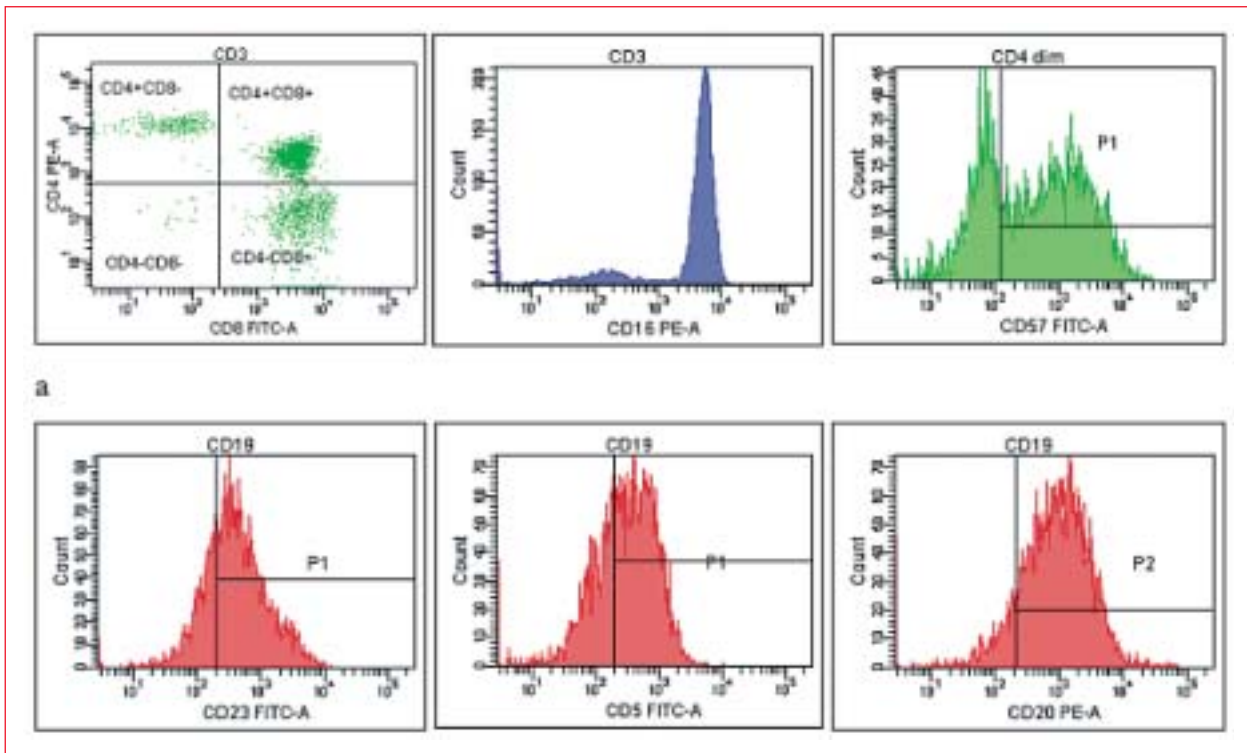
Limfocytoza T-LGL $CD4^+/CD8^{\pm}$ pojawiła się również u dwóch innych chorych, u których nie wykazano rearanżacji genów *TCR*. U jednej z nich z towarzyszącą PRCA, po 2 latach obserwacji rozwinął się chłoniak strefy brzeżnej.

II. U 10/32 chorych (31%) na białaczkę T-LGL stwierdzono w badaniach cytometrycznych ekspre-

sję cząsteczek $TCR\gamma\delta$ i rozpoznano rzadki wariant białaczki T-LGL $TCR\gamma\delta^+$. Porównano obraz kliniczno-patologiczny tych chorych z występującym u 22 chorych na białaczkę T-LGL $TCR\alpha\beta^+$ (tab. 4.3.4).

Dane kliniczne dotyczące: wieku, płci, częstości występowania powiększenia śledziony, towarzyszącego RZS, niedokrwistości, leukopenii i małopłytkowości nie różniły się istotnie w obu grupach. Zbliżona była średnia liczba krążących T-LGL (5,2 v. $5,1 \times 10^9/l$). U chorych na białaczkę $TCR\gamma\delta^+$ rzadziej pojawiała się neutropenia, jednak częstość nawracających zakażeń w obu podtypach białaczki była podobna. Przebieg choroby w obu podtypach był łagodny.

W badaniach immunohistochemicznych i cytometrii przepływowej komórki obu podtypów bia-



Rycina 4.3.3. Wyniki badań cytometrycznych chorego z chłoniakiem złożonym: białaczką T-LGL CD4⁺/CD8⁺ i PBL. **(A)** Cytogram przedstawiający limfocyty T CD3⁺ i populację limfocytów CD4^{dim}/CD8⁺ odpowiadającą białaczkę T-LGL. Histogramy pokazujące ekspresję CD16 na limfocytach T CD3⁺ i ekspresję CD57 na limfocytach CD4^{dim}. **(B)** Histogramy pokazujące ekspresję antygenów CD20, CD23 i CD5 na limfocytach B CD19⁺ odpowiadające PBL

Tabela 4.3.2. Ocena ekspresji diagnostycznych antygenów w badaniu metodą cytometrii przepływowej w 8 przypadkach odczynowej limfocytozy z T-LGL

Antygen (n)	Ekspresja na 100% komórek	Ekspresja na > 20 < 100% komórek	Nieprawidłowa ekspresja dim	Brak ekspresji
CD2 (n = 8)	8	–	–	–
CD3 (n = 8)	8	–	–	–
CD4 (n = 8)	1	–	–	7
CD5 (n = 8)	8	–	–	–
CD7 (n = 8)	8	–	–	–
CD8 (n = 8)	7	–	–	1
CD16 (n = 8)	–	3	–	5
CD56 (n = 8)	–	2	–	6
CD57 (n = 8)	–	5	–	3
CD43 (n = 3)	3	–	–	–
CD45RA (n = 8)	8	–	–	–
CD45RO (n = 8)	8	–	–	–
HLADR (n = 6)	2	4	–	–
TCR $\alpha\beta$ (n = 4)	4	–	–	–
TCR $\gamma\delta$ (n = 4)	–	–	–	4

Tabela 4.3.3. Porównanie częstości i rodzaju ekspresji wybranych antygenów u 32 chorych na białaczkę T-LGL i u 8 chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL w badaniach cytometrycznych

Antygen	Monoklonalne T-LGL n (%)	Poliklonalne T-LGL n (%)	p
CD45 RA&RO•	0/19 (0)	8 (100)	p = 0,000
CD5*	6/31 (19)	8 (100)	p = 0,000
CD5**	25/31 (81)	0 (0)	
CD7*	10/31 (32)	8 (100)	p = 0,001
CD7**	21/31 (67)	0 (0)	
CD43*	1/10 (10)	3/3 (100)	p = 0,035
CD43**	8/10 (80)	0 (0)	
CD16*	25/28 (89)	3/8 (38)	p = 0,006
CD56*	7/29 (24)	2/8 (25)	p = 0,643
CD57*	20/27 (74)	5/8 (63)	p = 0,411

•jednoczesna ekspresja obu antygenów; *prawidłowa ekspresja na wszystkich lub części komórek; **obniżona ekspresja typu dim na wszystkich lub części komórek i brak ekspresji; p — oznaczone dokładnym testem Fishera

Tabela 4.3.4. Charakterystyka kliniczna i immunofenotypowa chorych na białaczkę T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ i TCR $\alpha\beta^+$

	TCR $\gamma\delta$ n (%)	TCR $\alpha\beta$ n (%)	p
Liczba chorych	10	22	
Wiek, średnia (zakres) w latach	57,2 ± 11,8 (39–73)	61,8 ± 15,7 (28–87)	*p = 0,856
Płeć: kobiety/mężczyźni	5/5	15/7	**p = 0,136
Powiększenie śledziony	4 (40)	10 (45,5)	**p = 0,566
Nawracające zakażenia	2 (20)	5 (22,7)	**p = 0,229
Reumatoidalne zapalenie stawów	4 (40)	7 (31,8)	**p = 0,513
Leukopenia	5 (50)	6 (27,3)	**p = 0,184
Niedokrwistość	3 (30)	6 (27,3)	**p = 0,600
Neutropenia	7 (70)	22 (100)	**p = 0,01
Ciężka neutropenia	3 (30)	13 (59,1)	***p = 0,104
Małopłytkowość	4 (40)	8 (36,5)	**p = 0,568
Limfocytoza z T-LGL > 4 × 10 ⁹ /l	5 (50)	12 (54,5)	***p = 0,862
Limfocytoza z T-LGL > 2 × 10 ⁹ /l	6 (60)	20 (62,5)	**p = 0,585
Fenotyp CD4 ⁻ /CD8 ⁻	4 (40)	0/21 (0)	**p = 0,007
Fenotyp CD4 ⁻ /CD8 ⁺	4 (40)	21/21 (100)	**p = 0,000
Ekspresja CD56	5/9 (55,5)	2/20 (10)	**p = 0,020
Ekspresja CD57	4/8 (50)	19 (86,3)	**p = 0,059
Ekspresja CD16	7/9 (77,8)	17/18 (94,4)	**p = 0,250

*test t-Studenta; **dokładny test Fishera; *** χ^2 Pearsona

łaczki różniły się ekspresją antygenów CD4/CD8. Komórki białaczki TCR $\gamma\delta^+$ częściej charakteryzowały się brakiem obu antygenów CD4 i CD8 w porównaniu z przypadkami TCR $\alpha\beta^+$, gdzie fenotyp CD4⁻/CD8⁻ nie pojawił się u żadnego chorego. Fenotyp CD4⁻/CD8⁺ występował w 40% przypadków białaczki TCR $\gamma\delta^+$. U chorych na białaczkę TCR $\gamma\delta^+$ częściej pojawiała się ekspresja CD56. Nie wykazano różnic w obrazie histopatologicznym w obu podtypach. Pomimo braku cytotoksycznego

fenotypu i ekspresji CD8 w 3/5 przypadków białaczki T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ w badaniach immunohistochemicznych szpiku występował dodatni odczyn z granzymem B. Fenotyp komórek białaczki T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ był następujący: CD2⁺(60%), CD3⁺(80%), CD4⁻(90%), CD5^{+/-dim}(60%), CD7^{+/-dim}(50%), CD8⁻(50%), CD16^{+/-}(56%), CD56^{+/-}(44%), CD57⁻(50%).

III. Ekspresję CD56 stwierdzono w badaniach cytometrycznych w 7/29 badanych przypadków (24%) białaczki T-LGL. Antygen ten występował na

wszystkich komórkach białaczkowych u jednego chorego z wysoką limfocytozą z T-LGL ($19,6 \times 10^9/l$). Chory ten zmarł po 15 miesiącach obserwacji, a przyczyną zgonu było zapalenie płuc związane z neutropenią. U pozostałych 6 chorych antygen CD56 był obserwowany na części komórek białaczkowych. Obraz kliniczny i wyniki badań laboratoryjnych tych chorych były porównywalne do przypadków białaczki bez ekspresji tego antygenu. Charakteryzowali się oni również łagodnym przebiegiem klinicznym. Nie obserwowano progresji splenomegalii, powiększenia węzłów chłonnych, czy też objawów ogólnych ani wysokiej leukocytozy.

4.4. Wyniki badań genetycznych

U 12 chorych nie wykazano monoklonalnych rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*, co przemawiało za poliklonalną, odczynową limfocytozą z T-LGL.

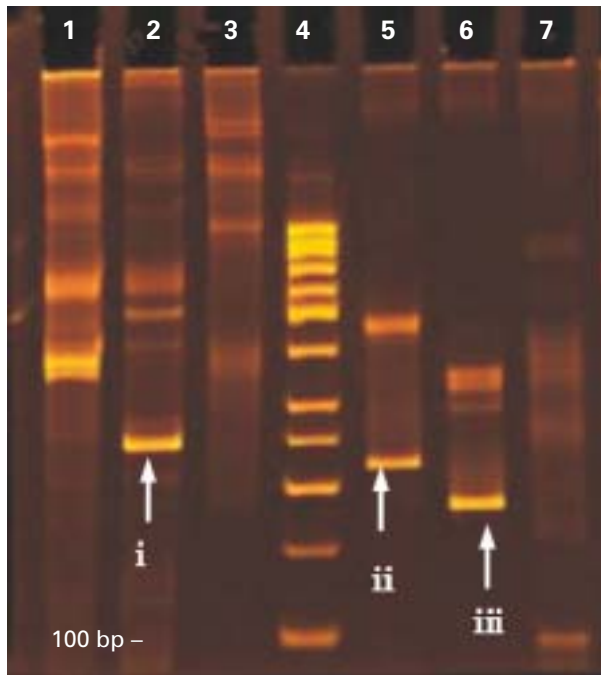
Rearanżacje genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR* potwierdzające monoklonalność limfocytów T wykryto u 34 badanych chorych (ryc. 4.4.1).

U 18 chorych (53%) wykryto rearanżacje genów kodujących tylko łańcuchy beta i gamma. U 6 chorych (18%) wykazano rearanżacje genów kodujących łańcuchy beta, gamma i delta, u 7 (21%) rearanżacje genów kodujących tylko łańcuchy gamma i delta, a u 3 chorych (9%) rearanżacje genów kodujących tylko łańcuchy beta (tab. 4.4.1).

Zakres rearanżacji poszczególnych regionów genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR* był różnorodny, jednak najczęściej, bo u 28 chorych (82%), ulegał rearanżacji region $V_{\gamma}If, V_{\gamma}10-J_{\gamma}$. U 13 chorych (38%) wykryto biklonalne lub bialleliczne produkty rearanżacji genów *TCR* (tab. 4.4.2).

U 6 chorych (18%) na białaczkę T-LGL z obecnością morfologicznie i immunofenotypowo odczynowych nacieków z małych limfocytów B w trepanobiopsji szpiku (w postaci grudek chłonnych u 5 chorych i nacieków rozproszonych u 1 chorego) rearanżacji genów *TCR* towarzyszyły rearanżacje genów kodujących regiony zmienne jednego lub dwóch łańcuchów lekkich immunoglobulin: kappa lub/i lambda (ryc. 4.4.2). Trzech z tych chorych miało chorobę autoimmunologiczną. U żadnego z nich w ciągu 5–16 miesięcy obserwacji nie rozwinął się chłoniak z komórek B.

U jednej chorej rozpoznano biklonalną białaczkę T-LGL z biklonalnymi produktami genów *TCRG* i *TCRD* oraz dwoma różnymi fenotypowo klonami zidentyfikowanymi w badaniu metodą cytometrii przepływowej (ryc. 4.4.3).



Rycina 4.4.1. Wynik elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z rozdziałem produktów multipleks PCR i analizy heterodupleksowej wykazujący monoklonalną rearanżację genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR* u chorej na białaczkę T-LGL. Ścieżki: 1) rearanżacja *TCRB-A* — wynik ujemny (poliklonalny); 2) rearanżacja *TCRB-B* — wynik dodatni, monoklonalny produkt 250 bp (i); 3) rearanżacja *TCRB-C* — wynik ujemny; 4) wzorzec wielkości 50 bp; 5) rearanżacja *TCRG-A* — wynik dodatni, monoklonalny produkt 230 bp (ii); 6) rearanżacja *TCRG-B* — wynik dodatni, monoklonalny produkt 180 bp (iii); 7) rearanżacja *TCRD* — wynik ujemny

Jeden chory poza rearanżacją genów *TCR* w populacji komórek odpowiadającej białaczce T-LGL wykazywał jednocześnie rearanżacje genów łańcuchów ciężkich i lekkich *IG* w populacji komórek morfologicznie i fenotypowo odpowiadających przewlekłej białaczce limfocytowej. U dwóch chorych z poliklonalną, odczynową limfocytozą z T-LGL wykazano rearanżacje genów kodujących części zmienne łańcuchów ciężkich, jak i lekkich immunoglobulin. W ciągu 2 lat obserwacji u jednego z nich rozwinął się chłoniak strefy brzeżnej.

