

Κεφάλαιο 19

Τρέχοντα δεδομένα και προοπτικές στην οστεομυελική βιοψία

Δ. Αναγνώστου - Κεραμίδα

Ε. Πούλιου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο τίτλος του βιβλίου που πρόσφατα εκδόθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), «Pathology and Genetics of Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues», θα μπορούσε να αποτελεί τη λέξη «κλειδί» του κειμένου αυτού¹. Είναι ένας τίτλος ο οποίος, αν και αναφέρεται συγκεκριμένα στον αιμοποιητικό και λεμφικό ιστό, εν τούτοις προσδιορίζει αμετάκλητα τον πολυδιάστατο και χωρίς σύνορα διαγνωστικό ρόλο του παθολογοανατόμου μέσα στον αέναα αναπτυσσόμενο και διαφοροποιούμενο χώρο της σύγχρονης τεχνολογίας.

Οι νεώτερες τεχνικές και μέθοδοι εκμεταλλεύονται τις βιολογικές ιδιότητες του φυσιολογικού κυττάρου μέσα από τις διάφορες φάσεις διαφοροποίησης και εξέλιξής του, καθώς και τα στάδια των γενετικών ανωμαλιών που χαρακτηρίζουν την κακοήγη μεταμόρφωσή του^{2,4}.

Οι παραπάνω ιδιότητες των κυττάρων μπορούν σήμερα να αναγνωρισθούν και να ταυτοποιηθούν στις διάφορες κατηγορίες νεοπλασματικών εξεργασιών, με τη βοήθεια τεχνικών και μεθόδων που ανιχνεύουν πρωτεΐνες (ανοσοϊστοχημεία), «αγγελιοφόρο» RNA (in situ υβριδισμός), αλλοιώσεις στο επίπεδο του DNA (Southern blot, PCR και - αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης, in situ υβριδισμός με ανοσοφθορισμό - FISH) και γε-

νετική αλληλουχιών (gene sequencing).

Η οστεομυελική βιοψία (ΟΒ) παρουσίασε στην πορεία της βραδύτερους ρυθμούς εξοικείωσής της με τη νεώτερη τεχνολογία, λόγω των δομικών ιδιαιτεροτήτων της σε σχέση με άλλα αιμοποιητικά-λεμφικά όργανα. Η μελέτη επιχρισμάτων μυελού από αναρρόφηση απέτελεσε μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '80 τον χρυσό κανόνα στη διαγνωστική, με αποτέλεσμα η ΟΒ να καταχωρηθεί ιστορικά κατά την περίοδο εκείνη ως το «παραμελημένο παιδί» των μορφολόγων. Από τότε και μέχρι σήμερα, οι διαφοροποιήσεις που ακολούθησαν στις βελόνες λήψης της ΟΒ⁵, άμεσα συνδεδεμένες με την ποσοτική και ποιοτική αναβάθμισή της, την έχουν καταστήσει πλέον το «χαϊδεμένο παιδί» πολλών ειδικοτήτων.

Η ΟΒ ακολούθησε, με αργά αλλά σταθερά βήματα, τα ανοίγματα που έγιναν στην νεώτερη τεχνολογία από άλλα λεμφικά και αιμοποιητικά όργανα. Σήμερα, η εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας, με σκοπό την ανίχνευση ενός αλματωδώς διευρυνόμενου φάσματος ιστικών αντιγόνων, είναι δυνατόν να αποτελεί απόκτημα κάθε παθολογοανατομικού εργαστηρίου^{6,7}.

Αντίθετα, η ενσωμάτωση των μοριακών τεχνικών στην προσέγγιση της σε διαγνωστικό επίπεδο έχει επηρεασθεί, σε άλλοτε άλλο βαθμό, από τις γηγενείς

δομικές-ανατομικές της ιδιότητες, με αποτέλεσμα η αξιοποίησή τους να αποτελεί κατά κανόνα προνόμιο εξειδικευμένων κέντρων.

