

Zastosowanie techniki interfazalnej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do badań cytogenetycznych na skrawkach parafinowych u dzieci z nieziarniczymi chłoniakami złośliwymi

Grażyna Wróbel¹, Jolanta Rygier², Katarzyna Pyrda², Lucyna Maciejka-Kapuścińska³,
Elżbieta Gamian⁴, Barbara Pieńkowska-Grela²

Wstęp. Według klasyfikacji WHO wykrycie aberracji cytogenetycznych w komórkach nowotworowych pozwala na bardziej precyzyjne określenie podtypu chłoniaka. Technika FISH daje możliwość analizy zmian genetycznych w komórkach znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego.

Celem pracy było opracowanie metody diagnostyki zmian cytogenetycznych z zastosowaniem techniki FISH do jąder interfazowych, uzyskiwanych z bloczków parafinowych, w przypadkach nieziarniczych chłoniaków złośliwych u dzieci.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono u 38 chorych z chłoniakami nieziarniczymi, w wieku od 1–16 lat (mediana 8,3) zdiagnozowanych w latach 1993–2000. Przedmiotem badań były fragmenty tkanki nowotworowej zatopione w parafinie. W I etapie pracy doświadczalnie opracowano metodę ekstrakcji jąder komórkowych ze skrawków parafinowych. W II etapie zastosowano procedurę FISH do jąder interfazowych uzyskanych z bloczków parafinowych od 28 dzieci.

Wyniki. Doświadczalnie ustalono optymalne parametry izolacji jąder komórkowych ze skrawków parafinowych. Po zastosowaniu techniki FISH do jąder interfazowych uzyskano pozytywny wynik hybrydyzacji w 36/40 badanych preparatów (90%), od 24/28 dzieci (87,5%); aberracje chromosomowe stwierdzono u 11/28 chorych (39,3%), w tym: w 6/17 przypadków chłoniaka B-komórkowego, w 2/5 limfoblastycznego i 3/6 anaplastycznego wielkokomórkowego.

Wnioski. Analiza FISH na materiale uzyskanym z bloczków parafinowych niesie za sobą trudności interpretacyjne. Zastosowanie metody izolacji jąder komórkowych zwiększa wykrywalność zmian cytogenetycznych w archiwalnym materiale biopsyjnym techniką FISH. Warunkiem wykorzystania materiału archiwalnego do analizy FISH jest standaryzacja metod utrwalania materiału w parafinie. Ocena znaczenia wykrytych zmian cytogenetycznych wymaga dalszych badań z dużą grupą pacjentów poddanych długotrwałej obserwacji.

The use of interphase fluorescence *in situ* hybridization for cytogenetic analysis on paraffin sections in children with non-Hodgkin lymphomas

Background. According to WHO classification, the detection of genetic alterations in tumor cells enables definition of the subtype of lymphoma more precisely. The FISH technique allows analysis of cytogenetic changes in the cells in any phase of the cell cycle. The aim of this work was to develop the method of cytogenetic analysis with the use of FISH on interphase nuclei extracted from paraffin-embedded sections, in cases of children with non-Hodgkin lymphomas.

Material and methods. The study population was 38 children with non-Hodgkin lymphoma aged from 1 to 16 years (median age 8.3), diagnosed between 1993 and 2000. We tested paraffin-embedded malignant tissues. In the first

¹Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

²Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

³Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Gdańsku

⁴Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

stage of the work we developed the method of nuclei extraction from paraffin sections, then in the second stage we used it with FISH analysis in material from 28 children.

Results. We devised the optimal patterns of nuclei extraction from paraffin sections. FISH performed on the extracted interphase nuclei were positive in 36/40 (90%) of tested specimens of 24/28 patients (85.7%). We detected the cytogenetic changes in 11/28 patients (39.3%): in 6/17 cases of B-cell lymphoma, 2/5 lymphoblastic lymphoma and 3/6 anaplastic large cell lymphoma.