W grupie 15 chorych na RZS z towarzyszącą neutropenią, u których rozpoznano zespół Felty'ego, obserwowano cały zakres limfocytozy z T-LGL, od poliklonalnej — poprzez oligoklonalną i monoklonalną, aż do białaczki T-LGL. Pięciu chorych spełniało kryteria diagnostyczne dla białaczki T-LGL, z bezwzględną liczbą T-LGL $> 2 \times 10^9/l$ i obecnością

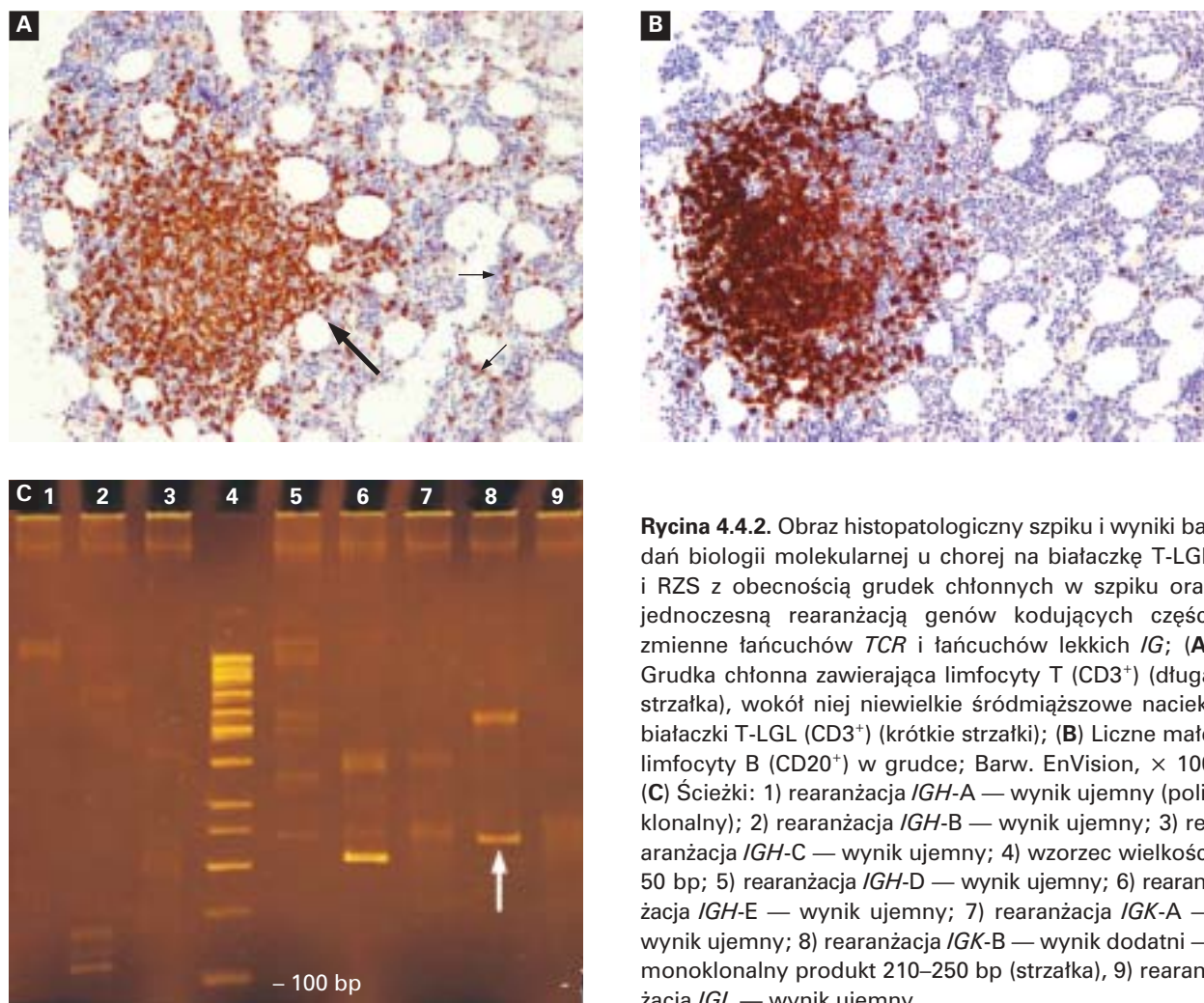
Tabela 4.4.1. Częstość występowania rearanżacji genów kodujących części zmienne poszczególnych łańcuchów receptora TCR u 34 chorych na białaczkę T-LGL

Rodzaj rearanżacji	Tylko β	Tylko $\beta + \gamma$	$\beta + \gamma + \delta$	Tylko $\gamma + \delta$
Częstość rearanżacji, n (%)	3 (9%)	18 (53%)	6 (18%)	7 (21%)

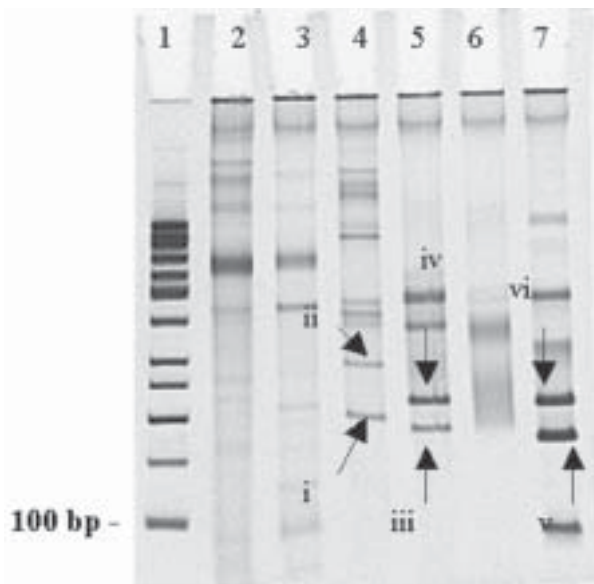
Tabela 4.4.2. Częstość występowania rearanżacji poszczególnych regionów genów kodujących części zmienne łańcuchów receptora TCR u 34 chorych na białaczkę T-LGL

Rodzaj rearanżacji	TCRB			TCRG		TCRD
	$V_{\beta}-J_{\beta 1}, J_{\beta 2}$	$V_{\beta}-J_{\beta 2}$	$D_{\beta 1}, D_{\beta 2}-J_{\beta}$	$V_{\gamma} J_{\gamma}, V_{\gamma 10}-J_{\gamma}$	$V_{\gamma 9}, V_{\gamma 11}-J_{\gamma}$	$V_{\delta}, D_{\delta 2}-J_{\delta}, D_{\delta 3}$
Częstość rearanżacji n (%)	19 (56%) b-2	15 (44%)	19 (56%) b-2	28 (82%) b-8	12 (35%) b-2	13 (38%) b-5

b — biklonalny lub bialleliczny



Rycina 4.4.2. Obraz histopatologiczny szpiku i wyniki badań biologii molekularnej u chorej na białaczkę T-LGL i RZS z obecnością grudek chłonnych w szpiku oraz jednoczesną rearanżacją genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR i łańcuchów lekkich IG; (A) Grudka chłonna zawierająca limfocyty T (CD3⁺) (długa strzałka), wokół niej niewielkie śródmiąższowe nacieki białaczki T-LGL (CD3⁺) (krótkie strzałki); (B) Liczne małe limfocyty B (CD20⁺) w grudce; Barw. EnVision, × 100 (C) Ścieżki: 1) rearanżacja IGH-A — wynik ujemny (poliklonalny); 2) rearanżacja IGH-B — wynik ujemny; 3) rearanżacja IGH-C — wynik ujemny; 4) wzorzec wielkości 50 bp; 5) rearanżacja IGH-D — wynik ujemny; 6) rearanżacja IGH-E — wynik ujemny; 7) rearanżacja IGK-A — wynik ujemny; 8) rearanżacja IGK-B — wynik dodatni — monoklonalny produkt 210–250 bp (strzałka), 9) rearanżacja IGL — wynik ujemny



Rycina 4.4.3. Biklonalna białaczka T-LGL $TCR\gamma\delta^+$. Elektroforyza produktów PCR w badaniu rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*. Ścieżki: 1) wzorzec wielkości 50 bp; 2) rearanżacja *TCRB-A* — wynik ujemny; 3) rearanżacja *TCRB-B* — wynik ujemny; 4) *TCRB-C* — wynik dodatni — biklonalne produkty 200 bp i 290 bp (i, ii); 5) rearanżacja *TCRG-A* — wynik dodatni, biklonalne produkty 180 i 220 bp (iii, iv); 6) rearanżacja *TCRG-B* — wynik ujemny; 7) rearanżacja *TCRD* — wynik dodatni, biklonalne produkty 170 i 220 bp (v, vi)

rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCRB*, *TCRG* i *TCRD*. W szpiku występowały typowe dla białaczki śródmiąższowe i wewnątrz-zatokowe nacieki z limfocytów T wykazujące ekspresję CD3, CD8, CD57 i granzymu B, a w badaniach FCM limfocyty T charakteryzowały się nieprawidłową ekspresją antygenów CD5, CD7 i CD43. Dziewięciu chorych miało względną limfocytozę T-LGL, ale bezwzględna limfocytoza była mniejsza niż $2 \times 10^9/l$ (zakres $0,5-1,9 \times 10^9/l$). U chorych tych obserwowano typowe dla rozrostów monoklonalnych rearanżacje genów *TCR* i charakterystyczny fenotyp komórek. W szpiku przeważały nacieki śródmiąższowe, a w badaniach FCM obserwowano nieprawidłową ekspresję antygenów komórek T. U jednego chorego uchwycono cechy monoklonalnej transformacji w obrębie poliklonalnej limfocytozy. W badaniu PCR w poliklonalnym tle obecny był monoklonalny produkt rearanżacji regionu $V\gamma_9, V\gamma_{11}-J\gamma$ genu *TCRG*. W szpiku obecne były obfite śródmiąższowe nacieki z komórek T $CD3^+/CD4^-/CD8^+$ /granzym $B^+/TCR\gamma\delta^+$ (ryc. 4.4.4).

Trzech chorych bez klonalnej rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*

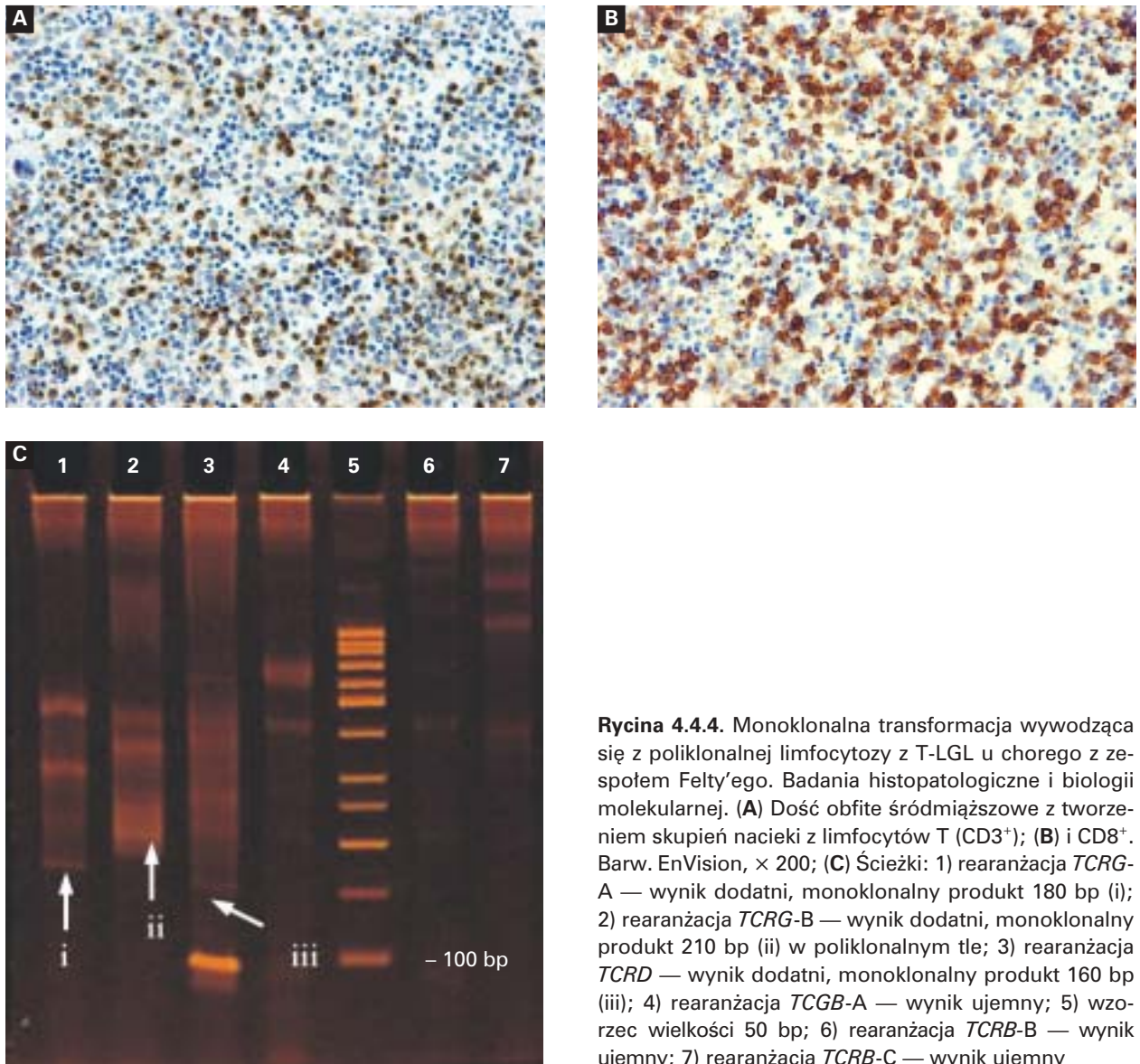
to przykład odczynowej, poliklonalnej limfocytozy z T-LGL związanej z chorobą autoimmunologiczną. W szpiku obecne były rozproszone T-LGL o fenotypie $CD3^+/CD4^-/CD8^+/CD57^{+/-}$ /granzym $B^{+/-}/TCR\alpha\beta^+$, które w badaniach FCM wykazywały prawidłową ekspresję antygenów pan-T limfocytów, co odpowiadało poliklonalnej limfocytozie.

Chorzy na białaczkę T-LGL z towarzyszącą chorobą autoimmunologiczną różnili się od chorych na białaczkę T-LGL bez choroby współistniejącej obrazem klinicznym i zmianami w badaniach laboratoryjnych. Istotnie częściej występowało u nich powiększenie śledziony, autoprzeciwciała, hiper-gammaglobulinemia poliklonalna i leukopenia. Ponadto w pierwszej grupie zanotowano istotnie większą liczbę chorych z ciężką neutropenią, chociaż częstość pojawiania się nawracających zakażeń była podobna w obu grupach. U chorych na białaczkę T-LGL z chorobą autoimmunologiczną średnia liczba krążących T-LGL była istotnie niższa, jak i mniejsza liczba chorych wykazywała wartości limfocytozy z T-LGL większe niż $2 \times 10^9/l$. Trzynastu z 21 (62%) chorych z chorobą autoimmunologiczną nie spełniało kryterium ilościowego rozpoznania białaczki z T-LGL, w tym 10 chorych z powodu leukopenii. Obraz histopatologiczny i immunofenotypowy szpiku był podobny w obu grupach (tab. 4.4.3). Nie wykazano różnic w częstości występowania rearanżacji poszczególnych regionów genów kodujących części zmienne łańcuchów receptora *TCR* (tab. 4.4.4).

Badania metodą klasycznej cytogenetyki polegające na ocenie kariotypu metodą prążkową u 15 badanych chorych na białaczkę T-LGL wykazały prawidłowy kariotyp.

4.5. Obserwacja i leczenie

Dane dotyczące leczenia przeanalizowano u 29/42 chorych na białaczkę T-LGL. Informacje dotyczące leczenia pozostałych 13 chorych nie były dostępne. Przyczyną rozpoczęcia leczenia były cytopenie, to znaczy neutropenia i niedokrwistość, jak również nawracające zakażenia, powiększenie śledziony i zapalenie stawów. Stosowano cyklosporynę A (CSA), metotreksat (MTX), steroidy i czynnik stymulacyjny kolonii granulocytowych (G-CSF). Odpowiedź na leczenie zaobserwowano u 61% chorych. Dziewięciu chorych leczono CSA w postaci doustnej (2–3 mg/kg dziennie), 5 w monoterapii, 4 w połączeniu z prednizonem i G-CSF przez średnio 7,4 miesiąca (zakres 5–15 miesięcy). U jednej chorej leczonej CSA, prednizonem i G-CSF osiągnięto całkowitą remisję hematologiczną (CHR), a u pozostałych 8 chorych częściową odpowiedź (PR). U jednego chorego przed leczeniem CSA wy-



Rycina 4.4.4. Monoklonalna transformacja wywodząca się z poliklonalnej limfocytozy z T-LGL u chorego z zespołem Felty’ego. Badania histopatologiczne i biologii molekularnej. **(A)** Dość obfite śródmiąższowe z tworzeniem skupień nacieków z limfocytów T ($CD3^+$); **(B)** i $CD8^+$. Barw. EnVision, $\times 200$; **(C)** Ścieżki: 1) rearanżacja *TCRG-A* — wynik dodatni, monoklonalny produkt 180 bp (i); 2) rearanżacja *TCRG-B* — wynik dodatni, monoklonalny produkt 210 bp (ii) w poliklonalnym tle; 3) rearanżacja *TCRD* — wynik dodatni, monoklonalny produkt 160 bp (iii); 4) rearanżacja *TCGB-A* — wynik ujemny; 5) wzorzec wielkości 50 bp; 6) rearanżacja *TCRB-B* — wynik ujemny; 7) rearanżacja *TCRB-C* — wynik ujemny

konano splenektomię. U 8 chorych zastosowano małe doustne dawki MTX (7,5 do 15 mg tygodniowo) przez 1 do 36 miesięcy (średnio 12,5 miesiąca). Pięciu chorych otrzymywało jednocześnie prednizon (5 do 40 mg dziennie), a 2 dodatkowo G-CSF. U 5/8 chorych uzyskano PR. Tylko prednizon (5–20 mg dziennie) przez 5 do 35 miesięcy (średnio 16,7) otrzymywało 8 chorych, 6 jako kontynuację leczenia zapalenia stawów. Nie zaobserwowano u nich żadnej odpowiedzi hematologicznej (NR), ale niedokrwistość, nawracające zakażenia i zapalenie stawów było kontrolowane. U dwóch chorych zastosowano chlorambucil 2 mg dziennie przez 5 miesięcy i uzyskano PR. Jedna chora otrzymywała cyklofosfamid 450 mg przez 3 dni z dobrym efektem (PR). Jedna chora pozostawała 5 lat bez leczenia,

bez powikłań związanych z neutropenią i bez progresji choroby (tab. 4.5.1).

W chwili zakończenia badania średni okres obserwacji 29 chorych wynosił 17 miesięcy (zakres 1–60 miesięcy) i u większości chorych choroba miała łagodny przebieg. Trzech chorych zmarło: dwóch z powodu ciężkiego bakteryjnego zapalenia płuc, będącego wynikiem związanej z białaczką neutropenii. Jedna chora zmarła z powodu wtórnej amyloidozy AA nerek, jako powikłania długotrwałego RZS, a więc nie z powodu choroby podstawowej.