Είναι γεγονός ότι η λήψη και μελέτη της ΟΒ έχει τύχει ευρύτερης εφαρμογής στο χώρο των αιματολογικών νοσημάτων. Στο χώρο της ογκολογίας δεν φαίνεται να έχει την θεσμική εκείνη έννοια που έχει στην αιματολογία. Στα αιματολογικά νοσήματα γενικότερα, η ΟΒ χαρακτηρίζεται από μια συστηματικότερα αυτοματοποιημένη διαγνωστική προσέγγιση σε σχέση με τις μη-αιματολογικές κακοήθειες.

Στο κείμενο αυτό, αρκετοί από τους ορισμούς που χρησιμοποιούνται κρίθηκε σκόπιμο να αποδοθούν με την καθιερωμένη διεθνή αναφορά τους.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται προφανής η ανάγκη αναφοράς στο σημειωμένο βαθμό έκπτυξης της ΟΒ, όπως αυτός αποκαλύπτεται μέσα από τις ενδείξεις εφαρμογής της και τη δυνατότητά της να λειτουργεί και ως αυτόνομο διαγνωστικό όργανο σε πολλές περιπτώσεις.

Οι οστεομυελικές βιοψίες δυνατόν να ληφθούν σε ασθενείς όλων των ηλικιών. Η εμπειρία, στο δικό μας τουλάχιστον Τμήμα, περιλαμβάνει ασθενείς από 6 μηνών μέχρι 98 ετών, με προοδευτικά αυξανόμενη συχνότητα μεταξύ των υπερηλικών.

Μια μακροσκελής σειρά ενδείξεων λήψης και μελέτης της ΟΒ^{8,9} έχει σήμερα καθιερωθεί στην διερεύνηση ασθενών με αιματολογικές και μη κακοήθειες, αλλά και σε ένα ευρύ φάσμα μη νεοπλασματικών εξεργασιών, που δυνατόν να δημιουργήσουν σε κλινικό, εργαστηριακό και ιστολογικό επίπεδο, πρόβλημα διαφορικής διαγνωστικής τους από νεο-

πλασματικές εξεργασίες^{10,11}. Οπωσδήποτε όμως, είναι ανάγκη να σημειωθεί ότι στο χώρο των αιματολογικών νοσημάτων, η αναρρόφηση μυελού των οστών και η ΟΒ αποτελούν αλληλοσυμπληρούμενες διαγνωστικές παραμέτρους, με άλλοτε άλλου βαθμού δυναμική¹². Για τον λόγο αυτό, ο εξειδικευμένος παθολογοανατόμος στο αντικείμενο της αιμοπαθολογοανατομίας θα πρέπει απαραίτητως να είναι εξοικειωμένος με τη μελέτη και ερμηνεία των επιχρισμάτων μυελού και περιφερικού αίματος.

Οι συχνότερες ενδείξεις εφαρμογής της οστεομυελικής βιοψίας είναι:

α) αιματολογικές κακοήθειες

Σταδιοποίηση ασθενών με διαγνωσμένο *Hodgkin* και μη-*Hodgkin* λέμφωμα και . Στις περιπτώσεις αυτές, η λήψη ΟΒ είναι ενσωματωμένη στον αρχικό σχεδιασμό διαγνωστικής προσέγγισης και αντιμετώπισης του ασθενούς. Σε ασθενείς με εξωλεμφαδενικά λεμφώματα από την οριακή ζώνη και (EMZL), η λήψη ΟΒ κατά τον αρχικό προγραμματισμό του ασθενούς δεν φαίνεται να αποτελεί παγιωμένη τακτική. Το τελευταίο αυτό θα μπορούσε να συσχετισθεί με αρχικές δημοσιεύσεις, που περιέγραφαν ως σπάνια τη διασπορά των εξωλεμφαδενικών λεμφωμάτων από την οριακή ζώνη στο μυελό¹³. Σε πρόσφατες όμως αναφορές, το ποσοστό διήθησης του μυελού ανέρχεται σε 35%.^{14,15} Αντίθετα, το ποσοστό διήθησης του μυελού στα σπληνικά λεμφώματα από την οριακή ζώνη (SMZL) κατά τη φάση διάγνωσης, ανέρχεται σε 67% έως 100%¹⁶. Ανάλογη εμπειρία για τα λεμφαδενικά λεμφώματα από την οριακή ζώνη (NMZL) είναι εξαιρετικά περιορισμένη.