Conclusions. FISH analysis performed on paraffin-embedded tissues is, due to different reasons, difficult to evaluate. The introduction of interphase nuclei extraction method allows the increase in the detection of cytogenetic alterations by FISH in archival biopsied material. However, this technique requires an efficient fixation procedure. To define the significance of cytogenetic aberrations in pediatric lymphomas, further studies of large series of patients with long follow-up should be undertaken.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2012; 62, 4: 269–273

Słowa kluczowe: chłoniak nieziarniczy, diagnostyka, ekstrakcja jąder komórkowych

Key words: non-Hodgkin lymphoma, diagnosis, nuclei extraction

Badania genetyczne zrealizowano częściowo w oparciu o grant KBN 4PO5E 043 18 pt.: „Wykorzystanie badań genetycznych i biomolekularnych dla diagnostyki, prognozowania i optymalizacji leczenia nieziarniczego chłoniaka złośliwego u dzieci”.

Wstęp

Nieziarnicze chłoniaki złośliwe (NHL) to bardzo zróżnicowana grupa nowotworów układu chłonnego, wymagająca szeroko zakrojonej diagnostyki. Do współczesnych narzędzi diagnostycznych NHL należą: badanie histopatologiczne, immunohistochemiczne i/lub cytofluorymetryczne, klasyczne badanie cytogenetyczne i badania molekularne, np. z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) lub łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) [1]. Według wskazań WHO określenie zmian genetycznych w tkance nowotworów układu chłonnego jest jednym z istotnych kryteriów klasyfikacji NHL [2]. W wielu przypadkach fragmenty tkanki nowotworowej po pobraniu są utrwalane w formalinie, następnie zatapiane w bloczkach parafinowych i z tego powodu stają się niedostępne dla badania cytogenetycznego metodami tradycyjnymi, w którym wymagane jest użycie komórek w stadium metafazy. Technika interfazowa fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (i-FISH) z wykorzystaniem odpowiednich sond DNA rozszerza możliwości analizy cytogenetycznej o materiał archiwalny z bloczków parafinowych, pozwalając na ocenę liczby kopii chromosomów, rearanżacji lub fuzji genów [3–5].

Zasadniczym celem pracy było opracowanie metody diagnostyki zmian cytogenetycznych z zastosowaniem techniki FISH do jąder interfazowych (i-FISH), wyizolowanych z komórek NHL, pochodzących z archiwalnego materiału biopsyjnego zatopionego w parafinie.

Drugim celem było zastosowanie zmodyfikowanej techniki i-FISH z użyciem ukierunkowanych sond DNA do wykrywania zmian w obrębie wybranych genów w utrwalonych komórkach NHL.

Materiał i metody

Pacjenci

Analizę retrospektywną objęto 38 dzieci z NHL w wieku od 1–16 lat (mediana 8,3) leczonych w latach 1993–2000 w ośrodkach onkologiczno-hematologicznych Polskiej Pediatricznej Grupy Leczenia Białaczek i Chłoniaków. Rozpoznanie NHL ustalano na podstawie obowiązujących w tym czasie kryteriów morfologicznych i immunofenotypowych, opierając się na klasyfikacji REAL/WHO [6], i weryfikowano centralnie.

Materiał i procedury przygotowania do badań techniką FISH

Przedmiotem badań były fragmenty tkanki nowotworowej utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie, pobrane z guza węzłowego lub pozawęzłowego w trakcie rutynowej diagnostyki wstępnej. Badania obejmowały 2 fazy: I okres doświadczalny modyfikowania i wdrażania techniki FISH (lata 2004–2005) i II zasadniczy etap badawczy (lata 2008–2009) z użyciem przetestowanej i zmodyfikowanej metody izolacji jąder komórkowych ze skrawków parafinowych (SP). W I okresie badano SP różnej grubości (4–5 μm , 20–40 μm) z tkanką nowotworową utrwaloną w formalinie w warunkach niepełnej standaryzacji (brak możliwości ustalenia stężenia procentowego formaliny i czasu utrwalania). SP cienkie (4–5 μm) nanoszono na adhezyjne szkiełka podstawowe (SuperFrost Plus firmy Menzel GmbH&CoKG), następnie odparafinowano i trawiono proteazą z zastosowaniem zestawu Vysis (Paraffin Pretreatment Kit I, VYSIS nr 2J0232). Z grubych SP (20–40 μm) izolowano jądra komórkowe zgodnie z poniższą procedurą Etapu I, a następnie stosowano zestaw odczynników Vysis (Etap II).

