

## Vyšetrenie klonality

### lymfocytov u psa a mačky

#### Úvod

Diagnostika lymfoproliferatívnych procesov je častým problémom v praxi malých zvierat.

Ide o potvrdenie alebo o vylúčenie malígneho lymfómu či leukémie, v prípade tumoru o rozlíšenie medzi B alebo T bunkovým typom lymfómu kvôli určeniu prognózy. Suspektná alebo definitívna diagnóza lymfómu či leukémie je postavená na mikroskopickom vyšetrení materiálu bohatého na lymfocyty. Môžu to byť histologické alebo cytologické vzorky z lymfatických uzlín alebo aj krvných náterov. Pre bližšiu diagnostiku sa z histologických preparátov môže vykonať aj imunohistologické vyšetrenie. Toto vyšetrenie však technicky nie je možné urobiť z cytologických preparátov, krvných náterov a malých histologických vzoriek. Imunohistológia tiež nemusí vždy ukázať jednoznačný výsledok, pretože neposkytuje informáciu o nádorovej klonalite populácie.

Vo všetkých prípadoch však môžeme použiť molekulárne biologické metódy - **PARR ( PCR for Antigen Receptor Rearrangements )**, ktoré potvrdia alebo vylúčia klonálnu proliferáciu v populácii lymfocytov.

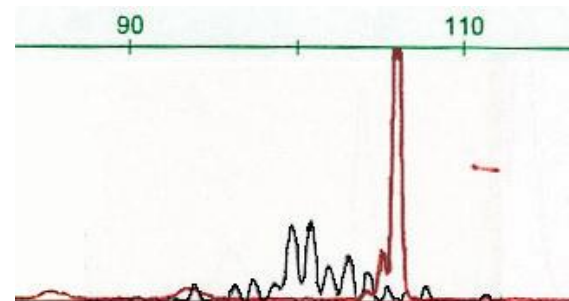
#### Materiál pre stanovenie klonality

Keďže k vyšetreniu je nutná len DNA, môžeme použiť rozmanitý vyšetrovací materiál. Podmienkou je iba prítomnosť podozrivej populácie lymfocytov. Preto by PARR klonalite malo vždy predchádzať vyššie menované mikroskopické vyšetrenie, aby sa potvrdila prítomnosť populácie lymfocytov. Niekedy je tiež potrebný aj dodatočný výber konkrétnej oblasti z histologického preparátu alebo náteru. Fixácia formalínom alebo sušenie vzduchom pri náteroch nepredstavujú žiadny problém, preto sa vyšetrenie môže dodatočne urobiť aj po dlhšom čase.

Pri PARR sa určuje variabilita v populácii lymfocytov na genetickej úrovni: gény pre protilátky ( IgH ) a T- bunecný receptor ( TCR ) sa skladajú z viacerých častí, z nich každá má viac segmentov, ktoré sú počas zrenia B- a T- buniek individuálne spojené dohromady. Tak má každý lymfocyt a jeho klon špecifické usporiadanie génových úsekov. Táto veľká variabilita na genetickej úrovni vedie k vysokej variabilite repertoárov receptorov imunitného systému.

U zdravého zvierata je dĺžka preskupených génov pre IgH a TCR rôznorodá, kým u pacienta s lymfómom je táto rôznorodosť z veľkej časti narušená a v lymfoidnej populácii prevláda monoklonálne usporiadanie génov.

Pomocou PARR je možné rozlíšiť polyklonálne usporiadanie populácie lymfocytov u zvierata s reaktívnym zápalom od monoklonálnej populácie u pacienta s lymfómom prípadne leukémiou.



Analýza dĺžky fragmentov chorého zvierata (červená krivka) v porovnaní so zdravým zvieratom (čierna krivka)

PARR teda môže predstavovať ďalší významný krok k určeniu definitívnej diagnózy.

Ako vždy je potrebné posudzovať výsledok vyšetrenia v súvislosti s ostatnými klinickými a cytologickými či histologickými nálezmi.

Niekedy sa s monoklonálnou expanziou v populácii lymfocytov stretávame aj pri niektorých atypických infekciách ( Anaplasma ssp., Ehrlichia ssp., Leishmania ssp. ) a vo vzácných prípadoch nie je možné ani pomocou tejto metódy definitívne diagnostikovať lymfóm.

Táto situácia môže nastať u včasného štádia lymfómu a pri odbere preparátu z lymfatickej uzliny so zdravou populáciou buniek. Preto je vždy nutné kritické posúdenie každého nálezu a ak je potrebné dorobiť s odstupom času dodatočné vyšetrenia.

Ďalšou zaujímavou možnosťou je pomocou PARR monitorovať klinickú remisiu pacienta a odhaliť tzv. minimálnu reziduálnu chorobu v prípade lymfómu. Tento senzitívny monitoring pomáha v nastavení individuálnej terapie pre každého onkologického pacienta a pomáha včas odhaliť recidívu ochorenia.

### Doterajšie výsledky

Toto vyšetrenie ponúkame od polovice roka 2012 a máme vyšetrených doteraz asi 280 psov a 80 mačiek s lymfadenopatiou.

U psov sme v 20 % prípadov preukázali polyklonálny model. Monoklonálny vzor je tvorený B-bunečným typom lymfómu ( 64 % ) a T-bunečným typom lymfómu ( 36% ).

U mačiek sa polyklonálny aj monoklonálny model vyskytujú v rovnakom pomere. Monoklonálny model je rozdelený rovnomerne na B – lymfóm ( 50 %) aj T - lymfóm ( 50 % ). Výsledky tiež potvrdili, že klasický multicentrický lymfóm je u mačiek omnoho vzácnejší ako u psa.

Vysoký počet polyklonálnych modelov naznačuje, že mnoho cytologicky či histologicky sporných prípadoch s podozrením na lymfóm nepotvrdilo nádorové tkanivo. Táto informácia poukazuje na dôležitosť vyšetrenia v nejasných histologických prípadoch a ako štandardná súčasť cytologického vyšetrenia u pacientov s podozrením na lymfóm.

Dôležitá informácia je, že pomocou PARR vieme nielen určiť klonalitu populácie, ale aj imunofenotyp buniek, čo má veľký význam pre určenie prognózy a možnosti terapie.

PARR môžeme využiť aj pri malých endoskopických biopsiách z GIT u pacientov s chronickými tráviacimi problémami, kde nie je vždy jasné, či ide len o IBD alebo o malobunečný alimentárny lymfóm. Endoskopická biopsia kombinovaná s PARR sa tak stávajú šetrnou alternatívou k invazívnym laparotomickým full-thickness biopsiám. S podobným úspechom sa dá použiť aj u biopsie nosovej sliznice u mačiek s podozrením na nazálny lymfóm.