Η λήψη ΟΒ κατά τη φάση σταδιοποίη-

σης της νόσου Hodgkin, Hodgkin λέμφωμα, σύμφωνα με την WHO ταξινόμηση, αποτελεί ως γνωστόν παγιωμένη διαδικασία στην καθ' ημέρα πράξη, ενώ η διαγνωστική σημασία της αναρρόφησης μυελού υπολείπεται σαφώς εκείνης της ΟΒ και ως εκ τούτου, δεν συνιστάται.

Επιπρόσθετα, σε αντίθεση με την ομόφωνη θέση για την αποφασιστική σημασία της ΟΒ στη θεραπεία και πρόγνωση της νόσου Hodgkin στα κλινικά στάδια ΙΙΒ και ΙΙΙΒ, οι απόψεις για τα στάδια ΙΑ και ΙΙΑ δίστανται. Το τελευταίο αυτό αποδίδεται στο χαμηλό ποσοστό διήθησης του μυελού από τη νόσο στα εν λόγω στάδια, ποσοστό που εκτιμάται <1% στις περισσότερες σειρές¹⁷.

Ανεπιτυχής, ξηρά, παρακέντηση. Η ίνωση του μυελού, στα πλαίσια αντιδραστικού-συνοδού φαινομένου, αποτελεί τον συχνότερο αιτιοπαθογενετικό παράγοντα "ξηράς" (dry tap) παρακέντησης σε ένα ευρύ φάσμα νεοπλασματικών (καρκινώματα, λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα, μαστοκυττάρωση κ.α.) και μη εξεργασιών (αυτοάνοσα νοσήματα, ακτινοβολία, φάρμακα κ.α.)¹⁸. Ανάλογα αποτελέσματα δυνατόν να οφείλονται στη συνεκτικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων, όπως π.χ. δυνατόν να παρατηρηθεί σε οξείες λευχαιμίες.

Διαπίστωση "σύμφωνων" (concordant) ή "ασύμφωνων" (discordant) λεμφωμάτων. Οι ως άνω όροι αναφέρονται στη σύγχρονη διήθηση μυελού και λεμφαδένα ή άλλου οργάνου, από λέμφωμα με τον ίδιο (σύμφωνο και σύμφωνο λέμφωμα) ή διαφορετικό ιστολογικό τύπο (ασύμφωνο λέμφωμα) μεταξύ των δύο ανατομικών περιοχών¹⁹. Διήθηση π.χ.

του μυελού από λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα, δυνατόν να συνυπάρχει με υψηλότερου βαθμού κακοηθείας λέμφωμα, από μεγάλα λεμφοκύτταρα, στον λεμφαδένα. Αντίστροφη κατάσταση απαντά σπανιότερα, ενώ συνηθέστερα συναντάται η περίπτωση ταυτόσημου ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, μεταξύ μυελού και λεμφαδένα.

Το «σύμφωνο» ή το «ασύμφωνο» ενός λεμφώματος επισημαίνει ότι, στις περιπτώσεις εκείνες όπου η ΟΒ αποτελεί την αρχική ανατομική θέση διάγνωσης λεμφώματος καλής πρόγνωσης, η μελέτη βιοπτικού υλικού από την πρωτοπαθή εστία ανάπτυξης της νόσου αποτελεί απαραίτητη συνιστώσα, για τον αποκλεισμό λεμφώματος υψηλότερου βαθμού κακοηθείας, αλλά και για τον πλέον ενδεδειγμένο θεραπευτικό σχεδιασμό του ασθενούς²⁰. Διήθηση π.χ. του μυελού στα πλαίσια χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας από μικρά λεμφοκύτταρα, δυνατόν να συνοδεύεται από εκτροπή της νόσου στο λεμφαδένα, σε σύνδρομο Richter.

Εκτίμηση του διατηρούμενου λειτουργικού αιμοποιητικού μυελού, κατά τη φάση σταδιοποίησης, μετά θεραπεία, κατά την υποτροπή ή πριν τη μεταμόσχευση μυελού, σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες, Hodgkin λέμφωμα και λευχαιμίες.