Tabela I. Rodzaje zastosowanych sond DNA do wykrywania wytypowanych zmian genetycznych w zależności od podtypu chłoniaka

Typ NHL	Nazwa sondy	Rodzaj zmiany cytogenetycznej
B NHL [#]	Sonda rozdzielcza LSI MYC (DC, BAR)	Rearanżacja genu MYC (8q24)
	Sonda fuzyjna LSI IGH/MYC	Fuzja genów MYC/IGH t(8;14)
	CEP8 (TC,DF)	Fuzja genów MYC/IGH t(8;14)
	Sonda fuzyjna IGH/BCL2 (DC,DF)	Fuzja genów IGH/BCL2 t(14;18)
	Sonda punktowa LSI TP53 (SO)	Delecja genu TP53 (17p13)
ALCL [*]	Sonda rozdzielcza LSI ALK (DC, BAR)	Rearanżacja genu ALK (2p23)
	Sonda punktowa LSI TP53 (SO)	Delecja genu TP53 (17p13)
LBL [^]	Sonda rozdzielcza LSI TCR (DC, BAR)	Rearanżacja genu TCR A/D (14q11)
	Sonda fuzyjna LSI BCR/ABL (DC, DF)	Fuzja genów BCR/ABL
	Sonda punktowa LSI D13S319 (SO)	Delecja 13q14
	Sonda rozdzielcza LSI BCL2 (DC, BAR)	Rearanżacja genu BCL2(18q21)

chłoniak B-komórkowy; * anaplastyczny chłoniak wielkokomórkowy; ^ chłoniak limfoblastyczny

Etap I — izolacja komórek ze skrawków parafinowych o grubości 30 µm obejmowała w kolejności: a) odparafinowanie: 3 × 10 min (ok. 800 µl ksylenu); b) nawodnienie w wodnych roztworach alkoholu etylowego o malejących stężeniach od 95% do 50%; c) rozdrobnienie materiału; d) trawienie enzymatyczne za pomocą: 1) roztworu proteinyazy K 60 min, 37°C; 2) lub roztworu pepsyny (5%), (ok. 1000 µl), 60–120 min, 37°C; e) wirowanie — 10 min, ok. 3000 rpm, płukanie PBS; f) utrwalanie: 3 × utrwalacz (metanol + kwas octowy).

Etap II. Technika przygotowania preparatów z zastosowaniem zestawu Vysis (Paraffin Pretreatment Kit I, VYSIS nr 2J0232; wg przepisu producenta). W miejsce cienkich SP na szkiełko podstawowe nakładano zawieszinę utrwalonych jąder komórkowych, wyizolowanych zgodnie z procedurą etapu I. Następnie przeprowadzano hybrydyzację wybranej sondy DNA zgodnie z zaleceniami producenta. Do każdej użytej próby wykonywano 2 próby kontrolne na standardowym materiale utrwalonym cytogenetycznie (zawiesina komórek) dla sprawdzenia jakości sondy i ustalenia granicy błędu (kontrola dodatnia: 2 preparaty z badaną zmianą; kontrola ujemna: 2 preparaty z krwi zdrowego dawcy). Przyjęto następujące granice błędów: dla sond pojedynczych (sonda znakująca gen TP53) 10%, natomiast dla dwukolorowych sond rozdzielczych, znakujących geny ALK, MYC, TCR A/D i dla sond wykazujących fuzję genów BCR i ABL, IGH i BCL2 oraz IGH i MYC z uwidocznieniem centromeru chromosomu 8 wyznaczona granica błędu wynosiła 5%. Szczegółowy wykaz zastosowanych sond DNA (producent Vysis, Abbott Laboratories) zestawiono w tabeli I. W I okresie testowano optymalną grubość SP i 3 rodzaje enzymów (pepsyna, proteaza, trypsyna) w różnych stężeniach i czasach trawienia. W tym okresie technikę FISH zastosowano w 30 preparatach od 10 chorych z NHL: 6 z anaplastycznym chłoniakiem wielkokomórkowym (ALCL), 4 z limfoblastycznym chłoniakiem T-komórkowym (LBL-T). W II okresie badano wyselekcjo-