5. Dyskusja

Praca zawiera wyniki kompleksowych badań 43 chorych na białaczkę T-LGL i 12 z odczynową lim-

Tabela 4.4.3. Obraz kliniczny oraz wybrane cechy histopatologiczne i immunofenotypowe u chorych na białaczkę T-LGL ze współistniejącą chorobą autoimmunologiczną oraz u chorych na białaczkę T-LGL bez choroby towarzyszącej

	Białaczka T-LGL z chorobą autoimmunologiczną n (%)	Białaczka T-LGL bez choroby towarzyszącej n (%)	p
Liczba chorych	21	21	
Wiek, średnia (zakres) w latach	59,7 ± 15,7 (28–85)	61,6 ± 14,2 (33–87)	*p = 0,772
Płeć: kobiety/mężczyźni	18/3	11/10	**p = 0,019
Powiększenie śledziony	13 (62)	5 (24)	**p = 0,013
Nawracające zakażenia	6 (29)	5 (24)	**p = 0,726
Czynnik reumatoidalny	17/19 (89)	2/13 (15)	**p = 0,000
Przeciwciała przeciwjądrowe	18/20 (90)	2/14 (14)	**p = 0,000
Hipergammaglobulinemia poliklonalna	17 (81)	9/19 (47)	**p = 0,026
Leukopenia	10 (48)	4 (19)	**p = 0,0495
Niedokrwistość	5/21 (24)	7 (33)	**p = 0,495
Neutropenia	21 (100)	18 (86)	***p = 0,116
Ciężka neutropenia	15 (71)	7 (33)	**p = 0,013
Małopłytkowość	9/20 (45)	6/20 (30)	**p = 0,327
Liczba T-LGL, średnia (zakres) × 10 ⁹ /l	2,8 ± 2,6 (0,5–11,4)	7,5 ± 6,3 (1,4–26,9)	*p = 0,000
Limfocytoza z T-LGL > 2 × 10 ⁹ /l	8 (38)	18 (86)	**p = 0,001
Stopień zajęcia szpiku przez nacieki T-LGL	38%	33%	*p = 0,579
Nacieki wewnątrzrzatokowe	11/19 (58)	11/15 (73)	**p = 0,350
Fenotyp CD4 ⁺ /CD8 ⁻	13/18 (72)	14/15 (93)	**p = 0,133
Ekspresja CD57	15/18 (83)	13/15 (87)	**p = 0,591
Ekspresja granzymu B	15/18 (83)	14/15 (93)	**p = 0,374
Zmniejszona liczba prekursorów granulocytów	11/19 (58)	7/15 (47)	**p = 0,515
Grudki chłonne	10/19 (53)	9/15 (60)	**p = 0,667

*test Manna-Whitneya; ** χ^2 Pearsona; ***dokładny test Fishera**Tabela 4.4.4.** Porównanie częstości występowania rearanżacji regionów genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR u 15 chorych na białaczkę T-LGL ze współistniejącą chorobą autoimmunologiczną i 19 chorych na białaczkę T-LGL bez choroby towarzyszącej

Rodzaj rearanżacji	TCRB			TCRG		TCRD
	V β -J β 1, J β 2	V β -J β 2	D β 1, D β 2-J β	V γ If, V γ 10-J γ	V γ 9, V γ 11-J γ	V δ , D δ 2-J δ , D δ 3
Białaczka T-LGL i choroba autoimmunologiczna	67% (10)	47% (7)	60% (9)	80% (12)	33% (5)	33% (5)
Częstość rearanżacji % (n)						
Białaczka T-LGL bez choroby współistniejącej	47% (9)	42% (8)	53% (10)	84% (16)	37% (7)	42% (8)
Częstość rearanżacji % (n)						
P	*p = 0,260	*p = 0,790	*p = 0,667	**p = 0,548	*p = 0,832	*p = 0,601

* χ^2 Pearsona; **dokładny test Fishera

focytozą z T-LGL, uwzględniające korelacje cech klinicznych, histopatologicznych, immunofenotypowych i genetycznych. Jest to pierwsze w krajowym

piśmiennictwie i jedno z niewielu oryginalnych opracowań w literaturze światowej dotyczące stosunkowo dużej grupy chorych z tą chorobą oraz

Tabela 4.5.1. Odpowiedź na leczenie u 28 chorych na białaczkę T-LGL

Leczenie	Liczba chorych	Czas leczenia w miesiącach (zakres)	Liczba CHR	Liczba PR	Całkowita odpowiedź na leczenie
MTX	3	9,7 ± 9,8 (4–21)	0	1	5/8
MTX + prednizon	5	14,2 ± 15 (1–36)	0	4	
CSA	5	7, 8 ± 4,5 (5–15)	0	5	9/9
CSA + prednizon	4	7 ± 3,1 (5–10)	1	3	
Prednizon	8	16,7 ± 9,3 (5–35)	0	0	0/8
Chlorambucil	2	5 (5–5)	0	2	2/2
Cyklofosfamid	1	3 dni	0	1	1/1

CHR — całkowita odpowiedź hematologiczna; CSA — cyklosporyna A; MTX — metotreksat, PR — odpowiedź częściowa

podnoszące różne jej aspekty. W piśmiennictwie światowym największa praca pochodząca z Mayo Clinic, opublikowana w formie streszczenia zjazdowego, dotyczyła klinicznych czynników prognostycznych u 286 chorych [129]. Inni autorzy [7, 9, 10, 13, 14, 119, 124] badali mniejsze grupy chorych i koncentrowali się na wybranych zagadnieniach dotyczących białaczki T-LGL. W polskiej literaturze w latach 1991–2008 opublikowano 4 doniesienia kazuistyczne opisujące łącznie 7 chorych na białaczkę T-LGL [11, 130–132] i pojedyncze prace poglądowe [93, 133–137].

Na ogół uważa się, że limfocytoza z T-LGL, która może być zarówno odczynowa, jak i oligoklonalna/monoklonalna, lub też reprezentować objawową białaczkę, występuje rzadko [2]. Wydaje się, że wynika to z małej wiedzy o tej jednostce chorobowej jako przyczynie niewyjaśnionej neutropenii i limfocytozy, towarzyszącej różnym chorobom autoimmunologicznym i układu krwiotwórczego [8]. Dowodem na niedoszacowanie częstości występowania tej choroby są ostatnio opublikowane badania przesiewowe dużych grup osób, u których stwierdzono występowanie zwiększonej liczby, głównie poliklonalnych, ale i oligo/monoklonalnych T-LGL. Roden i wsp. [68] w badaniach cytometrycznych krwi obwodowej stwierdzili u 62//352 kolejno badanych osób (18%) poliklonalną, głównie bezobjawową limfocytozę z T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ o wartościach wyższych niż $0,2 \times 10^9/l$, T-LGL stanowiły więcej niż 5% wszystkich limfocytów. U części tych chorych obserwowano współistnienie zakażeń, przewlekłych chorób zapalnych, autoimmunologicznych i limfoproliferacyjnych. Stwierdzono ją także u chorych, którzy wcześniej przebyli splenektomię. W 2 przypadkach obecna była rearanżacja genów *TCR*. Z kolei z 870 osób przesiewowo badanych przez Scotta i wsp. [32], 269 (31%) wykazywało zwiększony odsetek ($> 25\%$) lub zwiększoną bez-

względną liczbę ($> 1 \times 10^9/l$) komórek NK/LGL. Klonalność stwierdzono u 16 z 58 badanych osób. Po 3 latach obserwacji 112 osób miało przewlekłą limfocytozę, która u większości nie wymagała leczenia i nie ulegała progresji, chociaż w części przypadków związana była z neutropenią i zapalnymi chorobami tkanki łącznej. Dowodem na to, że limfocytoza z T-LGL pojawia się częściej, niż zwykle się uważa, jest doniesienie Sabnani i wsp. [138] z 2006 roku. Stwierdzili oni monoklonalną limfocytozę z T-LGL określoną jako TCUS u chorych z niewyjaśnionymi, niewielkimi zaburzeniami hematologicznymi typu nieznacznej niedokrwistości, neutropenii i małopłytkowości, którzy nie mieli pełnych objawów klinicznych białaczki T-LGL. Występowanie proliferacji z T-LGL jedynie u 0,4% chorych z podejrzeniem limfoproliferacji i/lub z cytopenią we własnym materiale histopatologicznym może świadczyć albo o rzadkości tego zjawiska, albo być spowodowane brakiem wskazań do wykonywania badań immunohistochemicznych w przypadkach klinicznie bezobjawowych.

Rozpoznanie białaczki T-LGL powinno być brane pod uwagę u wszystkich chorych z niewyjaśnioną cytopenią i zwiększoną liczbą LGL w badaniu cytomorfologicznym i/lub cytometrycznym. Jednak kryteria diagnostyczne białaczki T-LGL odnośnie liczby T-LGL są ciągle przedmiotem dyskusji. Według klasyfikacji WHO z 2008 roku [6] wykrycie monoklonalnej limfocytozy z T-LGL $> 2 \times 10^9/l$ jest ważną cechą diagnostyczną. W badaniu własnym wzrost liczby T-LGL $> 2 \times 10^9/l$ obserwowano u 64% chorych, a połowa z nich miała wysokie wartości limfocytozy z T-LGL ($> 4 \times 10^9/l$). Jednakże w 36% przypadków bezwzględna liczba T-LGL była niższa, głównie z powodu leukopenii. To kryterium diagnostyczne jest zatem nieprzydatne u chorych ze względną monoklonalną limfocytozą i towarzyszącą leukopenią, co może zdarzyć się w tej chorobie. Semenzato i wsp. [124] opisali 9 chorych

z limfocytozą z T-LGL o wartościach od 0,5 do $2 \times 10^9/l$ z klinicznymi i laboratoryjnymi cechami białaczki T-LGL. Podkreślili fakt, że nie sama liczba limfocytów T-LGL jest decydująca do rozpoznania białaczki T-LGL, ale całościowa analiza danych klinicznych, immunopatologicznych i molekularnych.

Obraz kliniczny obecnie badanej grupy chorych na białaczkę T-LGL był podobny do opisywanego wcześniej w literaturze [7, 9, 10, 13]. Większość przypadków charakteryzowała się łagodnym przebiegiem. U 71% chorych na białaczkę T-LGL obserwowano objawy kliniczne, takie jak osłabienie (19%), nawracające zakażenia głównie dróg oddechowych (26%), powiększenie śledziony (43%) i zmiany skórne (12%). U wszystkich chorych stwierdzono przewlekłe cytopenie: neutropenię, leukopenię, niedokrwistość i małopłytkowość.

Neutropenia występowała u 93% badanych chorych, w 52% przypadkach rozwinęła się ciężka neutropenia. Podobną częstość występowania neutropenii (74–84%) i agranulocytozy (40–48%) podawali inni autorzy [9, 13]. Uważa się, że wiele mechanizmów może brać udział w powstawaniu neutropenii w białaczce T-LGL. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że komórki białaczkowe rozpoznają komórki progenitorowe linii mieloidalnej i niszczą je zarówno w mechanizmie związanej z Fas/FasL apoptozy, jak i wywierają efekt supresyjny przez wydzielane cytokiny i chemokiny [71, 84, 116, 139, 140]. Jako inne przyczyny neutropenii wymienia się zaburzenia dojrzewania komórek linii mieloidalnej, niszczenie dojrzałych granulocytów na obwodzie przez przeciwciała i kompleksy immunologiczne oraz hipersplenizm [1, 7, 97]. Burks i Loughran [97] uważają, że obraz linii granulocytowej w szpiku, a szczególnie typ niszczonej komórki docelowej, może częściowo wyjaśniać przyczyny neutropenii. Zubożenie linii granulocytowej w szpiku sugeruje, że wczesne prekursorzy granulocytów są celem dla cytotoksycznych limfocytów T. Kompensacyjny rozrost linii granulocytowej z przesunięciem w lewo wskazuje, że niszczone są komórki bardziej dojrzałe. Badania trepanobiopsji szpiku we własnej grupie chorych wykazały zarówno zmniejszoną liczbę prekursorów granulocytów w 53% przypadków, jak i przesunięcie dojrzewania w lewo u 44% chorych, co jest zgodne z powyżej cytowanymi spostrzeżeniami oraz obserwacjami Morice i wsp. [21]. Przeciwciała ANCA obecne były jedynie u 2 z 17 badanych chorych na białaczkę T-LGL. Sugeruje to, że neutropenia w większym stopniu była wynikiem niszczenia granulocytów w szpiku w mechanizmie najprawdopodobniej komórkowym niż humoralnym na obwodzie. Należy

jednak zaznaczyć, że znaczenie kliniczne występowania ANCA jest niejasne. Wydaje się, że za pomocą rutynowo dostępnych testów nie wykrywa się ich we wszystkich przypadkach [141]. Udowodniono również, że przeciwciała te nie powodują znaczącego hamowania tworzenia kolonii komórek mieloidalnych, co neguje ich rolę jako ważnego czynnika w patogenezie neutropenii [141].

W przeprowadzonym badaniu wykazano związek pomiędzy występowaniem powiększenia śledziony a pojawianiem się leukopenii, co sugeruje udział śledziony w sekwestracji i niszczeniu leukocytów. Potwierdzają to obserwacje Rashba i wsp. [142] o poprawie parametrów hematologicznych po splenektomii u prawie 100% chorych z FS. Ostatnio opublikowane badania Subbiaha i wsp. [143] wykazały u chorych na białaczkę T-LGL z powiększoną śledzioną statystycznie częstsze występowanie bi- i pancytopenii. Autorzy ci zaobserwowali odpowiedź hematologiczną po splenektomii, pomimo utrzymujących się w szpiku nacieków białaczkowych. W mechanizmach patogenetycznych leuko- i granulocytopenii nie można również wykluczyć działania przeciwciał wytwarzanych przez pobudzoną immunologicznie śledzionę, w której obserwuje się rozrost grudek chłonnych z ośrodkami rozmnażania oraz liczne komórki plazmatyczne świadczące o produkcji immunoglobulin [29].

Pomimo że neutropenia pojawiała się u prawie wszystkich chorych, jedynie 26% chorych (w innych badaniach 15–39%) miało nawracające zakażenia, głównie układu oddechowego [9, 10, 13]. W przeciwieństwie zatem do neutropenii towarzyszącej innym chorobom rozrostowym układu krwiotwórczego, chorzy na białaczkę T-LGL mogą przez dłuższy czas nie mieć powikłań infekcyjnych. Chociaż monoklonalność T-LGL sugeruje zmniejszony zakres rozpoznawanych przez cytotoksyczne limfocyty T antygenów, to zakażenia oportunistyczne rzadko występują u tych chorych [10].

Niedokrwistość występowała u 29% chorych, czyli rzadziej niż w innych opracowaniach, gdzie jej częstość określano na około 50%. Ciężka, wymagająca przetoczeń niedokrwistość pojawiła się u 17% chorych, co jest zgodne z wcześniejszymi spostrzeżeniami [9, 13]. Podobnie jak w przypadku linii granulocytowej najbardziej prawdopodobny wydaje się mechanizm cytotoksycznego działania limfocytów T na prekursorzy linii erytroidalnej i niszczenia ich zarówno w wyniku związanej z Fas apoptozy, jak i przez wydzielane cytokiny [89, 144]. Uważa się, że białaczka T-LGL jest najczęstszą chorobą towarzyszącą aplazji czysto czerwonokrwinkowej (PRCA, *pure red cell aplasia*) i występuje u 8–

–19% tych chorych [104, 145]. We własnych badaniach, u połowy chorych na białaczkę T-LGL z towarzyszącą niedokrwistością, w trepanobiopsji szpiku obserwowano zmniejszenie liczby prekursorów linii erytroidalnej. Jednakże PRCA obecna była tylko u 1 chorej z poliklonalną limfocytozą z T-LGL. W badaniach Morice i wsp. [21] liczba erytroblastów w szpiku była najczęściej zwiększona, a według Osuji i wsp. [22] prawidłowa. U połowy badanych chorych występowały choroby autoimmunologiczne (głównie RZS), które leczone były latami niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi i lekami modyfikującymi przebieg choroby. Niedokrwistość miała zatem najprawdopodobniej złożony charakter i poza wpływem komórek białaczkowych na komórki linii czerwonej w szpiku była to niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych, niedokrwistość z niedoboru żelaza oraz niedokrwistość megaloblastyczna [146]. U żadnego z badanych chorych nie obserwowano opisywanej w piśmiennictwie autoimmunologicznej niedokrwistości hemolitycznej [103].

Umiarkowana małopłytkowość i powiększenie śledziony występowały w badanej grupie z częstością podobną do opisywanej w piśmiennictwie (odpowiednio 38% *v.* 19–36% i 43% *v.* 20–50%) [9, 10, 13]. Nie udało się wykazać związku między występowaniem małopłytkowości a obecnością powiększenia śledziony, co sugeruje, że prawdopodobne mechanizmy małopłytkowości w białaczkę T-LGL związane są nie tylko z sekwestracją płytek w powiększonej śledzionie. Małopłytkowość może być również wynikiem hamowania megakariopoezy w szpiku przez wykazujące właściwości cytotoksyczne komórki białaczkowe oraz związanym z przeciwciałami niszczeniem płytek na obwodzie w przypadkach współistniejących z immunologiczną małopłytkowością [7]. Jednak tylko u 2 z 13 badanych chorych z małopłytkowością obserwowano w szpiku zmniejszoną liczbę megakariocytów. W pozostałych przypadkach zarówno morfologia, jak i liczba megakariocytów były prawidłowe. Ponadto, tylko jedna z 10 badanych chorych miała przeciwciała przeciw płytkowe.

Badania wpływu wybranych parametrów morfologicznych i immunofenotypowych na występowanie nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych nie wykazały związku między stopniem zajęcia szpiku przez nacieki białaczkowe, typem nacieków białaczkowych (tylko śródmiąższowy *v.* śródmiąższowy i wewnątrztkankowy), czy też cytologicznym fenotypem limfocytów T (granzym B⁺ *v.* granzym B⁻) a pojawianiem się niedokrwistości, leukopenii, neutropenii, małopłytkowości. Inni autorzy również nie stwierdzili związku pomiędzy stopniem nacieczenia

szpiku przez komórki białaczkowe a nasileniem cytopenii [7, 9]. Wskazuje to na odmienną patogenezę cytopenii w białaczkę T-LGL w porównaniu z innymi chorobami limfoproliferacyjnymi, w których (np. w PBL) cytopenie związane są w większości przypadków z wypieraniem komórek układu krwiotwórczego przez nacieki z komórek białaczkowych i nasilają się wraz z rozwojem choroby [97].

Towarzyszące białaczkę T-LGL choroby autoimmunologiczne występowały u 50% badanych chorych. Najczęściej stwierdzono RZS (36%), autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (14%), nieklsyfikowalne zapalenie stawów (7%) oraz pojedyncze przypadki wtórnego zespołu Sjögrena, twardziny, mieszanej choroby tkanki łącznej i zapalenia naczyń. Częstość ich występowania była nieco wyższa niż określane w piśmiennictwie na 12–28% współistnienie białaczki z RZS [8–10, 13, 119]. Najprawdopodobniej było to wynikiem dokładnych badań w kierunku układowych chorób tkanki łącznej, jakie zostały przeprowadzone w badanej grupie chorych. Ciekawym spostrzeżeniem było występowanie u części chorych nieklsyfikowalnego zapalenia stawów, które przypominając zmiany stawowe spotykane w RZS, nie spełniało jego pełnych kryteriów. Wskazuje to na pewne odrębności w zmianach stawowych u chorych z artropatią i białaczką T-LGL, które nie zawsze spełniają pełne kryteria RZS.