Διερεύνηση κυτταροπενιών και εμπτύρων, αγνώστου αιτιολογίας. Σε ορισμένες από τις εν λόγω καταστάσεις, η ΟΒ δυνατόν να αποτελεί την πρώτη ανατομική θέση κλινικής έκφρασης του λεμφώματος και, σπανιότερα, καρκινώματος. Σημειώνεται ότι σε ορισμένους ασθενείς, με σπληνικό λέμφωμα και αρχική εκδήλωση της νόσου στο μυελό, ο σπλήνας, κατά τη φάση της διάγνωσης, δυνα-

τόν να είναι ελαφρά διογκωμένος και σπανιότερα να μην ψηλαφάται²¹.

Επανεκτίμηση της νόσου μετά θεραπεία ή κλινικής υποτροπής της νόσου.

Ανίχνευση «ελαχίστης υπολειμματικής νόσου»²²⁻²⁴.

Ταυτοποίηση σύγχρονης συνύπαρξης λεμφούπερπλαστικών εξεργασιών με άλλες αιματολογικές ή μη κακοήθειες. Διήθηση μυελού από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, δυνατόν να συνυπάρχει με καρκίνωμα, όπως επίσης διήθηση του μυελού από λεμφούπερπλαστικές εξεργασίες ή μυελώματα δυνατόν να συνυπάρχει με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές^{25,26}.

Διερεύνηση στα πλαίσια ανάπτυξης στο μυελό δεύτερης κακοήθειας μετά θεραπεία²⁷.

β) μη αιματολογικές κακοήθειες

Η μελέτη της ΟΒ σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους δεν αποτελεί σύνηθες φαινόμενο, συγκριτικά προς τις περιπτώσεις των αιματολογικών κακοηθειών.

Αναιμία, αδυναμία, κόπωση και κλινική υποψία μεταστατικής νόσου παραπέμπουν στη λήψη ΟΒ⁵. Η παρουσία μικροαγγειοπαθητικής αιμολυτικής αναιμίας, ερυθροβλάστωσης από το περιφερικό αίμα και ανεξήγητες μονο- ή πανκυτταροπενίες, αποτελούν επίσης σοβαρές ενδείξεις για διερεύνηση του μυελού, στα πλαίσια πιθανής μετάστασης. Στην ως άνω κατηγορία ασθενών προτείνεται, παράλληλα με τη διερεύνηση μεταστατικής νόσου στο μυελό, και η αναζήτηση συνύπαρξης δευτεροπαθούς θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (TTP)^{8,9}.

Στην κλινική σημασία της ανίχνευσης

μεταστατικής νόσου στο μυελό εστιάζεται το ενδιαφέρον των κλινικών και ειδικότερα, των ογκολόγων, κατ' επέκταση δε των παθολογοανατόμων και ειδικών με το αντικείμενο ερευνητών.

«Μικρομετάσταση»

Η μη-ταυτοποιούμενη σε ιστολογικό επίπεδο μετάσταση είχε αρχικά αποδοθεί, με τον όρο «αδιάκριτη» (obscure)²⁸. Εν συνεχεία, το 1971, δόθηκε στη βιβλιογραφία από τους Huo και συν. ο όρος «μικρομετάσταση», σε μια προσπάθεια διάκρισης μικρών, λανθανουσών, από μεγάλου μεγέθους διηθήσεις²⁹. Οι εν λόγω ερευνητές «όρισαν», με αυθαίρετα κριτήρια, τα 2 mm ως σημείο αναφοράς. Μεταστάσεις, μικρότερες των 2 mm, ως «μικρομεταστάσεις», ενώ μεγαλύτερες των 2 mm ως «μακρομεταστάσεις». Παρά το γεγονός ότι έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορες άλλες ονομασίες, ο ορισμός των Hugo και συν. έχει υιοθετηθεί από την Αμερικανική Ομάδα Σταδιοποίησης του Καρκίνου (AJCC) και θεωρείται ο πλέον χρησιμοποιούμενος και κλινικά αποδεκτός ορισμός³⁰.