nowany materiał archiwalny, utrwalony w zbuforowanej formalinie (pH 7,0), a czas inkubacji nie przekraczał 48 godzin. Preparaty do hybrydyzacji DNA przygotowywano za pomocą wcześniej opracowanej procedury dwustopniowej z jednolitym czasem trawienia 45 min. W ten sposób zbadano 40 preparatów od 28 dzieci z NHL: 17 pacjentów z chłoniakiem B-komórkowym (B-NHL), w tym 16 z chłoniakiem Burkitta (BL) i 1 — z chłoniakiem z dużych komórek B (DLBCL), 6 pacjentów z ALCL oraz 5 pacjentów z LBL-T.

Przy użyciu ukierunkowanych sond DNA badano różne rodzaje pierwotnych zmian cytogenetycznych w zależności od podtypu NHL (tab. I).

Wyniki

W I etapie ustalono, że optymalna grubość SP poddawanych wstępnej obróbce przed zastosowaniem metody FISH powinna wynosić 30 µm, przy utrwalaniu zawiesziny jąder mieszaniną Carnoya, po uprzedniej hypotonizacji 0,075 M KCL. Ponadto, przy testowanym czasie trawienia preparatów 15–90 min, informatywne znakowanie uzyskano u 1/6 pacjentów z ALCL i 2/4 z LBL-T, łącznie w 5/30 (16,7%) badanych preparatów i u 3/10 chorych. W przypadku ALCL wykazano rearanżację w obrębie genu ALK, w grupie LBL-T w jednym przypadku wykluczono delecję w regionie 13q14, a w drugim — obecność fuzji BCR/ABL. Ze względu na niską skuteczność metody badania wyniki I etapu zostały wyłączone z dalszego opracowania.

W II etapie badań wynik informatywny osiągnięto u 24/28 dzieci (87,5%) w 90% (36/40) badanych preparatów, w tym w 13/17 przypadków z B-NHL, w 6/6 ALCL i 5/5 LBL-T. Wśród przypadków informatywnych zmiany obejmujące co najmniej jeden z badanych obszarów wykazano u 11 pacjentów (tab. II). U chorych z B-NHL (#1, 2, 3) i potwierdzoną rearanżacją genu MYC odsetek jąder interfazowych z wykrytą zmianą wahał się od 13% do 50%. W przypadku #1 określono następnie partnerski gen fuzyjny, potwier-

Tabela II. Aberracje chromosomowe wykryte techniką FISH w komórkach NHL wyizolowanych ze skrawków parafinowych