Nieprawidłowości serologiczne polegające na obecności czynnika reumatoidalnego, przeciwciał przeciwjądrowych, antycytrulinowych, antykardiolipinowych i przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrocytów oraz hipergammaglobulinemii poliklonalnej obecne były u 71% badanych chorych, zarówno u tych, u których rozpoznano towarzyszącą chorobę autoimmunologiczną, jak i bez jej objawów. Występowanie przeciwciał antycytrulinowych w białaczkę T-LGL nie było do tej pory opisywane. Częstość pojawiania się nieprawidłowości serologicznych w białaczkę T-LGL określana jest w piśmiennictwie na 40–60% [10, 102, 147, 148].

Z całości przeprowadzonych badań wynika, że procesy związane z limfocytami B, zarówno odczynowe jak i nowotworowe, są ważną cechą białaczki T-LGL i wpływają na obraz kliniczny choroby. Wrazem odczynowej aktywacji limfocytów B u badanych chorych było częste współistnienie chorób autoimmunologicznych oraz występowanie humoralnych zaburzeń immunologicznych. Morfologicznym wykładnikiem autoimmunizacji i pobudzenia limfocytów B w szpiku były grudki chłonne, które obserwowano u więcej niż połowy badanych chorych. Za występowanie zjawisk autoimmunologicznych u chorych na białaczkę T-LGL odpowiedzialne są

prawdopodobnie zaburzenia w funkcjonowaniu limfocytów B, spowodowane działaniem na nie prozapalnych cytokin wytwarzanych przez monoklonalne T-LGL [140, 147]. Komórki białaczki T-LGL produkują po stymulacji fitohemaglutyniną duże ilości rozpuszczalnego receptora interleukiny-2 (sIL-2R), TNF- α , IL-6, IL-8 i IL-10 [149]. Wytwarzają również prozapalne chemokiny, takie jak RANTES, MIP1- α i MIP1- β [140]. Ponadto, pomimo cytotoksycznego fenotypu, *in vitro* komórki białaczki T-LGL nie hamują syntezy immunoglobulin przez pobudzone limfocyty B [9]. Hipotetyczna patogenezą białaczki T-LGL polegająca na przewlekłej stymulacji antygenowej jest podobna do występującej w chorobach autoimmunologicznych, co może oznaczać aktywację zarówno limfocytów T, jak i B do wytwarzania przeciwciał [74].

W badanej grupie chorych występowały też zjawiska świadczące o monoklonalnej transformacji i proliferacji limfocytów B. U prawie 1/5 badanych chorych na białaczkę T-LGL rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcuchów TCR towarzyszyły rearanżacje genów kodujących części zmienne łańcuchów lekkich kappa i/lub lambda IG charakteryzujące monoklonalne limfocyty B. Występowały one głównie w przypadkach z obecnością grudek chłonnych w szpiku. Jednakże u żadnego z tych chorych nie rozwinął się w ciągu 5–16 miesięcy obserwacji chłoniak z komórek B. Występowanie rearanżacji genów IG u chorych na białaczkę T-LGL bez towarzyszącej limfoproliferacji z komórek B nie było dotąd opisywane w literaturze. Obecność takich rearanżacji, mimo braku objawów klinicznych, morfologicznych i immunofenotypowych chłoniaka, może wyprzedzać rozwój limfoproliferacji z komórek B. Wykrycie rearanżacji genów IG wymaga zatem okresowej kontroli chorych na białaczkę T-LGL w kierunku rozwoju chłoniaka z komórek B. Sytuację taką obrazuje chora z poliklonalną limfocytozą T-LGL, u której początkowo obserwowano niewielką liczbę monoklonalnych limfocytów B, a po 2 latach obserwacji rozwinął się u niej chłoniak strefy brzeżnej najprawdopodobniej pierwotny śledziony. U jednego z badanych chorych obecne były jednocześnie dwa monoklonalne rozrosty z komórek B i T, to jest PBL i białaczka T-LGL. Viny i wsp. [108] zwrócili uwagę na zwiększoną częstość występowania dyskrazji z komórek B u chorych na białaczkę T-LGL. Pojawiły się one u 43% chorych i polegały na występowaniu hiper- lub hipogammaglobulinemii poliklonalnej (16% przypadków), gammapatii monoklonalnej (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*) (19%) i PBL (8% chorych). Z przeprowadzonego przez tych autorów

przeglądu piśmiennictwa wynika, że z białaczką T-LGL najczęściej współistnieje białaczka włochatokomórkowa, MGUS, PBL i chłoniak Hodgkina. W większości przypadków obie choroby rozpoznano jednocześnie. Takie współistnienie proliferacji z komórek B i T sugeruje istnienie wspólnego czynnika antygenowego, który może stymulować początkowo poliklonalny, a potem monoklonalny rozrost zarówno limfocytów T, jak i B. Inna hipoteza tłumaczy to zjawisko przez regulatorową rolę limfocytów B i T w kontroli rozrostu nowotworowego. Komórki białaczki T-LGL mogą stanowić element immunologicznego systemu kontroli wzrostu nowotworów w stosunku do monoklonalnych rozrostów z komórek B. Z drugiej strony monoklonalne T-LGL mogą stanowić czynnik wyzwalający działanie regulatorowe limfocytów B [108].

Z przeprowadzonych badań wynika, że chorzy z objawową odczynową limfocytozą z T-LGL charakteryzowali się obrazem klinicznym i nieprawidłowościami w badaniach laboratoryjnych podobnymi do obserwowanych u chorych na białaczkę T-LGL. Oznacza to, że w badanej grupie chorych klonalność nie była czynnikiem wpływającym na inny obraz kliniczny. Dotyczyło to podobnej częstości występowania towarzyszących chorób autoimmunologicznych, nawracających zakażeń, powiększenia śledziony, autoprzeciwciał, niedokrwistości, leukopenii i małopłytkowości. Wyjątkiem była mniejsza liczba obwodowych T-LGL nieprzekraczająca wartości $2 \times 10^9/l$ i rzadziej występująca neutropenia u chorych z odczynową limfocytozą T-LGL. Podobnie jak w doniesieniach innych autorów, w badanej grupie chorych objawowa poliklonalna limfocytoza pojawiała się w przebiegu chorób autoimmunologicznych, towarzyszyła powszechnemu zmiennemu niedoborowi odporności lub występowała po przeszczepie wątroby [21, 32, 67, 68, 150].

W badaniach Białaczkowej Grupy z Yorkshire [32] wykazano, że zarówno klonalne, jak i nieklonalne przetrwałe proliferacje LGL/NK CD3⁺ mogą mieć podobną prezentację kliniczną z występowaniem neutropenii i towarzyszących układowych chorób tkanki łącznej, chociaż zdecydowanie częściej występują one u chorych z rearanżacją genów TCR. W 2008 roku Włodarski i wsp. [150] wykazali, że całe spektrum proliferacji z cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺, od poliklonalnych do oligo- i monoklonalnych, może być przyczyną przewlekłej neutropenii. Sugeruje to, że również poliklonalne T-LGL, które są limfocytami cytotoksycznymi, mogą mieć wpływ na hemopoezę i powodować cytopenie. Potwierdzają to również obserwacje Holma i wsp. [67], którzy donoszą o występowaniu poliklonalnej

limfocytozy LGL CD8⁺ u prawie połowy chorych z powszechnym zmiennym niedoborem odporności, któremu klinicznie towarzyszyło powiększenie śledziony, neutropenia i zwiększony poziom rozpuszczalnego ligandu Fas. W obu badanych grupach chorych z poliklonalną limfocytozą i białaczką T-LGL w badaniu histopatologicznym szpiku obraz wszystkich trzech linii krwiotworzenia był podobny. Dotyczyło to również częstości występowania zubożonej linii granulocytowej, z cechami przesunięcia w lewo, co sugeruje podobny jak w białaczce T-LGL mechanizm patogenetyczny. Interesującym przypadkiem, potwierdzającym, że również poliklonalne T-LGL mogą wywoływać cytopenie, było współistnienie PRCA z poliklonalną limfocytozą z T-LGL CD4⁺/CD8^{+/-}.

Pomimo podobnego obrazu klinicznego chorzy na białaczkę T-LGL i chorzy z odczynową limfocytozą różnił się architekturą nacieków z limfocytów T w trepanobiopsji szpiku i występowaniem zaburzeń ekspresji antygenów pan-T w badaniach immunofenotypowych. Spostrzeżenia te zostaną omówione poniżej.

Poznanie obrazu histopatologicznego szpiku w proliferacjach z T-LGL ma duże znaczenie praktyczne, ponieważ istnieją choroby nowotworowe, jak i odczynowe, które klinicznie i niekiedy morfologicznie przypominają obraz białaczki T-LGL. Trepanobiopsje wykonywane są często u chorych z cytopenią, co jest zarówno cechą białaczki T-LGL, jak i zespołów mielodysplastycznych (MDS, *myelodysplastic syndrome*). Nieuwzględnienie białaczki T-LGL w diagnostyce różnicowej cytopenii, subtelny typ naciekania szpiku oraz zahamowanie dojrzewania linii granulocytowej mogą spowodować błędne rozpoznanie MDS. Z kolei w MDS, oprócz charakterystycznych dla rozpoznania zaburzeń dojrzewania komórek krwiotwórczych, mogą pojawić się oligo- i monoklonalne nacieki z T-LGL, u części chorych spełniające kryteria białaczki [151, 152, 153]. Rozważa się nawet znaczenie monoklonalnych nacieków z T-LGL w patogenezie MDS [107, 151, 152]. Podobna sytuacja może zaistnieć w przypadku aplazji czysto czerwonej [104] czy niedokrwistości aplastycznej [105, 153], gdzie również mogą pojawić się nacieki z monoklonalnych T-LGL. Udowodniono udział T-LGL w patogenezie tych jednostek chorobowych [104, 105]. Ponieważ odczynowe grudki chłonne są lepiej widoczne w rutynowym barwieniu HE niż nacieki białaczkowe, obraz histopatologiczny białaczki T-LGL bywa mylony ze zmianami zapalnymi pojawiającymi się w szpiku w przebiegu nieswoistych zakażeń i chorób autoimmunologicznych [154]. Fakt, że choroby te często towarzyszą białaczce T-LGL, jest do-

datkowym utrudnieniem. Niemożliwe jest odróżnienie monoklonalnych od odczynowych nacieków z T-LGL na poziomie badania histopatologicznego. Trudności diagnostyczne w tej chorobie odzwierciedlają postawione wcześniej błędne rozpoznania odczynowej limfocytozy towarzyszącej RZS, idiopatycznej neutropenii, zespołu mielodysplastycznego i białaczki prolimfocytowej z komórek T u około 30% retrospektywnie badanych chorych.

Podobnie jak u innych autorów [20, 21], w badanym materiale nacieki limfocytarne w szpiku u chorych na białaczkę T-LGL były słabo widoczne w barwieniach rutynowych HE i zwykle nie budziły podejrzeń choroby limfoproliferacyjnej. Dopiero barwienia immunohistochemiczne z użyciem panelu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom typowym dla cytotoksycznych limfocytów T ujawniały ukrytą chorobę, co podkreśla dużą rolę tych badań w diagnostyce białaczki T-LGL. Nacieki śródmiąższowe z tworzeniem skupień po 6–8 komórek T, wykazujące najczęściej ekspresję CD3 i CD8, pojawiały się u wszystkich badanych chorych na białaczkę, co jest zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów [20–22]. Nacieki śródmiąższowe występowały również u 45% badanych chorych z odczynową limfocytozą z T-LGL i większym zajęciem szpiku, jednakże limfocyty T w naciekach odczynowych były najczęściej rozproszone, rzadziej tworzyły skupienia i wykazywały ekspresję granzymu B. Wewnątrzatokowe, liniowe nacieki zostały zidentyfikowane u 64% badanych chorych na białaczkę T-LGL. Costes i wsp. [155] opisali je u 58% chorych, a Morice i wsp. [21] w 67% przypadkach. Wydaje się, że wewnątrzatokowe nacieki odzwierciedlają raczej naturę białaczki jako rozsianej choroby, ponieważ mogą pojawiać się w innych typach białaczek i chłoniaków. Występują najczęściej w chłoniaku strefy brzeżnej pierwotnym śledziony, chłoniaku wątrobowo-śledzionowym z komórek T i chłoniaku rozlanym z dużych komórek B [155]. Niemniej jednak takiej lokalizacji nacieków nie spotykano w odczynowej limfocytozie z T-LGL ani we własnym materiale, ani w doniesieniach innych autorów [21]. W związku z tym łącznie z wykazaniem ekspresji specyficznych dla białaczki T-LGL antygenów może być uważana za charakterystyczną cechę morfologiczną.

Ekspresja CD57 pojawia się z różnym nasileniem i częstością w białaczce T-LGL i ta różnorodność ekspresji według niektórych autorów [21] dyskwalifikuje to przeciwciało jako powtarzalny, użyteczny marker w diagnostyce tej białaczki. W badaniu własnym ekspresja CD57 na limfocytach T występowała dość często i była dodatnia u 61% chorych, dodatnia jedynie w części limfocytów T w 24%

przypadków i ujemna tylko u 15% chorych. W pracy Morice i wsp. [21] występowała tylko u 17% chorych. Taka rozbieżność wyników może być spowodowana na przykład zniszczeniem epitopów antygenowych podczas nieprawidłowego procesu utrwalania tkanek. Wykonane w przedstawionej pracy równoległe badania cytometryczne potwierdziły podobną częstość występowania tego odczynu w obu metodach (85% v. 74% przypadków). Dlatego wydaje się, że pomimo występowania tego antygeny u niektórych chorych tylko na części komórek T i możliwości jego obecności na limfocytach odczynowych, ekspresja na limfocytach T w charakterystycznej dla białaczki linijnej wewnątrzatkowej lokalizacji i w skupieniach śródmiąższowych może być uznana za wiarygodny marker w diagnostyce immunohistochemicznej tej białaczki.

Z badań własnych wynika, że odczynowe grudki chłonne są również cechą obrazu szpiku w białaczce T-LGL. Pojawiają się one w szpiku u ludzi zdrowych, szczególnie w podeszłym wieku, w przebiegu chorób mieloproliferacyjnych, niedokrwistości aplastycznej i zespołów mielodysplastycznych oraz zakażeń wirusowych, ale najczęściej występują w chorobach autoimmunologicznych [156]. Grudki chłonne uważane są za morfologiczny wykładnik autoimmunizacji i są wyrazem wpływu procesów immunologicznych wywołanych przez autoantygeny i komplement na mikrośrodowisko szpiku [157]. W szpikach badanych chorych na białaczkę T-LGL grudki chłonne występowały dość często (w 56% przypadków). Jest to zgodne ze spostrzeżeniami Osuji [22], która obserwowała grudki chłonne u 55% chorych. Natomiast we wcześniejszych doniesieniach określano ich obecność na około 25% [18, 20, 21, 155]. Mniejsza wykrywalność grudek związana była prawdopodobnie z mniejszą liczbą badanych chorych oraz użyciem panelu przeciwciał skierowanemu głównie przeciwko limfocytom T, a nie B. Nie bez znaczenia wydaje się pomijanie tego zjawiska lub kwalifikowanie go jako wyłącznie odczynowe, niezwiązane z białaczką T-LGL. Częste występowanie grudek w badanym materiale można tłumaczyć obecnością w połowie przypadków towarzyszących chorób autoimmunologicznych. Jednakże grudki pojawiały się z podobną częstością u chorych na białaczkę T-LGL ze współistniejącą chorobą autoimmunologiczną, jak i bez objawów tej choroby. Świadczy to o niemałym udziale limfocytów B i zjawisk immunologicznych w patogenezie białaczki T-LGL.

Dlatego też zbadano związek parametrów serologicznych świadczących o procesie autoimmunologicznym (czynnika reumatoidalnego, przeciwciał przeciwwądrowych i hipergammaglobulinemii poli-

klonalnej) z występowaniem grudek chłonnych jako morfologicznych wykładników immunizacji u chorych na białaczkę T-LGL. Badania statystyczne potwierdziły tylko związek występowania hipergammaglobulinemii poliklonalnej z obecnością grudek chłonnych. Występowanie podwyższonej frakcji gammaglobulin wskazuje na toczący się przewlekły proces zapalny lub chorobę autoimmunologiczną i jest wykładnikiem zaburzeń funkcji limfocytów B [102].

W badanym materiale grudkowe, międzybłeczkowe skupienia z limfocytów B (CD20⁺) i T (CD3⁺, CD4⁺) morfologicznie odpowiadały odczynowym grudkom chłonnym. Jednakże w części tych przypadków wykryto monoklonalną rearanżację genów kodujących jeden lub dwa łańcuchy lekkie *IG*, świadcząca o monoklonalności limfocytów B. U połowy chorych, u których stwierdzono rearanżację genów *IG*, występowały towarzyszące choroby autoimmunologiczne. Występowanie monoklonalnych limfocytów B w morfologicznie odczynowych grudkach chłonnych w szpiku u chorych z chorobami autoimmunologicznymi zostało ostatnio opisane przez Engelsa i wsp. [154] i związane jest najprawdopodobniej z przewlekłą stymulacją antygenową limfocytów B w tych chorobach. W materiale własnym części przypadków z obecnością grudek i rearanżacją genów *IG* nie towarzyszyła jednak objawowa choroba autoimmunologiczna. Rearanżacja pojawiła się również u jednego chorego na białaczkę T-LGL bez grudek chłonnych w szpiku. Niewykluczone, że występowanie rearanżacji genów *IG* towarzyszących monoklonalnej proliferacji z T-LGL może być również związane ze zjawiskiem krzyżowej rearanżacji genów *TCR*.

W badaniach własnych wykazano, że obraz morfologiczny szpiku polegający na śródmiąższowych, tworzących skupienia (100% przypadków) i linijnych wewnątrzatkowych (64%) naciekach z limfocytów T o fenotypie: CD3⁺(100%)/CD4⁻(91%)/CD8⁺(85%)/CD57⁺(85%)/granzym B⁺(88%), występowaniu odczynowych grudek chłonnych (56%) oraz zmniejszonej liczbie prekursorów granulocytów (53%) może być uważany za charakterystyczny dla białaczki T-LGL. Potwierdza to doniesienie Morice i wsp. [21] oraz ostatnio opublikowane Osuji i wsp. [22]. Na podstawie danych z piśmiennictwa oraz własnego doświadczenia odnośnie zajęcia szpiku w przebiegu różnych chorób limfoproliferacyjnych można stwierdzić, że taki typ i fenotyp nacieku nie jest spotykany w przypadkach zajęcia szpiku przez inne procesy limfoproliferacyjne ani w przebiegu nacieków odczynowych. W innych chłoniakach i białaczkach są to najczęściej wyraźnie widoczne w preparatach HE nacieki rozlane,

śródmiażdżowe, guzkowe okołoboleczkowe lub międzyboleczkowe, a niekiedy wewnątrzatokowe, charakteryzujące się specyficznym fenotypem [158].