Το «φορτίο» λανθανόντων κακοηθών κυττάρων, τα οποία παραμένουν μετά την θεραπεία ή και σε περιπτώσεις κλινικής ύφεσης του ασθενούς, στα πλαίσια «ελαχίστης υπολειμματικής νόσου», αποτελεί επίσης ένδειξη διερεύνησης του μυελού.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΣΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΜΥΕΛΙΚΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Η διαγνωστική αξιολόγηση της ΟΒ, σε ασθενείς με αιματολογικές ή μη κακοήθειες, προϋποθέτει επίγνωση και εφαρμογή ορισμένων παραμέτρων, οι οποίες εξασφαλίζουν άριστες συνθήκες μελέτης αυτής, τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο³¹.

Πώς ερμηνεύεται μια αρνητική ιστολο-

γική απάντηση

Η αρνητική ιστολογική απάντηση στις παραπάνω ομάδες ασθενών αποτελεί κοινό στόχο θεράποντα ιατρού και ασθενούς. Στις περιπτώσεις όμως μιας αρνητικής ιστολογικής απάντησης, δύο είναι οι παράμετροι που θα πρέπει να αναζητηθούν από τον κλινικό: η ποσοτική και η ποιοτική επάρκεια του δείγματος της οστεομυελικής βιοψίας.

Ένα ποσοτικά αποδεκτό δείγμα ΟΒ είναι δυνατόν, κατά την μικροσκόπησή του, να αντιστοιχεί σε άλλοτε άλλης έκτασης οστικό φλοιό, μαλακά μόρια ή να καταλαμβάνεται μερικώς ή και πλήρως από ίνωση, με αποτέλεσμα ο διαγνωστικά αξιολογήσιμος μυελός να είναι περιορισμένος ή ιδιαίτερα περιορισμένος. Επιπρόσθετα, υποφλοιώδεις θέσεις λήψης της ΟΒ, όπου κατά τεκμήριο είναι υποκυτταρικές, δυνατόν να οδηγήσουν σε παραπλανητικές διαγνώσεις. Η επανάληψη της ΟΒ είναι η πρόταση που θα πρέπει να απευθύνεται προς τον θεράποντα ιατρό.

Σε άλλες περιπτώσεις ασθενών, ένα ποσοτικά και ποιοτικά επαρκές δείγμα ΟΒ δυνατόν να δοθεί από τον παθολογοανατόμο ως ελεύθερο νόσου, παρά το γεγονός ότι παρακείμενη περιοχή του δείγματος δυνατόν να είναι νεοπλασματικά διηθημένη. Το τελευταίο αυτό συχνά συνδέεται με τον πολυεστιακό χαρακτήρα διήθησης του μυελού από λεμφώματα και μυελώματα και παραπέμπει ως εκ τούτου, σε επανάληψη της βιοψίας. Επιπρόσθετα, η «αποκάλυψη» μιας λεμφοκυτταρικής διήθησης, συχνά απαιτεί λήψη πολλαπλών τομών και από διάφορα επίπεδα, διαδικασία η οποία, σε ασθενείς με κλινική υποψία νόσου, πρέπει να αποτελεί πάγια στρατηγική.

Πότε ένα δείγμα ΟΒ θεωρείται επαρκές

Η οπίσθια λαγόνιος άκανθα, εκτός εξαιρέσεων, αποτελεί τη θέση επιλογής λήψης ΟΒ. Η διαχρονική εξέλιξη και διαφοροποίηση στις βελόνες λήψης ΟΒ έχει επηρεάσει αποφασιστικά τη δυναμική της. Το μήκος του δείγματος, εκτός ειδικών περιπτώσεων, είναι άμεσα συνδεδεμένο με την εμπειρία και επιδεξιότητα του κλινικού που εκτελεί την βιοψία. Σε ορισμένες χώρες και ειδικότερα στις ΗΠΑ, η λήψη της ΟΒ αποτελεί μέρος της εξειδίκευσης των αιμοπαθολογοανατόμων. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες βελόνες, ιδίως από τους αιματολόγους, είναι μιας χρήσεως και επιτρέπουν τη λήψη δειγμάτων διαμέτρου 0,2 εκ. και μήκους 1 εκ. έως 6 εκ. Μιας χρήσεως βελόνες διαμέτρου 0,4 εκ. είναι επίσης διαθέσιμες. Οστεομυελική βιοψία μήκους 2 ή 3 εκ. καλύπτει τις βασικές προϋποθέσεις για μια ασφαλή και πολυδιάστατη μελέτη.