Nr pacjenta	Typ zmiany	Odsetek jąder interfazowych ze zmianą	Liczba analizowanych komórek
<i>A. B-NHL (BL):</i>			
#1	Rearanżacja MYC	+ (50%)	216
	Fuzja MYC/IGH	+ (50%)	117
	Fuzja BCL2/IGH	– (0%)	162
	Delecja TP53	nt	–
#2	Rearanżacja MYC	+ (13%)	151
	Fuzja MYC/IGH	nt	–
	Fuzja BCL2/IGH	+ (27%)	126
	Delecja TP53	– (7%)*	110
#3	Rearanżacja MYC	+ (8%)	126
	Fuzja MYC/IGH	– (0%)	98
	Fuzja BCL2/IGH	+ (64%)	111
	Delecja TP53	– (0%)	127
#4	Rearanżacja MYC	– (5%)*	65
	Fuzja MYC/IGH	– 0%	128
	Fuzja BCL2/IGH	+ (100%)	61
	Delecja TP53	– (0%)	74
#5	Rearanżacja MYC	– (4%)*	122
	Fuzja MYC/IGH	nt	–
	Fuzja BCL2/IGH	+ (100%)	76
	Delecja TP53	– (0%)	157
#6	Rearanżacja MYC	– (0%)	40
	Fuzja MYC/IGH	nt	–
	Fuzja BCL2/IGH	+ (87%)	97
	Delecja TP53	– (0%)	116
<i>B. ALCL:</i>			
#7	Rearanżacja ALK	+ (40%)	179
	Delecja TP53	– (1%)*	125
#8	Rearanżacja ALK	+ (15%)	102
	Delecja TP53	– (7%)*	116
#9	Rearanżacja ALK	+ (14%)	104
	Delecja TP53	– (3%)*	102
<i>C. LBL:</i>			
#10	Rearanżacja TCR A/D	+ (56%)	94
#11	Rearanżacja TCR A/D	+ (18%)	84

+ obecność zmiany; – brak zmiany; nt — nie testowano; * w zakresie granicy błędu

dając obecność typowej fuzji *IGH/MYC*. W przypadkach #2 i #3 gen partnerski pozostał nieznan: w #3 rearanżacji *MYC* nie towarzyszyła fuzja *IGH/MYC*, zaś w #2 badania w kierunku fuzji *MYC/IGH* nie przeprowadzono z powodu braku materiału. W przypadku #4 prawidłowy status genu *MYC* potwierdzony został wykazaniem braku fuzji *MYC/IGH*. W grupie 5 pacjentów z B-NHL (#2, 3, 4, 5, 6) ujawniono

obecność fuzji *IGH/BCL2*, która występowała w zmiennym odsetku komórek (27–100%). Fuzji *IGH/BCL2* w 2 przypadkach towarzyszyła rearanżacja *MYC* (#2 i #3). Status genu *TP53* pozostał niezmieniony w 5 badanych przypadkach B-NHL. W grupie dzieci z ALCL u 3/6 wykazano obecność rearanżacji genu *ALK(2p23)* i brak delecji *TP53*. W ostatniej badanej grupie T-LBL u 2 pacjentów stwierdzono rearanżację genu *TCR A/D*, podczas gdy u 3 pozostałych zmiana ta nie ujawniła się. Analiza wyników leczenia w badanej grupie dzieci wykazała, że wszyscy pacjenci z pojedynczymi lub dwoma zmianami genetycznymi żyją wolni od choroby przez 6,5–10 lat. U 1 chorego z B-NHL, który zmarł z powodu progresji, nie wykryto zmian genetycznych klasycznych dla BL. W grupie ALCL u pacjenta z najsilniej wyrażonymi zmianami cytogenetycznymi (40% komórek z rearanżacją) doszło do wczesnego nawrotu chłoniaka i zgonu z powodu progresji.