Badanie metodą cytometrii przepływowej (FCM) ma istotne znaczenie w diagnostyce białaczki T-LGL ze względu na możliwość szybkiej, wykonywanej z krwi obwodowej lub szpiku precyzyjnej ilościowej oraz jakościowej analizy fenotypu limfocytów T. Daje też możliwość różnicowania z procesami nienowotworowymi oraz innymi białaczkami z dojrzałych komórek T/NK. FCM jest szczególnie ważne, gdy w badaniu cytologicznym LGL są nieliczne i nie posiadają typowych ziarnistości. Stanowi ono badanie komplementarne do badania histopatologicznego trepanobiopsji szpiku. O ile trepanobiopsja szpiku pozwala ocenić charakterystyczną architekturę i fenotyp nacieków oraz stan hemopoety, to badanie FCM umożliwia poza oceną fenotypu również wykazanie zaburzeń ekspresji antygenów komórkowych. Mimo że trepanobiopsja jest materiałem utrwalonym, w badaniu własnym częstość występowania antygenów CD3, CD4, CD8 i CD57 była porównywalna do wyników FCM.

Podobnie jak we wcześniejszych opracowaniach, wykazano, że komórki białaczki T-LGL charakteryzują się zmienną ekspresją antygenów komórek NK: CD16, CD56 i CD57 [30, 31, 33]. Ekspresja CD57 obecna była w 74% badanych przypadków, z tym że u 41% chorych występowała tylko na części komórek. W innych dużych badaniach zaobserwowano ekspresję tego antygeny we wszystkich przypadkach białaczki [30, 31]. Interpretacja tego odczynu może sprawiać problemy, szczególnie przy małej liczbie komórek nowotworowych i ekspresji tylko na części komórek białaczkowych, ponieważ ten antygen występuje na prawidłowych cytotoksycznych limfocytach T [30]. Antygen ten występował w badanej grupie chorych z limfocytozą odczynową z podobną jak w białaczkę T-LGL częstością (63% przypadków). Ponieważ białaczkowe limfocyty T mogą nie wykazywać ekspresji CD57, tak jak miało to miejsce u 26% badanych chorych, wskazana jest ocena innych antygenów komórek NK, takich jak CD16 i CD56, które wydają się lepszymi markerami tej białaczki. Własne obserwacje sugerują, że ocena CD16 jest pewniejsza, ponieważ w prawidłowej krwi obwodowej nie ma dużej populacji komórek CD16⁺, co ułatwia wiarygodną ocenę w badaniach FCM [159]. Ponadto cząsteczka CD16 jest najczęściej pojawiającym się antygenem związanym z komórkami NK w tej białaczkę. W badanym materiale występowała w 89% przypadków, podczas gdy inni autorzy [30] donoszą o występowaniu antygeny CD16 na wszystkich komórkach białaczki.

W badaniu własnym antygen ten pojawiał się w polowie przypadków tylko na części komórek. Według Sivakumara i wsp. [159] występowanie tego antygeny ściśle koreluje z rearanżacją genów *TCR* i wydaje się on charakterystyczny dla białaczki T-LGL, chociaż jak wynika z własnych spostrzeżeń, obserwacji Roden i wsp. [68] oraz Scotta i wsp. [32], pojawia się on też na odczynowych limfocytach T, z tym że istotnie rzadziej (około 1/3 przypadków). Ponieważ CD16 nie występuje we wszystkich przypadkach białaczki i może towarzyszyć limfocytozie odczynowej, wskazane jest użycie jeszcze innego antygeny związanego z komórkami NK, jakim jest CD56. Z własnych badań wynika, że jeden z tych antygenów: CD16 lub CD56, albo oba jednocześnie, występuje w prawie wszystkich badanych przypadkach białaczki (93%), choć ekspresja CD56 znacznie rzadziej niż CD16 (24% v. 89%), co potwierdza celowość badania ich obu. Niestety, antygen CD56 może również występować na odczynowych limfocytach T-LGL, w badaniu własnym w 25% przypadków. U dwóch chorych z badanej grupy nie występowała ekspresja CD16 ani CD56, natomiast obecna była cząsteczka CD57 i zaburzenia ekspresji innych antygenów. Występowanie antygenów CD16, CD56 i CD57 stanowi zatem cechę pomocną w rozpoznawaniu tej białaczki oraz może służyć do diagnostyki różnicowej z innymi białaczkami z dojrzałych komórek T/NK CD8⁺/CD4⁻. Natomiast ekspresja tych antygenów nie stanowi elementu potwierdzającego monoklonalność limfocytów T, ponieważ może pojawić się na odczynowych T-LGL i w związku z tym nie jest pomocna w różnicowaniu proliferacji odczynowych od nowotworowych [68].

U wszystkich badanych chorych na białaczkę T-LGL obecne były zaburzenia ekspresji jednego, a w 66% przypadków dwóch albo więcej antygenów komórek T. Polegały one głównie na obniżonej lub braku ekspresji, a w nielicznych przypadkach na podwyższonej w porównaniu do obserwowanej na towarzyszących prawidłowych limfocytach T. Jest to zgodne z doniesieniami Lundell i wsp. [31]. Obniżenie lub brak ekspresji dotyczyło antygenów: CD5 (81%), CD7 (67%), CD43 (80%), CD2 (19%) i CD3 (13%) i zjawisko to występowało z podobną częstością jak w badaniach Lundell i wsp. [31] oraz Morice i wsp. [30]. Zaburzenia ekspresji antygenów pan-T obserwowane są nie tylko w białaczkę T-LGL. Występują często w innych limfoproliferacjach z komórek T i są elementem potwierdzającym rozpoznanie [33]. We własnym materiale stwierdzono, że zaburzenia ekspresji antygenów pan-T na komórkach białaczkowych koreluje z obecnością rearanżacji genów *TCR* i nie pojawiają się w limfocytozie

odczynowej. Mogłoby to świadczyć o monoklonalności rozrostu i wraz z danymi klinicznymi sugerować rozpoznanie białaczki. Jednak z ostatnich badań przeprowadzonych na grupie osób z limfocytozą T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ przez Roden i wsp. [68] wynika, że wprawdzie nieliczne, ale odczynowe T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ mogą również wykazywać zaburzenia ekspresji antygenów pan-T, podobnie jak w białaczce. Dotyczyło to głównie antygenów CD5 (26% przypadków) i CD7 (5%). Dodatkowo zaburzeniom ekspresji CD5 towarzyszyła typowa dla komórek białczkowych koekspresja antygenów CD16 i CD57. Zmniejsza to znaczenie tej cechy w potwierdzeniu monoklonalności rozrostów z T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ i wskazuje na konieczność oceny wielu parametrów przy rozpoznaniu tego typu białaczki T-LGL.

Pewne różnice fenotypowe w poszczególnych przypadkach białaczki, polegające na występowaniu różnych izoform cząsteczki CD45 (RA lub RO), a także obecności lub braku ekspresji CD57, świadczą o heterogenności pochodzenia komórek białaczki. Uważa się, że CD57 charakteryzuje efektorowe komórki CD8 $^+$, a brak ekspresji CD57 jest cechą komórek pamięci [23, 24]. Podobnie z izoformami CD45; CD45RO występuje na komórkach pamięci, a CD4RA cechuje dziewicze limfocyty T. U większości badanych chorych (89%) obecna była cząsteczka CD45RA. Obecność cząsteczki CD45RO na komórkach białczkowych stwierdzono jedynie u 2 chorych, którzy zmarli z powodu zapalenia płuc stanowiącego powikłanie agranulocytozy, a nie choroby o większej agresywności klinicznej.

Komórki białaczki T-LGL charakteryzują się najczęściej fenotypem: CD3 $^+$, CD4 $^-$, CD8 $^+$, CD16 $^{+/-}$, CD56 $^-$, CD57 $^{+/-}$, TCR $\alpha\beta^+$. W badanej grupie chorych stwierdzono trzy warianty fenotypowe białaczki T-LGL. Białaczka T-LGL CD4 $^+$ pojawiła się u 9% chorych, białaczka TCR $\gamma\delta^+$ u 31% chorych i białaczka z koekspresją CD56 $^+$ w 24% przypadkach. Na podstawie pojedynczych obserwacji tych podtypów sugeruje się, że mogą stanowić odrębne jednostki histo-kliniczne [12, 25].

Komórki CD4 $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ i z ekspresją antygenów komórek NK uważane są za wyspecjalizowany podtyp limfocytów TCR $\alpha\beta^+$ pojawiający się w różnych procesach patologicznych: w przebiegu nowotworów, zakażeń wirusowych, chorób autoimmunologicznych i w procesie odrzucania przeszczepów [25]. Ze względu na bardzo rzadkie występowanie białaczki T-LGL z ekspresją antygeny CD4, informacje dotyczące tej jednostki są ograniczone i pochodzą z dwóch wieloośrodkowych badań dotyczących 34 i 36 chorych [25, 81] oraz opisów nielicznych przypadków. Lima i wsp. [25] przedstawiają

monoklonalną limfocytozę CD2 $^{+bright}$ /CD4 $^+$ /CD7 $^{-/+dim}$ /CD8 $^{-/+dim}$ /TCR $\alpha\beta^+$ /granzym B $^+$ /CD56 $^+$ /CD57 $^+$ jako odrębny podtyp limfoproliferacji z T-LGL, charakteryzujący się łagodnym przebiegiem klinicznym oraz wyraźnymi różnicami od klasycznej białaczki T-LGL CD8 $^+$ /CD4 $^-$. Większość chorych na białaczkę z ekspresją CD4 (80%) nie wykazuje odchylenia w badaniu klinicznym, rzadko występuje u nich splenomegalia, natomiast nieco częściej limfadenopatia. Brak jest typowej dla białaczki T-LGL CD4 $^-$ /CD8 $^+$ neutropenii, niedokrwistości, związku z RZS i innymi chorobami autoimmunologicznymi. Być może brak innych objawów poza limfocytozą jest przyczyną tak rzadkiego rozpoznawania tej jednostki. Natomiast obserwuje się dość częste (u ok. 30% chorych) współistnienie z chorobami limfoproliferacyjnymi z komórek B i innymi chorobami nowotworowymi, od których zależy rokowanie i przebieg choroby [25].

W badanej grupie 4 chorych miało białaczkę T-LGL o fenotypie CD4 $^+$ /CD8 $^{+ lub -}$ /TCR $\alpha\beta^+$, ale stanowili oni niejednorodną grupę. Klinicznie 2 chorych przypominało chorobę opisywaną przez Limę i wsp. [25]. Występowała u nich jedynie limfocytoza T-LGL, bez cytopenii, splenomegalii i towarzyszących chorób autoimmunologicznych. U jednego z nich rozpoznano jednocześnie PBL. U dwóch pozostałych chorych obraz kliniczny był podobny do spotykanego w klasycznej białaczce CD4 $^-$ /CD8 $^+$.

Limfocytoza T-LGL CD4 $^+$ /CD8 $^{+/-}$ pojawiła się również u dwóch chorych bez rearanżacji genów *TCR*. Interesujące, że u jednej z nich po 2 latach obserwacji rozwinął się chłoniak strefy brzeżnej, co może sugerować, że w przebiegu tej limfocytozy, nawet poliklonalnej, mogą powstać wtórne nowotwory. Badana grupa chorych jest niewielka, ale pojawienie się aż u 2/6 chorych limfoproliferacji z komórek B związanych z tą limfocytozą sugeruje konieczność okresowej kontroli chorych z limfocytozą T-LGL CD4 $^+$ pod kątem rozwoju drugiej choroby nowotworowej. Sądzi się, że w tym podtypie białaczki dość często pojawiają się drugie procesy nowotworowe, ponieważ proliferujące T-LGL CD4 $^+$, które wykazują cechy zarówno komórek cytotoksycznych (CD56 $^+$, CD57 $^+$, granzym B $^+$), jak i aktywowanych (CD2 $^+$, CD11a $^+$, HLADR $^+$), wspomagają system immunologiczny w kontroli wzrostu nowotworów [25]. Przebieg kliniczny u badanych chorych bez towarzyszącej drugiej limfoproliferacji był łagodny, a u chorej z poliklonalną limfocytozą nastąpiła samoistna regresja limfocytozy w okresie 6 miesięcznej obserwacji.

U 10 chorych (31%) na białaczkę T-LGL komórki nowotworowe charakteryzowały się w bada-

niach FCM ekspresją TCR $\gamma\delta$. Rozpoznano u nich rzadki podtyp białaczki T-LGL TCR $\gamma\delta^+$, który stanowi około 5% białaczek T-LGL [26]. Dostępne w piśmiennictwie dane dotyczące białaczki T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ pochodzą z dwóch opracowań dotyczących 44 i 20 chorych [26, 160] oraz opisów około 30 przypadków [161, 162]. Przeanalizowano dane kliniczne oraz obraz histopatologiczny i immunofenotypowy szpiku 10 chorych na białaczkę T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ oraz porównano te dane z wynikami badań 22 chorych na białaczkę TCR $\alpha\beta^+$. Obraz kliniczny choroby w obu podtypach był podobny. Dotyczyło to wieku, płci, częstości występowania powiększenia śledziony, chorób autoimmunologicznych, autoprzeciwiań i nawracających zakażeń. U badanych chorych na białaczkę T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ rzadziej pojawiała się neutropenia. Niedokrwistość i małopłytkowość występowały z podobną częstością, jak i zbliżona była średnia liczba dużych ziarnistych limfocytów T. Jest to zgodne z obserwacjami Bourgaault-Rouxel i wsp. [160], którzy porównali dane 20 chorych z białaczką T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ z 196 przypadkami białaczki T-LGL TCR $\alpha\beta^+$ opisanymi w dwóch zbiorczych pracach Loughrana i wsp. [9] oraz Dhodapkara i wsp. [13].

W badaniach immunohistochemicznych i cytometrii przepływowej na komórkach białaczki T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ częściej obserwowano brak obu antygenów: CD4 i CD8 niż w przypadkach TCR $\alpha\beta^+$, gdzie fenotyp CD4 $^-$ /CD8 $^-$ nie pojawił się u żadnego chorego, natomiast obecny był fenotyp CD4 $^-$ /CD8 $^+$. Odczyn z CD56 występował u większej liczby chorych na białaczkę TCR $\gamma\delta^+$ niż TCR $\alpha\beta^+$, czego nie opisywali inni autorzy. Różnice fenotypowe pomiędzy podtypami wynikają najprawdopodobniej z różnych prekursorów tych rozrostów: prawidłowego limfocyta T $\gamma\delta^+$ lub $\alpha\beta^+$. W przypadkach białaczki T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ z podwójnie ujemnym fenotypem CD4 $^-$ /CD8 $^-$ i towarzyszącą ekspresją CD56, co miało miejsce w około 50% naszych przypadków, trudności może sprawiać różnicowanie z chłoniakiem wątrobowo-śledzionowym z komórek T $\gamma\delta^+$ (HSTCL, *hepatosplenic T-cell lymphoma*). Chłoniak HSTCL ma podobny do białaczki T-LGL wewnątrzatkowy typ naciekania śledziony, wątroby i szpiku oraz podobny fenotyp CD2 $^+$ /CD3 $^+$ /CD4 $^-$ /CD5 $^-$ /CD7 $^+/-$ /CD8 $^-$ /CD16 $^+/-$ /CD56 $^+$ /CD57 $^-$. Odróżnienie tych dwóch procesów jest ważne, ponieważ HSTCL charakteryzuje się agresywnym przebiegiem klinicznym i wymaga innego leczenia. O rozpoznaniu białaczki T-LGL decyduje całość obrazu klinicznego (łagodny i przewlekły przebieg choroby, starszy wiek chorych, współistnienie chorób autoimmunologicznych) oraz morfologicznych i immunofenoty-

powych (ziarnistości w cytoplazmie komórek, ekspresja CD5 i granzymu B), które nie pojawiają się w HSTCL [163, 164]. W części przypadków HSTCL występuje isochromosom 7q [165]. Białaczka T-LGL TCR $\gamma\delta^+$ wymaga również odróżnienia od innych równie rzadko spotykanych, ale agresywnie przebiegających chłoniaków z komórek T TCR $\gamma\delta^+$ to jest chłoniaka z komórek NK/T nosowego, chłoniaka jelitowego z komórek T związanego z enteropatią oraz białaczki limfoblastycznej z komórek T $\gamma\delta^+$ [166].

Gentile i wsp. [12] sugerowali, że białaczka T-LGL z koekspresją CD56 charakteryzuje się bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym, jednak brak dłuższych obserwacji klinicznych tych chorych. W badanym materiale 24% chorych wykazywało ekspresję CD56, zwykle na części komórek białaczki. Jest to zgodne ze spostrzeżeniami Gorczyca i wsp. [33], którzy stwierdzili u około 1/3 chorych ekspresję tego antygeny. Występowanie antygeny CD56 nie jest więc rzadkie w tej białaczce. Większość badanych chorych, u których białaczkowe limfocyty T wykazywały ekspresję CD56, charakteryzowała się łagodnym przebiegiem klinicznym. Nie stwierdzono różnic w liczbie obwodowych T-LGL, częstości występowania cytopenii, powiększenia śledziony, odpowiedzi na leczenie i czasie przeżycia w porównaniu z chorymi na białaczkę T-LGL bez ekspresji tego antygeny. Wyjątkiem był jeden chory, u którego zwracała uwagę wysoka liczba T-LGL. Zmarł on po 15 miesiącach obserwacji, z powodu zapalenia płuc związanego z neutropenią, a nie układowej, agresywnej choroby. Sandberg i wsp. [26] stwierdzili występowanie ekspresji CD56 u 45% chorych na białaczkę T-LGL TCR $\gamma\delta^+$, ale żaden z nich nie charakteryzował się gorszym przebiegiem klinicznym. Opisane przez Gentile i wsp. [12] 4 przypadki białaczki T-LGL CD8 $^+$ TCR β^+ z koekspresją CD56 cechował agresywny przebieg kliniczny z szybko powiększającą się śledzioną, limfadenopatią, objawami ogólnymi, wysoką leukocytozą i opornością na leczenie. Sugerowali, że jest to odrębna jednostka różniąca się od najczęściej spotykanej białaczki CD3 $^+$ /CD56 $^-$, a podobna do agresywnie przebiegającej białaczki z komórek NK. Białaczka z komórek NK charakteryzuje się ekspresją CD56 $^+$, jednak w przeciwieństwie do białaczki T-LGL nie ma ekspresji CD3 i znaczną rolę w jej patogenezie odgrywa EBV. Macon i wsp. [167] przedstawili 6 chorych na agresywnie przebiegającą białaczkę T-LGL CD56 $^+$ klinicznie charakteryzującą się objawami ogólnymi oraz powiększeniem wątroby i śledziony. W 3 przypadkach stwierdzili nieprawidłowy kariotyp. Ostatnio Alekshun i wsp. [168]

opisali chorego na agresywnie przebiegającą białaczkę T-LGL CD3⁺/CD8⁺/CD56⁺, a Matutes i wsp. [169] przypadek transformacji białaczki T-LGL CD56⁺ w chłoniaka z obwodowych limfocytów T z ekspresją CD30.