Στις περιπτώσεις εκείνες, όπου το δείγμα δεν κρίνεται επαρκές, ο διαγνωστής θα πρέπει να εκφράζει την άποψή του, είτε με τη σύσταση για επανάληψη της βιοψίας, είτε με την αναφορά του στο διαγνωστικό αξιολογήσιμο τμήμα του δείγματος. Στην τελευταία αυτή περίπτωση, δίδεται ο αριθμός των προσφερόμενων για διαγνωστική εκτίμηση μυελοχώρων.

Μono- ή αμφοτερόπλευρη οστεομυελική βιοψία

Ο παραπάνω προβληματισμός αφορά εποχές όπου οι βελόνες λήψης ΟΒ δεν εξασφάλιζαν επαρκή διαγνωστικά δείγματα. Σήμερα, η λήψη ενός μεγάλου δείγματος ή δύο μικρότερων από την ίδια ανατομική περιοχή θεωρείται εξίσου ή και περισσότερο αποτελεσματική από την αμφοτερόπλευρη λήψη. Συ-

γκριτικές μελέτες, που έχουν γίνει με ταξύ μονο- και αμφοτερόπλευρης λήψης δεν αναφέρονται στο μήκος του δείγματος και ως εκ τούτου, δεν θεωρούνται αντιπροσωπευτικές.

Η ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΙΤΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ο σχεδιασμός της μελέτης της ΟΒ, κατά τη φάση της διάγνωσης, αλλά και σε όλες εκείνες τις καταστάσεις, που η λήψη της αποτελεί ένδειξη, στοχεύει στην ταυτοποίηση ή ανίχνευση πιθανής νεοπλασματικής διήθησης του μυελού. Πιο συγκεκριμένα, η ταυτοποίηση αναφέρεται στην παρουσία “διακριτής” νόσου σε επίπεδο ιστολογικών τομών. Περαιτέρω ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός, καθώς και επιβεβαίωση της κλωνικότητας επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημείας ή και μοριακών τεχνικών. Αντίθετα, όταν η νόσος δεν είναι “διακριτή” ιστολογικά και ανοσοφαινοτυπικά, τότε στην ανίχνυσή της, καθοριστικό ρόλο παίζει συχνά η εφαρμογή μοριακών τεχνικών. Εν τούτοις, συχνά η περιορισμένη, αλλά και εκτεταμένη σε ορισμένες περιπτώσεις νεοπλασματική λεμφοκυτταρική διήθηση, αποκαλύπτεται κατά την ανοσοϊστοχημική και μόνον μελέτη³². Η διήθηση π.χ. του μυελού στα σπληνικά λεμφώματα απαντά κατά κανόνα με τη μορφή δοκίδων από ένα ή δύο στίχους, που συχνά διαλάθουν της προσοχής σε επίπεδο ιστολογικών τομών αιματοξυλίνης-ηωσίνης και αποκαλύπτονται μόνον κατά την ανοσοϊστοχημική μελέτη.

Ανάλογη, επίσης παραπλανητική, εικόνα δίδει και η διήθηση του μυελού από αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα λεμφοκύτταρα (ALCL), όταν τα λεμφωματώδη κύτταρα παρουσιάζουν διάσπαρτη κατανομή, με αποτέλεσμα να

διαφεύγουν της προσοχής κατά τη μικροσκόπησή τους σε ιστολογικό επίπεδο³³. Το τελευταίο αυτό οφείλεται επιπρόσθετα και στην αδυναμία διάκρισής τους από αναμειγνύόμενα κυτταρικά στοιχεία των αιμοποιητικών σειρών. Στις περιπτώσεις αυτές, ο νεοπλασματικός πληθυσμός αναδεικνύεται μετά από ανοσοϊστοχημική μελέτη με το δείκτη ενεργοποίησης CD30.

Οι παραπάνω περιπτώσεις τονίζουν την ανάγκη εγρήγορης και επαγρύπνησης του παθολογοανατόμου, ενώ επισημαίνουν παράλληλα την σημασία των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων κατά την διαγνωστική αξιολόγηση μιας βιοψίας.