Omówienie

W porównaniu z klasycznym badaniem cytogenetycznym technika FISH charakteryzuje się wyższym poziomem rozdzielczości i umożliwia analizę cytogenetyczną komórek interfazowych, pochodzących również z blozków parafinowych. Metoda ta jest technicznie trudniejsza od typowego badania FISH i ma swoje ograniczenia. W I okresie badań wydajność techniki FISH była stosunkowo niska. W większości przypadków morfologia komórek wskazywała na znaczny stopień degradacji materiału. Nie uzyskiwaliśmy specyficznego znakowania DNA sondami pomimo stosowania zróżnicowanych warunków deparafinizacji, trawienia wstępnego, utrwalania preparatów czy sposobów denaturacji preparatów i sond. Stwierdziliśmy, że przyczyną degradacji DNA było prawdopodobnie nieprawidłowe utrwalanie tkanek w formalinie. Ustaliliśmy, że warunkiem koniecznym jest stosowanie zbuforowanej formaliny, a czas utrwalania nie powinien przekraczać 48 godz. Kolejnym istotnym problemem, który mógł negatywnie wpłynąć na wynik hybrydyzacji z sondami DNA, była grubość SP. Przy zastosowaniu cienkich SP o rutynowej grubości (4–5 µm) część jąder komórkowych ulega przecięciu, co powoduje utraty sygnałów z DNA. Z kolei w przypadku zbyt grubych SP, w części środkowej preparatu istnieje niebezpieczeństwo zliczania dodatkowych, nakładających się na siebie sygnałów z komórek leżących poniżej lub powyżej. Najbardziej miarodajny wynik możemy zatem uzyskać, gdy badane komórki ułożone są jednowarstwowo na powierzchni szkiełka. W tym celu zastosowaliśmy metodę ekstrakcji jąder komórkowych z zaparafinowanej tkanki [7]. Dyspersja odparafinowanego materiału pozwoliła na przygotowanie zawiesiny komórek, które po nałożeniu na szkiełka podstawowe i po utrwaleniu badaliśmy techniką i-FISH. Optymalne warunki trawienia uzyskaliśmy stosując proteinazę przez 30–60 minut. Przy użyciu wyselekcjonowanego materiału pod względem pra-

widłowego utrwalenia w formalinie (etap II) uzyskaliśmy znakowanie na większości badanych preparatów (90%). W publikacjach dotyczących techniki i-FISH w SP wykazano, że metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością (85–100%) i 100% specyficznością, ale ma swoje ograniczenia [4, 7, 8]. Paternoster i wsp. podkreślają, że istotnie negatywny wpływ na stopień degradacji materiału wyjściowego może mieć: odstęp czasowy pomiędzy pobraniem tkanki a jej utwaleniem, wiek bloczków parafinowych powyżej 10 lat i zbyt duża wieloetapowość metody, stwarzająca ryzyko utraty pewnej liczby jąder komórkowych [7]. Metoda izolacji jąder komórkowych z SP nie jest pozbawiona wad, gdyż wymaga dużej ilości tkanki i jest czasochłonna. Paternoster i wsp. zastosowali biopsje cienkoigłowe bloczków parafinowych [4], co pozwoliło im na pobranie komórek z interesującego regionu tkanki nowotworowej, a czas ekstrakcji jąder skrócił się do 2 godz. Z kolei Godon i wsp. dowiedli, że wysoka czułość i swoistość techniki FISH nie zależy od tego, z jakiego rodzaju materiału pochodzą komórki nowotworowe [9]. W przeciwieństwie do innych, Haralambieva i wsp. oceniając technikę FISH na cienkich SP, odnotowali 20% przypadków fałszywie pozytywnych [10]. O trudnościach technicznych świadczy też duża ilość odmiennych protokołów postępowania publikowanych przez badaczy. W naszym przypadku opracowanie optymalnego protokołu trwało około 2 lata, wymagało dużego nakładu pracy i było kosztochłonne. Spektrum cytogenetycznych czynników diagnostycznych i rokowniczych, w szczególności w chorobach nowotworowych, jest z roku na rok coraz szersze, a ich wykrycie może w wielu przypadkach rozstrzygać o prawidłowym rozpoznaniu i leczeniu [11–13]. Dzisiaj nikt nie ma wątpliwości, że techniki cytogenetyczne, w tym FISH, powinny stanowić jedno z podstawowych narzędzi współczesnej diagnostyki NHL. Z kolei precyzyjna diagnoza umożliwia optymalizację terapii, co zwiększa szanse chorego na pełne wyleczenie. W naszych badaniach zmiany cytogenetyczne zostały potwierdzone u części chorych. Niektóre ze zmian wykryte w B-NHL potwierdzały rozpoznanie klasycznego chłoniaka Burkitta, inne wskazywały na występowanie chłoniaka atypowego (Burkitt-like), współcześnie klasyfikowanego jako chłoniak o cechach pośrednich pomiędzy DLBCL i BL. Zwraca uwagę fakt, że w przypadku typowego BL odsetek komórek z rearanżacją *MYC* był wysoki (50%), a obecność fuzji *MYC/IGH* potwierdziła obecność charakterystycznej dla BL translokacji t(8;14)(q24;q32). Wyniki badań sugerują, że charakter wykrytych zmian cytogenetycznych może mieć znaczenie prognostyczne.