U badanych chorych na białaczkę T-LGL najczęściej występowały rearanżacje genów kodujących części zmienne jednocześnie łańcuchów beta i gamma *TCR*. Nie wykazano preferencyjnego występowania rearanżacji określonych regionów genów kodujących części zmienne łańcuchów *TCR*, pojawiały się one w sposób przypadkowy, chociaż najczęściej ulegał rearanżacji region V_γIf_γV_{δ10}J_γ. Przeprowadzona przez innych autorów [31, 46, 74] analiza cytometryczna częstości występowania fragmentów łańcuchów β regionów zmiennych *TCR* w białaczce T-LGL nie wykazała preferencyjnego pojawiania się któregoś z segmentów. Davey i wsp. [80] wykazali występowanie segmentu Vβ-6 tylko u chorych z białaczką T-LGL i towarzyszącym RZS. Natomiast badania sekwencji nukleotydów regionu CDR3 łańcuchów β genu *TCR* odpowiedzialnego za wiązanie antygeny, przyniosły sprzeczne wyniki. Przeprowadzone przez O'Keefe i wsp. [74] i Davey i wsp. [80] badania sekwencji nukleotydowych w rejonie CDR3 w białaczce T-LGL nie wykazały widocznych podobieństw klonotypów. Natomiast Sandberg i wsp. [26] zaobserwowali, że w połowie przypadków białaczki T-LGL TCRγδ⁺ monoklonalne komórki T wykazywały ten sam immunofenotyp (TCR-Vγ9/Vδ2) i posiadały podobne sekwencje nukleotydów w regionie Vδ2-Jδ1. Również przeprowadzona przez Garrido i wsp. [81] analiza chorych z monoklonalną limfocytozą TCRαβ⁺/CD4⁺ wykazała, że komórki TCR-Vβ13.1⁺/CD4⁺ posiadają taki sam haplotyp HLA-DRB1*0701 i wykazują podobne sekwencje nukleotydowe w regionie CDR3 genu *TCRB*, co sugeruje działanie podobnego antygeny odpowiedzialnego za rozwój monoklonalnej proliferacji T-LGL. Brak preferencyjnego występowania rearanżacji określonych regionów genów *TCR* we własnym badaniu sugeruje większą różnorodność domniemyanych antygenów biorących udział w patogenezie białaczki T-LGL CD8⁺. Jest to zgodne z obserwacjami Włodarskiego i wsp. [75], którzy wykazali, że rearanżacje regionów *TCRVβ* u chorych na białaczkę T-LGL CD8⁺ są raczej różnorodne i tylko u części chorych występują podobne sekwencje nukleotydowe w regionie CDR3.

W badaniach kariotypu metodą prążkową nie wykazano żadnych zmian cytogenetycznych w analizowanej grupie chorych na białaczkę T-LGL. Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa, z których wynika, że jedynie nieliczni chorzy wykazują zabu-

żenia cytogenetyczne [5, 69, 70]. W związku z tym prawdopodobny mechanizm patogenetyczny prowadzący do wydłużonego przeżycia lub/i proliferacji specyficznych klonów komórek T u chorych z T-LGL wydaje się bardziej związany ze stymulacją antygenową i zaburzeniami w procesie apoptozy niż zmianami cytogenetycznymi typowymi dla innych procesów nowotworowych [74]. Należy podkreślić, że rearanżacje genów *TCR* występujące w białaczce T-LGL, potwierdzające monoklonalną chorobę limfoproliferacyjną, niekoniecznie świadczą o jej nowotworowym charakterze.

Związek patogenetyczny pomiędzy RZS a różnymi typami limfocytozy z T-LGL jest niejasny, tak samo jak niewyjaśniona jest etiologia tych chorób. Nie może on być przypadkowy, ze względu na częste współistnienie tych jednostek [8, 170, 171]. Monoklonalna limfocytoza z T-LGL może pojawiać się u chorych na RZS, a RZS jest najczęstszą chorobą autoimmunologiczną towarzyszącą białaczce T-LGL i występuje u około 30% chorych [7, 9, 13, 76]. W badaniach własnych wykazano to u 36% chorych. RZS zwykle wyprzedza lub występuje jednocześnie z pojawieniem się zaburzeń hematologicznych związanych z białaczką, ale zdarzają się przypadki, podobnie jak w przedstawionym badaniu, że białaczka wyprzedza na wiele lat pojawienie się zmian stawowych [9].

Wiadomo, że w patogenezie obu chorób odgrywa rolę przetrwała odpowiedź immunologiczna na nieznaną czynnik antygenowy, która nie może zakończyć się prawidłowo [172, 173]. RZS jest przewlekłą chorobą zapalną, w której główną rolę w uszkodzeniu stawów pełnią limfocyty T [173]. Bowman i wsp. stwierdzili zwiększoną liczbę oligoklonalnych limfocytów CD3⁺, CD8⁺ i CD57⁺ z ekspresją segmentów Vβ1, 3, 6, 8, 13.2 i 18 u chorych z RZS [96]. W innym badaniu u 15% chorych na RZS obserwowano klonalną limfocytozę Vα 12.1/CD8⁺/HLADQ2⁺ [174]. Zwiększoną liczbę komórek o fenotypie podobnym do komórek białaczki T-LGL (CD3⁺/CD16⁺) obserwowano również w płynie stawowym chorych na RZS [175]. Poli- i oligo/monoklonalna limfocytoza występuje u chorych na RZS zarówno z neutropenią, jak i z prawidłową liczbą granulocytów [95, 176]. U 1/3 chorych na RZS z neutropenią i niekiedy powiększeniem śledziona, co zgodnie z nowymi kryteriami odpowiada zespołowi Felty'ego (FS), opisywano monoklonalną limfocytozę T-LGL, często spełniającą kryteria białaczki [76, 96]. Ze względu na podobieństwa obrazu klinicznego, cech immunogenetycznych oraz rozrostu cytotoksycznych klonalnych limfocytów T pomiędzy FS i białaczką T-LGL ze współistniejącym RZS,

Burks i Loughran [97] zasugerowali, że obie jednostki stanowią warianty tego samego procesu kliniczno-patologicznego.

W grupie 15 badanych chorych z FS obserwowano cały zakres limfocytozy T-LGL — od poliklonalnej, poprzez oligoklonalną i monoklonalną, aż do białaczki T-LGL. Istnienie takiej heterogenności może być dowodem potwierdzającym hipotezę O'Keefe i wsp. [74] i Włodarskiego i wsp. [75, 77], że białaczka T-LGL rozwija się w wyniku nadmiernej klonalnej odpowiedzi immunologicznej na przetrwałą stymulację antygenową występującą w chorobach autoimmunologicznych, która początkowo powoduje poliklonalną, reaktywną limfocytozę, a potem ekspansję tylko jednego klonu cytotoksycznych komórek T CD8⁺. Monoklonalna limfocytoza T-LGL występowała najczęściej w badanej grupie z FS, to jest u 80% chorych, co wskazuje na niedoszacowanie tego zjawiska, które określano wcześniej na 33–35% [94, 95]. Jednak tylko 5 chorych z FS spełniało kryteria diagnostyczne dla białaczki T-LGL dotyczące zarówno wartości bezwzględnej limfocytozy T-LGL $> 2 \times 10^9/l$, jak i typowych zmian histopatologicznych i immunofenotypowych w szpiku. Dziewięciu chorych z FS miało względną limfocytozę T-LGL, a bezwzględna limfocytoza z T-LGL była mniejsza niż $2 \times 10^9/l$. U tych chorych wykazano rearanżacje genów *TCR* świadczące o rozroście monoklonalnym oraz charakterystyczną dla białaczki T-LGL architektonikę nacieków w szpiku i fenotyp limfocytów T. Powstaje więc pytanie, czy przypadki te powinny być klasyfikowane jako właściwa białaczka, czy też rozrost klonalny o niejasnym znaczeniu związany z FS. Sokol i wsp. [1] uważają, że najważniejsze do rozpoznania białaczki T-LGL są typowe objawy kliniczne, monoklonalność T-LGL i zajęcie szpiku, a liczba T-LGL ma mniejsze znaczenie. Natomiast w TCUS liczba klonalnych T-LGL nie jest precyzyjnie określona, a najważniejszy wydaje się brak objawów klinicznych białaczki [138].

Szczególnie interesujący był chory z cechami monoklonalnej transformacji na podłożu poliklonalnej limfocytozy. W badaniu PCR w poliklonalnym tle obecny był u niego słaby monoklonalny produkt rearanżacji genu *TCRG*. W szpiku obserwowano obfite śródmiąższowe nacieki z komórek T CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺/granzymB⁺, jednak bez lokalizacji wewnątrzatkowej. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami Langeraka i wsp. [177], którzy w badaniach FCM z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko fragmentom łańcuchów β regionów zmiennych receptora TCR w licznych przypadkach białaczki T-LGL wykryli oprócz przeważającej eks-

presji jednego z segmentów dodatkowe słabe monoklonalne produkty, co świadczy o pojawieniu się monoklonalnej proliferacji w poli- lub oligoklonalnym tle. Poli- i oligoklonalne produkty świadczą o istnieniu nadmiernej klonalnej odpowiedzi immunologicznej na przetrwałą stymulację wywołaną autoantygenami lub antygenami wirusowymi i mogą reprezentować przedkliniczny i prekursorowy stan dla rozwoju białaczki [74, 89]. Ostatnio Langerak i wsp. [2] oraz Sandberg i wsp. [26], używając czułych metod PCR, wykazali ciągłe spektrum tych proliferacji. Lima i wsp. [46] zauważyli podobną zależność w badaniach cytometrycznych z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych rozpoznających fragmenty łańcuchów β regionów zmiennych receptora TCR u chorych z limfocytozą T-LGL CD4⁺/CD8⁺. Trzech chorych z FS bez klonalnej rearanżacji genów kodujących części zmienne łańcucha *TCR* stanowiło przykład odczynowej, poliklonalnej limfocytozy z T-LGL związanej z chorobą autoimmunologiczną. Rozproszone w szpiku nacieki T-LGL w badaniach cytometrycznych wykazywały prawidłową ekspresję antygenów limfocytów T. Podobnie jak u innych autorów [31], u wszystkich chorych z monoklonalną rearanżacją genów w badaniu FCM oprócz klonalnych limfocytów T CD57⁺ wykazujących zaburzenia ekspresji antygenów pan-T obecna była populacja prawidłowych odczynowych limfocytów T CD57⁺. Niewykluczone, że komórki te mogą być prekursorami dla białaczki T-LGL.

Porównanie wyników badań chorych na białaczkę T-LGL ze współistniejącymi chorobami autoimmunologicznymi (głównie RZS) i na białaczkę przebiegającą bez choroby towarzyszącej wykazało różnice w obrazie klinicznym i badaniach laboratoryjnych. U chorych z białaczką i chorobą autoimmunologiczną częściej występowały: powiększenie śledziony, czynnik reumatoidalny, przeciwciała przeciwjadrowe, hipergammaglobulinemia poliklonalna i leukopenia. Ponadto w tej grupie częściej pojawiała się ciężka neutropenia i niższa była średnia liczba krążących T-LGL. Ponad połowa chorych (62%) z chorobą autoimmunologiczną nie spełniała kryterium ilościowego rozpoznania białaczki T-LGL (T-LGL $> 2 \times 10^9/l$). Wykazano jednak duże podobieństwo biologiczne obu procesów, dotyczące obrazu histopatologicznego, immunofenotypu i charakterystyki molekularnej.

Białaczka T-LGL z towarzyszącym RZS jest rzadko występującą chorobą, jednak dalsze badania mogą dostarczyć ważnych danych dotyczących patogenezy RZS, choroby stanowiącej daleko większy problem społeczny. Wydaje się, że analiza sekwen-

cji nukleotydowych w regionie CDR3 łańcuchów β genów *TCR*, odpowiedzialnego za wiązanie antygeny może być kluczem do znalezienia potencjalnego antygeny odpowiedzialnego za oba procesy [176].

Przebieg kliniczny białaczki T-LGL jest łagodny, a leczenie polegające na zastosowaniu leków immunosupresyjnych w dawkach stosowanych w terapii układowych chorób autoimmunologicznych wpływa na poprawę objawów klinicznych i cytopenii, chociaż nie eliminuje komórek białaczkowych [123]. Sugeruje to, że nie ma ono działania cytotoksycznego, a immunosupresyjne lub immunomodulujące. Średni czas obserwacji 29 badanych chorych na białaczkę T-LGL wynosił 17 miesięcy (zakres 1–60 miesięcy) i u większości chorych choroba miała łagodny przebieg. Trzech chorych (10%) zmarło. Dwóch z powodu powikłań infekcyjnych, które były wynikiem związanej z białaczką neutropenii, i jedna chora z powodu amyloidozy nerek wtórnej do RZS, czyli przyczyny niezwiązanej z chorobą podstawową. W badaniu dotyczącym 151 chorych [10] 17% chorych zmarło podczas 23-miesięcznej obserwacji, ale w innym [9], trwającym 2 lata badaniu przebieg choroby był bardziej agresywny i zmarło 9/25 (36%) chorych. W badaniu Dhodapkara i wsp. [13] dotyczącym 68 chorych średni czas przeżycia był dłuższy niż 10 lat, a w badaniu Nowakowskiego i wsp. [129] wynosił 74,3 miesiąca. Zgony spowodowane były powikłaniami infekcyjnymi i tylko w kilku przypadkach progresją choroby. Pandolfi i wsp. [10] na podstawie analizy przebiegu choroby w dużej grupie chorych stwierdzili, że większe ryzyko zgonu istnieje u chorych z objawami ogólnymi, zwłaszcza gorączką, oraz u chorych z powiększoną wątrobą i węzłami chłonnymi, a także ze zmianami skórnymi. Do niekorzystnych czynników rokowniczych zaliczyli też niewielki odsetek limfocytów $CD57^+$ i małą liczbę obwodowych T-LGL. Nie stwierdzili natomiast związku pomiędzy agresywnym przebiegiem choroby a występowaniem cytopenii oraz stopniem nacieczenia szpiku przez limfocyty. W badaniu z Mayo Clinic [129] niedokrwistość, ciężka neutropenia i limfopenia stanowiły niezależne niekorzystne rokowniczo czynniki.

W badaniu własnym prawie wszyscy chorzy (97%) wymagali leczenia, ze względu na neutropenię i będące jej następstwem nawracające zakażenia, niedokrwistość, objawowe powiększenie śledziony i zapalenie stawów. W innych opracowaniach leczono 69% i 73% chorych [9, 13]. Całkowita odpowiedź na terapię u analizowanych chorych wynosiła 61% i była podobna do opisywanej w innych badaniach, gdzie wynosiła 60–100% [10, 13, 119]. We

własnym materiale wykazano dobrą odpowiedź na leczenie MTX (PR u 5/8 chorych) i CSA (1/9 CHR, 8/9 PR). Oba leki były stosowane w monoterapii lub łącznie z prednizonem i/lub G-CSF. Koreluje to z danymi z piśmiennictwa, gdzie odpowiedź na leczenie MTX wynosiła 60–100% [10, 13, 119, 121], a na CSA 67–100% [119, 120, 122]. W literaturze podkreśla się znaczenie działania G-CSF szybko poprawiającego neutropenię jako czynnika wspomagającego leczenie immunosupresyjne [119]. W badaniu własnym nie uzyskano odpowiedzi hematologicznej po zastosowaniu steroidów w monoterapii. Stwierdzono, że steroidy powodują zwiększenie liczby granulocytów tylko u nielicznych chorych [9]. Jednak zastosowane łącznie z MTX lub cyklofosfamidem w ciągu pierwszego miesiąca leczenia powodują szybką poprawę objawów ogólnych i parametrów hematologicznych [1, 7]. W trakcie badań klinicznych są nowe typy terapii celowanej z użyciem przeciwciał monoklonalnych przeciwko antygenom CD2 i CD52, podjednostce β receptora dla interleukiny-2 oraz małych cząsteczek, takich jak tipifarnib [123].

Podsumowanie

Klinicznie i biologicznie białaczka T-LGL znajduje się na pograniczu procesów odczynowych i nowotworowych. Wskazuje na to jej łagodny przebieg kliniczny nieprzypominający chorób nowotworowych i brak specyficznych dla tych chorób zaburzeń cytogenetycznych, przy jednocześnie potwierdzonej klonalności i inwazyjności wyrażającej się zajęciem narządów. Częste współistnienie z różnymi chorobami, głównie autoimmunologicznymi i układu krwiotwórczego, których objawy mogą być dominujące w obrazie klinicznym oraz jednocześnie niewielkie i słabo widoczne zajęcie kluczowych narządów przez nacieki białaczkowe powodują, że może być łatwo przeoczona lub niewzięta pod uwagę w rozważaniach diagnostycznych. Dlatego zalecane jest poszukiwanie białaczki T-LGL w chorobach uznanych za towarzyszące jej, szczególnie gdy w ich przebiegu pojawi się cytopenia i limfocytoza. Związek tej białaczki z licznymi chorobami sugeruje, że monoklonalna limfocytoza z T-LGL, niekiedy niespełniająca diagnostycznych kryteriów ilościowych białaczki może być klonalną reakcją na chorobę podstawową. Dlatego też, rozpoznanie białaczki T-LGL nie może opierać się na jednym typie badań. Badania histopatologiczne i cytometryczne wykazują cechy specyficzne dla tej choroby, ale rozpoznanie białaczki wymaga potwierdzenia badania-

mi rearanzacji genów *TCR*. Z kolei same badania molekularne, przy ich dużej czułości, mogą ujawniać istnienie populacji monoklonalnych komórek, które nie spełniają kryteriów diagnostycznych dla białaczki T-LGL. Decydujące dla rozpoczęcia leczenia lekami immunosupresyjnymi są objawy kliniczne, które mogą pojawić się zarówno w białaczce, jak i w odczynowej limfocytozie z T-LGL.

6. Wnioski

1. U chorych z niewyjaśnioną limfocytozą i cytopenią oraz towarzyszącymi zaburzeniami autoimmunologicznymi badanie histopatologiczne i immunofenotypowe szpiku uwzględniające użycie panelu przeciwciał nie tylko przeciwko antygenom limfocytów B, ale również T i NK umożliwia zwiększenie wykrywalności uważanych za rzadko występujące rozrostów z T-LGL.
2. Badanie histopatologiczne i immunohistochemiczne szpiku stanowi ważny element w diagnostyce proliferacji z T-LGL. Za najbardziej charakterystyczne dla białaczki należy uznać nacieki linijne wewnątrzratokowe i śródmiąższowe skupienia z limfocytów T o fenotypie CD3⁺/CD4⁻/CD8⁺/CD57⁺/granzym B⁺.
3. Badanie metodą cytometrii przepływowej pozwala na różnicowanie między białaczką a limfocytozą odczynową. Najważniejsze do rozpoznania białaczki T-LGL CD3⁺CD8⁺ są zaburzenia ekspresji antygenów komórek T (CD5, CD7, CD43) oraz ekspresja CD45RA i CD16. Odrębności fenotypowe komórek białaczkowych (ekspresja TCR $\gamma\delta$, CD4, CD56) nie mają wpływu na obraz kliniczny choroby.
4. W białaczkowych T-LGL rearanzacje regionów genów kodujących części zmienne łańcucha *TCR* występują w sposób przypadkowy, chociaż najczęściej ulega rearanzacji region V γ If, V γ 10-J γ . Obraz kliniczny chorych z objawową monoklonalną i poliklonalną limfocytozą z T-LGL jest podobny.
5. Zespół Felty'ego stanowi unikalny przykład występowania całego spektrum limfocytozy z T-LGL, od poliklonalnej, poprzez oligoklonalną i monoklonalną, aż do białaczki T-LGL. Świadczy to o ciągłości procesu autoimmunologicznego zakończonego rozrostem klonalnym.
6. Ważną cechą białaczki T-LGL są procesy związane z limfocytami B, polegające na ich odczynowej aktywacji, pojawieniu się monoklonalności i następnie proliferacji.

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Pani prof. dr hab. n. med. Renacie Maryniak, Kierownikowi Pracowni Patomorfologii, mojemu Nauczycielowi hematopatologii, za poświęcony mi czas i cenne uwagi merytoryczne. Dziękuję wszystkim Klinikom, którzy prowadzili i konsultowali chorych, bez ich udziału to opracowanie byłoby niepełne. Szczególne podziękowania składam osobom, które bezpośrednio uczestniczyły w prowadzonych przeze mnie badaniach: mgr Hannie Makuch-Łasicy, dr. n. med. Grzegorzowi Rymkiewiczowi, dr. Mirosławowi Majewskiemu, dr. n. med. Urszuli Podstawce, dr Hannie Michałak i st. tech. Monice Okle. Dziękuję Pani doc. dr hab. n. med. Magdalenie Łętowskiej za pomoc w opublikowaniu pracy.

Piśmiennictwo

1. Sokol L., Loughran T.P. Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist* 2006; 11: 263–273.
2. Langerak A.W., Sandberg Y., van Dongen J.J. Spectrum of T-large granular lymphocyte lymphoproliferations: ranging from expanded activated effector T cells to T-cell leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2003; 123: 561–562.
3. Brouet J.C., Sasportes M., Flandrin G., preud Homme J.L., Seligmann M. Chronic lymphocytic leukaemia of T-cell origin. Immunological and clinical evaluation in eleven patients. *Lancet* 1975; 2: 890–893.
4. McKenna R.W., Parkin J., Kersey J.H., Gail-Peczalska K.J., Peterson L., Brunning R.D. Chronic lymphoproliferative disorder with unusual clinical, morphologic, ultrastructural and membrane surface marker characteristics. *Am. J. Med.* 1977; 62: 588–596.
5. Loughran T.P. Jr, Kadin M., Starkebaum G. i wsp. Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann. Intern. Med.* 1985, 102: 169–175.
6. Chan W.C., Foucar K., Morice W.G., Catovsky D. T-cell large granular lymphocyte leukemia. W: World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Swerdlow S.H, Campo E., Harris N.L. i wsp. (red.). Lyon: IARC Press 2008: 272–273.
7. Lamy T., Loughran T.P. Jr. Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin. Hematol.* 2003; 40: 185–195.
8. Snowden N., Bhavnani M., Swinson D.R. i wsp. Large granular T lymphocytes, neutropenia and polyarthropathy: an underdiagnosed syndrome? *Q. J. Med.* 1991; 78: 65–76.
9. Loughran T.P. Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 1993; 82: 1–14.
10. Pandolfi F., Loughran T.P. Jr, Starkebaum G. i wsp. Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study. *Cancer* 1990; 65: 341–348.
11. Kowal M., Dmoszyńska A. Białaczka z dużych ziarnistych limfocytów — opis przypadku. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1993; 89: 235–239.
12. Gentile T.C., Uner A.H., Hutchison R.E. i wsp. CD3⁺, CD56⁺ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 1994; 84: 2315–2321.

13. Dhodapkar M.V., Li C.Y., Lust J.A., Tefferi A., Philyly R.L. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood* 1994; 84: 1620–1627.
14. Loughran T.P. Jr, Starkebaum G. Large granular lymphocyte leukemia. Report of 38 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1987; 66: 397–405.
15. Osuji N., Matutes E., Dearden C., Catovsky D. Pregnancy improves neutropenia in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2005; 128: 645–648.
16. Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J. Exp. Med.* 1981; 153: 569–582.
17. Rose M.G., Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist* 2004; 9: 247–258.
18. Agnarsson B.A., Loughran T.P. Jr, Starkebaum G., Kadim M.E. The pathology of large granular lymphocyte leukemia. *Hum. Pathol.* 1989; 20: 643–651.
19. Merlio J.P., De Mascarel A., Goussot J.F. Bone marrow involvement in large granular lymphocyte leukemia. *Hum. Pathol.* 1990; 21: 458–459.
20. Evans H.L., Burks E., Viswanatha D., Larson R. Utility of immunohistochemistry in bone marrow evaluation of T-lineage large granular lymphocyte leukemia. *Hum. Pathol.* 2000; 31: 1266–1273.
21. Morice W.G., Kurtin P.J., Tefferi A., Hanson C.A. Distinct bone marrow findings in T-cell granular lymphocytic leukemia revealed by paraffin section immunoperoxidase stains for CD8, TIA-1, and granzyme B. *Blood* 2002; 99: 268–274.
22. Osuji N., Beiske K., Randen U. i wsp. Characteristic appearances of the bone marrow in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Histopathology* 2007; 50: 547–554.
23. Melenhorst J.J., Sorbara L., Kirby M., Hensel N.F., Barrett A.J. Large granular lymphocyte leukaemia is characterized by a clonal T-cell receptor rearrangement in both memory and effector CD8⁽⁺⁾ lymphocyte populations. *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 189–194.
24. Melenhorst J.J., Eniafe R., Follmann D. i wsp. T-cell large granular lymphocyte leukemia is characterized by massive TCRBV-restricted clonal CD8 expansion and a generalized overexpression of the effector cell marker CD57. *Hematol. J.* 2003; 4: 18–25.
25. Lima M., Almeida J., Dos Anjos Teixeira M. i wsp. TCRalphabeta⁺/CD4⁺ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 763–771.
26. Sandberg Y., Almeida J., Gonzalez M. i wsp. TCR gammadelta⁺ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCR gammadelta⁺ T-cells. *Leukemia* 2006; 20: 505–513.
27. O'Malley D.P. T-cell large granular leukemia and related proliferations. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 127: 850–859.
28. Morice W.G., Jevremovic D., Hanson C.A. The expression of the novel cytotoxic protein granzyme M by large granular lymphocytic leukaemias of both T-cell and NK-cell lineage: an unexpected finding with implications regarding the pathobiology of these disorders. *Br. J. Haematol.* 2007; 137: 237–239.
29. Osuji N., Matutes E., Catovsky D., Lampert I., Wotherspoon A. Histopathology of the spleen in T-cell large granular lymphocyte leukemia and T-cell prolymphocytic leukemia: a comparative review. *Am. J. Surg. Pathol.* 2005; 29: 935–941.
30. Morice W.G., Kurtin P.J., Leibson P.J., Tefferi A., Hanson C.A. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2003; 120: 1026–1036.
31. Lundell R., Hartung L., Hill S., Perkins S.L., Bahler D.W. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 124: 937–946.
32. Scott C.S., Richards S.J., Sivakumaran M. i wsp. Transient and persistent expansions of large granular lymphocytes (LGL) and NK-associated (NKa) cells: the Yorkshire Leukaemia Group Study. *Br. J. Haematol.* 1993; 83: 505–515.
33. Gorczyca W., Weisberger J., Liu Z. i wsp. An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *Cytometry* 2002; 50: 177–190.
34. Morice W.G., Leibson P.J., Tefferi A. Natural killer cells and the syndrome of chronic natural killer cell lymphocytosis. *Leuk. Lymphoma* 2001; 41: 277–284.
35. Dang N.H., Aytac U., Sato K. i wsp. T-cell large granular lymphocyte lymphoproliferative disorder: expression of CD26 as a marker of clinically aggressive disease and characterization of marrow inhibition. *Br. J. Haematol.* 2003; 121: 857–865.
36. Nowakowski G.S., Morice W.G., Philyly R.L., Li C.Y., Tefferi A. Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2005; 128: 490–492.
37. Loughran T.P. Jr, Starkebaum G., Aprile J.A. Rearrangement and expression of T-cell receptor genes in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 1988; 71: 822–824.
38. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395–402.
39. Arstila T.P., Casrouge A., Baron V., Even J., Kanellopoulos J., Kourilsky P. Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science* 2000; 288: 1135.
40. Nadel B., Feeney A.J. Nucleotide deletion and P addition in V(D)J recombination: a determinant role of the coding-end sequence. *Mol. Cell Biol.* 1997; 17: 3768–3778.
41. Dik W.A., Pike-Overzet K., Weerkamp F. i wsp. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 1715–1723.
42. Macintyre E.A., Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. *Semin. Hematol.* 1999; 36: 373–389.
43. Plasilova M., Risitano A., Maciejewski J.P. Application of the molecular analysis of the T-cell receptor repertoire in the study of immune-mediated hematologic diseases. *Hematology* 2003; 8: 173–181.
44. McCarthy K.P., Sloane J.P., Kabarowski J.H., Matutes E., Wiedemann L.M. A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor-gamma chain gene. *Diagn. Mol. Pathol.* 1992; 1: 173–179.
45. Charnley P., Concannon P. PCR-based genotyping and haplotype analysis of human TCRBV gene segment polymorphisms. *Immunogenetics* 1995; 42: 254–261.
46. Lima M., Almeida J., Santos A.H. i wsp. Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3⁺/TCR-alfabeta⁺ large granular lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 1861–1868.
47. Bigouret V., Hoffmann T., Arlettaz L. i wsp. Monoclonal T-cell expansions in asymptomatic individuals and in patients with large granular leukemia consist of cytotoxic effector T cells expressing the activating CD94: NKG2C/E and NKD2D killer cell receptors. *Blood* 2003; 101: 3198–3204.
48. Posnett D.N., Sinha R., Kabak S., Russo C. Clonal population of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to benign monoclonal gammopathy. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 609–618.
49. Maini M.K., Casorati G., Dellabona P., Wack A., Beverley P.C. T-cell clonality in immune responses. *Immunol. Today* 1999; 20: 262–266.
50. Fitzgerald J.E., Ricalton N.S., Meyer A.C. i wsp. Analysis of clonal CD8⁺ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 1995; 154: 3538–3547.
51. Hingorani R., Monteiro J., Furie R. i wsp. Oligoclonality of V beta 3 TCR chains in the CD8⁺ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol.* 1996; 156: 825–828.
52. Waase I., Kayser C., Carlson P.J., Goronzy J.J., Weyand C.M. Oligoclonal T cell proliferation in patients with rheumatoid arthritis and their unaffected siblings. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 904–913.
53. McIntosh R.S., Watson P.F., Weetman A.P. Analysis of the T cell receptor V alpha repertoire in Hashimoto's thyroiditis: evidence for the restricted accumulation of CD8⁺ T cells in the

- absence of CD4⁺ T cell restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 1140–1146.
54. Mayo M.J., Jenkins R.N., Combes B., Lipsky P.E. Association of clonally expanded T cells with the syndrome of primary biliary cirrhosis and limited scleroderma. *Hepatology* 1999; 29: 1635–1642.
 55. Silins S.L., Cross S.M., Krauer K.G., Moss D.J., Schmidt C.W., Misko I.S. A functional link for major TCR expansions in healthy adults caused by persistent Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1551–1558.
 56. Strickler J.G., Movahed L.A., Gail-Peczalska K.J., Horwitz C.A., Brunning R.D., Weiss L.M. Oligoclonal T cell receptor gene rearrangements in blood lymphocytes of patients with acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 1358–1363.
 57. Wilson J.D., Ogg G.S., Allen R.L. Oligoclonal expansions of CD8⁽⁺⁾ T cells in chronic HIV infection are antigen specific. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 785–790.
 58. Weekes M.P., Wills M.R., Mynard K., Hicks R., Sissons J.G., Carmichael A.J. Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57⁺ CD28⁻ CD8⁺ T-cell population. *Immunology* 1999; 98: 443–449.
 59. Weekes M.P., Wills M.R., Mynard K., Carmichael A.J., Sissons J.G.P. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J. Virol.* 1999; 73: 2099–2108.
 60. Mongkolsapaya J., Jaye A., Callan M.F., Magnusen A.F., McMichael A.J., Whittle H.C. Antigen-specific expansion of cytotoxic T lymphocytes in acute measles virus infection. *J. Virol* 1999; 73: 67–71.
 61. Kochenderfer J.N., Kobayashi S., Wieder E.D., Su C., Mollndrem J.J. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood* 2002; 100: 3639–3645.
 62. Valmori D., Ayyoub M., Hesdorffer C.S., Keilholz U., Scheibenbogen C. A monoclonal melanoma-specific T-cell population phenotypically indistinguishable from CD3⁺ LGL-leukemia. *Blood* 2003; 101: 4643–4644.
 63. Mohty M., Faucher C., Vey N. i wsp. Features of large granular lymphocytes (LGL) expansion following allogeneic stem cell transplantation: a long-term analysis. *Leukemia* 2002; 16: 2129–2133.
 64. Halwani F., Guttman R.D., Ste-Croix H., Prud'homme G.J. Identification of natural suppressor cells in long-term renal allograft recipients. *Transplantation* 1992; 54: 973–977.
 65. Kelemen E., Gergely P., Lehoczky D., Triska E., Demeter J., Vargha P. Permanent large granular lymphocytosis in the blood of splenectomized individuals without concomitant increase of in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 63: 696–702.
 66. Van den Beemd R., Boor P.P.C., Van Lochem E.G. i wsp. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40: 336–345.
 67. Holm A.M., Tjonnfjord G., Yndestad A. i wsp. Polyclonal expansion of large granular lymphocytes in common variable immunodeficiency-association with neutropenia. *Clin. Exp. Immunol.* 2006; 144: 418–424.
 68. Roden A.C., Morice W.G., Hanson C.A. Immunophenotypic attributes of benign peripheral blood gammadelta T cells and conditions associated with their increase. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008; 132: 1774–1780.
 69. Wong K.F., Chan J.C., Liu H.S., Man C., Kwong Y.L. Chromosomal abnormalities in T-cell large granular lymphocyte leukaemia: report of two cases and review of the literature. *Br. J. Haematol.* 2002; 116: 598–600.
 70. Man C., Au W.Y., Pang A., Kwong Y.L. Deletion 6q as a recurrent chromosomal aberration in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2002; 139: 71–74.
 71. Kothapalli R., Bailey R.D., Kusmartseva I., Mane S., Epling-Burnette P.K., Loughran T.P. Jr. Constitutive expression of cytotoxic proteases and down-regulation of protease inhibitors in LGL leukemia. *Int. J. Oncol.* 2003; 22: 33–39.
 72. Epling-Burnette P.K., Loughran T.P. Jr. Survival signals in leukemic large granular lymphocytes. *Semin Hematol.* 2003; 40: 213–220.
 73. Zambello R., Trentin L., Facco M. i wsp. Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3⁺ granular lymphocytes. *Cancer Res.* 1995; 55: 6140–6145.
 74. O'Keefe C.L., Plasilova M., Wlodarski M. i wsp. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J. Immunol.* 2004; 172: 1960–1969.
 75. Wlodarski M.W., O'Keefe C., Howe E.C. i wsp. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2005; 106: 2769–2780.
 76. Prochorec-Sobieszek M., Rymkiewicz G., Makuch-Lasica H. i wsp. Characteristics of T-cell large granular lymphocyte proliferations associated with neutropenia and inflammatory arthropathy. *Arthritis Research and Therapy* 2008; 10: R55.
 77. Wlodarski M.W., Nearman Z., Jankowska A. i wsp. Phenotypic differences between healthy effector CTL and leukemic LGL cells support the notion of antigen-triggered clonal transformation in T-LGL leukemia. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 83: 589–601.
 78. Tagawa S., Mizuki M., Onoi U. i wsp. Transformation of large granular lymphocytic leukemia during the course of a reactivated human herpesvirus-6 infection. *Leukemia* 1992; 6: 465–469.
 79. Loughran T.P. Jr, Hadlock K.G., Perzova R. i wsp. Epitope mapping of HTLV envelope seroreactivity in LGL leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1998; 101: 318–324.
 80. Davey M.P., Starkebaum G., Loughran T.P. Jr. CD3⁺ leukemic large granular lymphocytes utilize diverse T-cell receptor V beta genes. *Blood* 1995; 85: 146–150.
 81. Garrido P., Ruiz-Cabello F., Barcena P. i wsp. Monoclonal TCR-Vbeta13.1⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood* 2007; 109: 4890–4898.
 82. Ju S.T., Panka D.J., Cui H. i wsp. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373: 444–448.
 83. Mollet L., Fautrel B., Leblond V. i wsp. Leukemic CD3⁺ LGL share functional properties with their CD8⁺ CD57⁺ cell counterpart expanded after BMT. *Leukemia* 1999; 13: 230–240.
 84. Liu J.H., Wei S., Lamy T. i wsp. Chronic neutropenia mediated by fas ligand. *Blood* 2000; 95: 3219–3222.
 85. Liu J.H., Wei S., Lamy T. Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia. *Blood* 2002; 100: 1449–1453.
 86. Saitoh T., Karasawa M., Sakuraya M. i wsp. Improvement of extrathymic T cell type of large granular lymphocyte (LGL) leukemia by cyclosporin A: the serum level of Fas ligand is a marker of LGL leukemia activity. *Eur. J. Haematol.* 2000; 65: 272–275.
 87. Shah M.V., Zhang R., Irby R. i wsp. Molecular profiling of LGL leukemia reveals role of sphingolipid signaling in survival of cytotoxic lymphocytes. *Blood* 2008; 112: 770–781.
 88. Epling-Burnette P.K., Liu J.H., Catlett-Falcone R. i wsp. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 351–362.
 89. Wlodarski M.W., Schade A.E., Maciejewski J.P. T-large granular lymphocyte leukemia: current molecular concepts. *Hematology* 2006; 11: 245–256.
 90. Felty A.R. Chronic arthritis in the adult associated with splenomegaly and leukopenia: A report of five cases of an unusual clinical syndrome. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 1924; 35: 16–20.
 91. Bowman S.J., Corrigan V., Panayi G.S., Lanchbury J.S. Hematologic and cytofluorographic analysis of patients with Felty's syndrome. A hypothesis that a discrete event leads to large granular lymphocyte expansions in this condition. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 1252–1259.
 92. Starkebaum G., Loughran T.P. Jr, Gaur L.K., Davis P., Nepom B.S. Immunogenetic similarities between patients with Felty's syndrome and those with clonal expansions of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 624–626.