Wnioski

Wyniki pracy pozwoliły na opracowanie metody wykorzystania tkanki nowotworowej z bloczków parafinowych do badań cytogenetycznych i potwierdzają przydatność techniki i-FISH do optymalizacji diagnostyki NHL.

Analiza FISH na materiale uzyskanym z bloczków parafinowych niesie za sobą trudności interpretacyjne. Zastosowanie metody izolacji jąder komórkowych zwiększa wykrywalność zmian cytogenetycznych w archiwalnym materiale biopsyjnym techniką FISH. Warunkiem wykorzystania materiału archiwalnego do analizy FISH jest standaryzacja metod utrwalania materiału w parafinie. Ocena znaczenia wykrytych zmian cytogenetycznych wymaga dalszego całościowego badania z dużą grupą pacjentów poddanych długotrwałej obserwacji.

Dr Grażyna Wróbel

Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Akademia Medyczna we Wrocławiu
ul. Bujwida 44, 50–345 Wrocław
e-mail: wrobel.wroc@wp.pl

Otrzymano: 24 stycznia 2012 r.

Przyjęto do druku: 28 lutego 2012 r.

Piśmiennictwo

1. Gałązka K, Mioduszewska O, Maryniak R i wsp. Podstawowe zasady i organizacja diagnostyki patologicznej chłoniaków. *Polish J Pathol* 2007; 58:1–14.
2. Sverdlow SH, Campo E, Harris NL i wsp. (red.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Wyd. 4. Lyon: IARC Press; 2008.
3. Pieńkowska-Grela B. Aplikacje kliniczne badań cytogenetycznych w złośliwych chłoniakach niezłaziarniczych. *Nowotwory J Oncol* 2003; 53: 58–67.
4. Cook J. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13: 197–206.
5. Caraway NP, Gu J, Lin P i wsp. The utility of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the translocation t(11;14)(q13;q32) in the diagnosis of mantle cell lymphoma on fine-needle aspiration specimens. *Cancer* 2005; 105: 110–118.
6. Harris N, Jaffe E, Diebold J i wsp. *Lymphoma classification—from controversy to consensus: The REAL and WHO Classification of Lymphoid Neoplasms*. *Ann Oncol* 2000; 11 (Suppl.1): 3–10.
7. Paternoster S, Brockman S, McClure R i wsp. A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 2002; 160: 1967–1972.
8. Schurter MJ, LeBrun DP, Harrison KJ. Improved technique for fluorescence in situ hybridisation analysis of isolated nuclei from archival, B5 or formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *Mol Pathol* 2002; 55: 121–124.
9. Godon A, Genevieve F, Valo I i wsp. Formalin-fixed and paraffin-embedded nodal non-Hodgkin's lymphomas demonstrate the same chromosome changes as those found in frozen samples: a comparative study using interphase fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13: 97–104.
10. Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S i wsp. Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/*MYC* breakpoints on routine histologic sections: validation in Burkitt lymphomas from three geographic regions. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40:10–18.
11. Pieńkowska-Grela B. Znaczenie zmienności w obrębie cytogenetycznych aberracji pierwotnych w wybranych typach nowotworów człowieka. *Nowotwory J Oncol* 2009; 59: 338–352.
12. Pieńkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Grygalewicz B i wsp. J. Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without *MYC* gene rearrangement. *Med Oncol* 2011; 28: 1589–1595.
13. Pastwińska A, Rygier J, Woroniecka R i wsp. Frequency of deletion *CDKN2A* (9p211) gene in T-cell lymphomas. *Współcz Onkol* 2011; 15: 131–136.