93. Prochorec-Sobieszek M., Wagner T., Maryniak R. Felty's syndrome and T-cell large granular lymphocyte leukemia similarities and differences. *Reumatologia* 2007; 46: 85–91.
94. Loughran T.P. Jr, Starkebaum G., Kidd P., Neiman P. Clonal proliferation of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 31–36.
95. Gonzales-Chambers R., Przepiorka D., Winkelstein A. i wsp. Lymphocyte subsets associated with T cell receptor beta-chain gene rearrangement in patients with rheumatoid arthritis and neutropenia. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 516–520.
96. Bowman S.J., Bhavnani M., Geddes C. i wsp. Large granular lymphocyte expansions in patients with Felty's syndrome: analysis using anti-T cell receptor Vbeta-specific monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 101: 18–24.
97. Burks E.J., Loughran T.P. Jr. Pathogenesis of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia and Felty syndrome. *Blood Rev.* 2006; 20: 245–266.
98. Friedman J., Schattner A., Shvidel L., Berrebi A. Characterization of T-cell large granular lymphocyte leukemia associated with Sjögren's syndrome-an important but under-recognized association. *Semin. Arthritis Rheum.* 2006; 35: 306–311.
99. Marlton P., Taylor K., Elliott S., McCormack J. Monoclonal large granular lymphocyte proliferation in SLE with HTLV-I seroreactivity. *Aust. N. Z. J. Med.* 1992; 22: 54–55.
100. Charlanne H., Lambert M., Hachulla E. i wsp. Large granular lymphocyte leukaemia associated with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 1197–1198.
101. Kondo H., Watanabe J., Iwasaki H. T-large granular lymphocyte leukemia accompanied by an increase of natural killer cells (CD3⁺) and associated with ulcerative colitis and autoimmune hepatitis. *Leuk. Lymphoma* 2001; 41: 207–212.
102. Sivakumaran M., Richards S. Immunological abnormalities of chronic large granular lymphocytosis. *Clin. Lab. Haem.* 1997; 19: 57–60.
103. Gentile T.C., Loughran T.P. Jr. Resolution of autoimmune hemolytic anemia following splenectomy in CD3⁺ large granular lymphocyte leukemia. *Leuk. Lymphoma* 1996; 23: 405–408.
104. Go R.S., Li C.Y., Tefferi A., Philylyk R.L. Acquired pure red cell aplasia associated with lymphoproliferative disease of granular T lymphocytes. *Blood* 2001; 98: 483–485.
105. Go R.S., Tefferi A., Li C.Y., Lust J.A., Philylyk R.L. Lymphoproliferative disease of granular T lymphocytes presenting as aplastic anemia. *Blood* 2000; 96: 3644–3646.
106. Karadimitris A., Manavalan J.S., Thaler H.T. i wsp. Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2000; 96: 2613–2620.
107. Sauntharajah Y., Mollndrem J.L., Rivera M. i wsp. Coincident myelodysplastic syndrome and T-cell large granular lymphocytic disease: clinical and pathophysiological features. *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 195–200.
108. Viny A.D., Lichtin A., Pohlman B., Loughran T., Maciejewski J. Chronic B-cell dyscrasias are an important clinical feature of T-LGL leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49: 932–938.
109. Sze D.M., Giesajtis G., Brown R.D. i wsp. Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8⁽⁺⁾CD57⁽⁺⁾CD28⁽⁻⁾ compartment. *Blood* 2001; 98: 2817–2827.
110. Loughran T.P. Jr, Clark E.A., Price T.H. i wsp. Adult-onset cyclic neutropenia is associated with increased large granular lymphocytes. *Blood* 1986; 68: 1082–1087.
111. Volkheimer A.D., Weinberg J.B., Beasley B.E. i wsp. Progressive immunoglobulin gene mutations in chronic lymphocytic leukemia: evidence for antigen-driven intraclonal diversification. *Blood* 2007; 109: 1559–1567.
112. Gentile T.C., Hadlock K.G., Uner A.H. i wsp. Large granular lymphocyte leukaemia occurring after renal transplantation. *Br. J. Haematol.* 1998; 101: 507–512.
113. Feher O., Barilla D., Locker J., Oliveri D., Melhem M., Winkelstein A. T-cell large granular lymphocytic leukemia following orthotopic liver transplantation. *Am. J. Hematol.* 1995; 49: 216–220.
114. Au W.Y., Lam C.C., Lie A.K., Pang A., Kwong Y.L. T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003; 120: 626–630.
115. Chang H., Kamel-Reid S., Hussain N., Lipton J., Messner H.A. T-cell large granular lymphocytic leukemia of donor origin occurring after allogeneic bone marrow transplantation for β -cell lymphoproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 123: 196–199.
116. Perzova R., Loughran T.P. Jr. Constitutive expression of Fas ligand in large granular lymphocyte leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1997; 97: 123–126.
117. Maciejewski J., Selleri C., Anderson S., Young N.S. Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995; 85: 3183–3190.
118. Bank I., Cohen L., Kneller A., De Rosbo N.K., Book M., Ben-Nun A. Aberrant T-cell receptor signaling of interferon-gamma- and tumor necrosis factor- α -producing cytotoxic CD8⁺ Vdelta1/Vbeta16 T cells in a patient with chronic neutropenia. *Scand. J. Immunol.* 2003; 58: 89–98.
119. Osuji N., Matutes E., Tjonnfjord G. i wsp. T-cell large granular lymphocyte leukemia. A report on the treatment of 29 of patients and a review of the literature. *Cancer* 2006; 107: 570–578.
120. Sood R., Stewart C.C., Aplan P.D. i wsp. Neutropenia associated with T-cell large granular lymphocyte leukemia: long-term response to cyclosporine therapy despite persistence of abnormal cells. *Blood* 1998; 91: 3372–3378.
121. Hamidou M.A., Sadr F.B., Lamy T., Raffi F., Grolleau J.Y., Barrier J.H. Low-dose methotrexate for the treatment of patients with large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 2000; 108: 730–732.
122. Battiwala M., Melenhorst J., Sauntharajah Y. i wsp. HLA-DR4 predicts haematological response to cyclosporine in T-large granular lymphocyte lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 2003; 123: 449–453.
123. Alekshun T.J., Sokol L. Diseases of large granular lymphocytes. *Cancer Control.* 2007; 14: 141–150.
124. Semenzato G., Zambello R., Starkebaum G., Oshimi K., Loughran T.P. Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 1997; 89: 256–260.
125. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A. i wsp. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 315–324.
126. Campion G., Maddison P.J., Goulding N. i wsp. The Felty syndrome: a case-matched study of clinical manifestations and outcome, serologic features, and immunogenetic associations. *Medicine (Baltimore)* 1990; 69: 69–80.
127. van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M. i wsp. 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; 12: 2257–2317.
128. Prochorec-Sobieszek M., Chelstowska M., Rymkiewicz G., Majewski M., Warzocha K., Maryniak R.: Biclinal T-cell receptor $\gamma\delta^+$ large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49: 828–831.
129. Nowakowski G.S., Morice W.G., Zent C.S. i wsp. Initial presentation and prognostic factors in 286 patients with T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2006; 108: ab.300.
130. Frydecka I., Nowacka J., Slesak B., Radomska W. Niecodzienny przypadek jednoczesnego nowotworowego i odczynowego wzrostu ziarnistych limfocytów. *Acta Haematol. Pol.* 1992; 23: 117–121.
131. Kowal M., Dmoszyńska A. 2-chlorodeoksyadenozyna w leczeniu białaczki z dużych ziarnistych limfocytów. *Acta Haematol. Pol.* 1996; 27: 431–435.
132. Czyż A., Goździk J., Hansz J. Złożoność obrazu klinicznego oraz zróżnicowana skuteczność leczenia chorych z nowotworową proliferacją dużych ziarnistych limfocytów T — opis trzech chorych. *Acta Haematol. Pol.* 1997; 28: 443–447.
133. Robak T. Ty-limfocytoza z granulocytopenią — białaczka czy odczyn? *Acta Haematol. Pol.* 1990; 21: 97–104.

134. Góra-Tybor J., Robak T. Klonalny rozrost dużych ziarnistych limfocytów — białaczka LGL. *Acta Haematol. Pol.* 1995; 26: 115–122.
135. Kowal M., Dmoszyńska A. Proliferacja poliklonalna i klonalna z dużych limfocytów ziarnistych. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1995; 94: 349–357.
136. Kowal M., Dmoszyńska A. Proliferacja dużych ziarnistych limfocytów w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 1996; 34: 335–339.
137. Kowal M., Dmoszyńska A. Charakterystyka biologiczna i kliniczna białaczek dużych ziarnistych limfocytów. *Acta Haematol. Pol.* 1998; 29 (supl. 1): 84–89.
138. Sabnani I., Tsang P. Are clonal T-cell large granular lymphocytes to blame for unexplained haematological abnormalities? *Br. J. Haematol.* 2006; 136: 30–37.
139. Starkebaum G., Singer J.W., Arend W.P. Humoral and cellular immune mechanisms of neutropenia in patients with Felty's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 39: 307–314.
140. Kothapalli R., Nyland S.B., Kusmartseva I., Bailey R.D., McKeown T.M., Loughran T.P. Jr. Constitutive production of proinflammatory cytokines RANTES, MIP-1beta and IL-18 characterizes LGL leukemia. *Int. J. Oncol.* 2005; 26: 529–535.
141. Hartman K.R., LaRossa V.F., Rothwell S.W., Atolagbe T.O., Ward F.T., Klipple G. Antibodies to myeloid precursor cells in autoimmune neutropenia. *Blood* 1994; 84: 625–631.
142. Rashba E.J., Rowe J.M., Packman C.H. Treatment of the neutropenia of Felty syndrome. *Blood Rev.* 1996; 10: 177–184.
143. Subbiah V., Viny A.D., Rosenblatt S., Pohlman B., Lichtin A., Maciejewski J.P. Outcomes of splenectomy in T-cell large granular lymphocyte leukemia with splenomegaly and cytopenia. *Exp. Hematol.* 2008; 36: 1078–1083.
144. Abkowitz J.L., Kadin M.E., Powell J.S., Adamson J.W. Pure red cell aplasia: lymphocyte inhibition of erythropoiesis. *Br. J. Haematol.* 1986; 63: 59–67.
145. Lacy M.Q., Kurtin P.J., Tefferi A. Pure red cell aplasia: association with large granular lymphocyte leukemia and the prognostic value of cytogenetic abnormalities. *Blood* 1996; 87: 3000–3006.
146. Bownan S.J. Hematological manifestations of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2002; 31: 251–259.
147. Bassan R., Pronesti M., Buzzetti M. i wsp. Autoimmunity and B-cell dysfunction in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Cancer* 1989; 63: 90–95.
148. Gentile T.C., Wener M.H., Starkebaum G., Loughran T.P. Jr. Humoral immune abnormalities in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Leuk. Lymphoma* 1996; 23: 365–370.
149. Shvidel L., Duksin C., Tzimanis A. i wsp. Cytokine release by activated T-cells in large granular lymphocytic leukemia associated with autoimmune disorders. *Hematol. J.* 2002; 3: 32–37.
150. Włodarski M.W., Nearman Z., Jiang Y., Lichtin A., Maciejewski J.P. Clonal predominance of CD8(+) T cells in patients with unexplained neutropenia. *Exp. Hematol.* 2008; 36: 293–300.
151. Huh Y.O., Medeiros L.J., Ravandi F., Konoplev S., Jorgensen J.L., Miranda R.N. T-cell large granular lymphocyte leukemia associated with myelodysplastic syndrome: a clinicopathologic study of nine cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 131: 347–356.
152. Kochenderfer J.N., Kobayashi S., Wieder E.D., Su C., Molldrem J.J. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood* 2002; 100: 3639–3645.
153. Włodarski M.W., Gondek L.P., Nearman Z.P. i wsp. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006; 108: 2632–2641.
154. Engels K., Oeschger S., Hansmann M.L., Hillebrand M., Kriener S. Bone marrow trephines containing lymphoid aggregates from patients with rheumatoid and other autoimmune disorders frequently show clonal B-cell infiltrates. *Hum. Pathol.* 2007; 38: 1402–1411.
155. Costes V., Duchayne E., Taib J. i wsp. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a common growth pattern for different lymphoma subtypes. *Br. J. Haematol.* 2002; 119: 916–922.
156. Thiele J., Zirbes T.K., Kvasnicka H.M., Fischer R. Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma—a practical guideline. *J. Clin. Pathol.* 1999; 52: 294–300.
157. Navone R., Valpreda M., Pich A. Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. *Acta Haematol.* 1985; 74: 19–22.
158. Fend F., Kremer M. Diagnosis and classification of malignant lymphoma and related entities in the bone marrow trephine biopsy. *Pathobiology* 2007; 74: 133–143.
159. Sivakumaran M., Richards S.J., Hunt K.M. i wsp. Patterns of CD16 expression in persistent expansions of CD3⁺NKα⁺ lymphocytes are predictive for clonal T-cell receptor gene rearrangements. The Yorkshire Leukaemia Group. *Br. J. Haematol.* 1991; 78: 368–377.
160. Bourgault-Rouxel A.S., Loughran T.P. Jr, Zambello R. i wsp. Clinical spectrum of $\gamma\delta$ + T cell LGL leukemia: Analysis of 20 cases. *Leuk. Res.* 2008; 32: 45–48.
161. Vartholomatos G., Alymara V., Dova L., Kolaitis N., Bourantas K.L. T-cell receptor gammadelta-large granular lymphocytic leukemia associated with an aberrant phenotype and TCR- β 20 clonality. *Haematologica* 2004; 89: e52–e54.
162. Makishima H., Ishida F., Saito H. i wsp. Lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with T-cell receptor gamma delta-positive phenotype: restricted usage of T-cell receptor gamma and delta subunit genes. *Eur. J. Haematol.* 2003; 70: 212–218.
163. Belhadj K., Reyes F., Farcet J.P. i wsp. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood* 2003; 102: 4261–4269.
164. Vega F., Medeiros L.J., Gaulard P. Hepatosplenic and other gammadelta T-cell lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 127: 869–880.
165. Alonsozana E.L., Stamberg J., Kumar D. i wsp. Isochromosome 7q: the primary cytogenetic abnormality in hepatosplenic gammadelta T cell lymphoma. *Leukemia* 1997; 11: 1367–1372.
166. de Wolf-Peeters C., Achten R. Gammadelta T-cell lymphomas: a homogenous entity? *Histopathology* 2000; 36: 264–305.
167. Macon W.R., Williams M.E., Greer J.P. i wsp. Natural killer-like T-cell lymphomas: aggressive lymphomas of T-large granular lymphocytes. *Blood* 1996; 87: 1474–1483.
168. Alekshun T.J., Tao J., Sokol L. Aggressive T-cell large granular lymphocyte leukemia: A case report and review of the literature. *Am. J. Hematol.* 2007; 82: 481–485.
169. Matutes E., Wotherspoon A.C., Parker N.E., Osuji N., Isaacson P.G., Catovsky D. Transformation of T-cell large granular lymphocyte leukaemia into a high-grade large T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 801–806.
170. Wallis W.J., Loughran T.P. Jr, Kadin M.E., Clark E.A., Starkebaum G.A. Polyarthrititis and neutropenia associated with circulating large granular lymphocytes. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103: 357–362.
171. Barton J.C., Prasthofer E.F., Egan M.L., Heck L.W., Koopman W.J., Grossi C.E. Rheumatoid arthritis associated with expanded populations of granular lymphocytes. *Ann. Intern. Med.* 1986; 104: 314–323.
172. Kachan K., Loughran T.P. Jr. Antigen-driven clonal T cell expansion in disorders of hematopoiesis. *Leuk. Res.* 2003; 27: 291–292.
173. Snowden N., Kay R.A. Immunology of systemic rheumatoid disease. *Br. Med. Bull.* 1995; 51: 437–448.
174. Der Simonian H., Sugita M., Glass D.N. i wsp. Clonal V α 12.1 + T cell expansions in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1623–1631.
175. Bray R.A., Pope R.M., Landay A.L. Identification of a population of large granular lymphocytes obtained from the rheumatoid joint coexpressing the CD3 and CD16 antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1991; 58: 409–418.
176. Starkebaum G. Leukemia of large granular lymphocytes and rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 2000; 108: 744–745.
177. Langerak A.W., van Den Bemd R., Wolvers-Tettero I.L. i wsp. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCR α beta T-cell proliferations. *Blood* 2001; 98: 165–173.