Όπως και στην αρχή του κειμένου αυτού αναφέρεται, η ενσωμάτωση των μοριακών τεχνικών στην προσέγγιση της ΟΒ σε διαγνωστικό επίπεδο, έχει επηρεασθεί, σε άλλοτε άλλο βαθμό, από τις γηγενείς δομικές – ανατομικές της ιδιότητες. Η διαδικασία, π.χ. μονιμοποίησης και αφαλάτωσης της, το περιορισμένο του διαθέσιμου δείγματος σε σχέση με άλλα όργανα και ιστούς, καθώς και η αδυναμία αξιοποίησής της σε νωπή κατάσταση στην καθ’ ημέρα πράξη, παρεμβαίνουν πολλές φορές ανασταλτικά στην υλοποίηση μοριακών τεχνικών, ιδιαίτερα στους μη-εξειδικευμένους εργαστηριακούς χώρους.

Αναφέρονται εν συντομία οι αρχές οι οποίες διέπουν τις συνηθέστερα εφαρμοζόμενες τεχνικές, στην διαγνωστική προσέγγιση των αιμοποιητικών, καθώς και των μη αιματολογικών κακοηθειών.

Ανοσοϊστοχημεία

Ως γνωστόν, η ανοσοϊστοχημική μελέτη στοχεύει στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών του κυτ-

τάρου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων³⁴.

Με την αλματώδη ανάπτυξη της τεχνολογίας παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας, δίνονται πολλαπλές δυνατότητες εφαρμογής τους, στην διαγνωστική και ερευνητική προσέγγιση των νεοπλασματικών εξεργασιών σε νωπό υλικό, αλλά ειδικότερα σε μονιμοποιημένο και σε αρχαιοθετημένο βιοπτικό υλικό.

Η εφαρμογή τελευταία μονοκλωνικών αντισωμάτων, που έχουν παραχθεί σε κουνέλια (rabbit monoclonal) και χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία, αποτελεί ένα επιπλέον εξελικτικό στάδιο στον τομέα της ανοσοϊστοχημείας, με υποσχόμενες προοπτικές³⁵.

In Situ Υβριδισμός με Ανοσοφθορισμό (FISH)

Η τεχνική FISH αποσκοπεί στην ανίχνευση ενός χρωμοσώματος, με τη βοήθεια ειδικού ανιχνευτή, σημασμένου με φθορίζουσα χρωστική^{36,37}.

Οι κύριες εφαρμογές της, σε διαγνωστικό επίπεδο, αναφέρονται στον προσδιορισμό αριθμητικών και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, καθώς και στην ανίχνευση ελλείψεων. Επιπρόσθετα, προσφέρει πληροφορίες στο επίπεδο του ενός -μονήρους κυττάρου. Σε αντίθεση με τις συμβατικές κυτταρογενετικές τεχνικές, που απαιτούν νωπό δείγμα και κύτταρα σε μίτωση, η τεχνική FISH είναι απλούστερη, απευθύνεται σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση ή μεσόφαση και εφαρμόζεται ευρέως σε εντυπώματα, κυτταρικά εναιωρήματα και νωπά δείγματα.

Η εφαρμογή της όμως σε επίπεδο οστεομυελικής βιοψίας, παρουσιάζει πε-

ριορισμούς έτσι ώστε, προς το παρόν να χρησιμοποιείται από εξειδικευμένα και μόνο κέντρα. Αντίθετα, η εφαρμογή της μεθόδου σε επιχρίσματα μυελού είναι αποτελεσματική σε ένα ευρύ φάσμα εξεργασιών.

Αλυσωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Πρόκειται για ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει και ένα μόνο αντίγραφο μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε ένα δείγμα, χωρίς να απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό³⁸.

Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν το χρησιμοποιηθέν πρωτόκολλο, για την περαιτέρω ερμηνεία ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων³⁹.

Η PCR ανάλυση έχει ευρεία εφαρμογή σε διάφορους τομείς, στο επίπεδο δε των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών και των μικρομεταστάσεων, αποσκοπεί κατά κανόνα στην ανίχνευση κλωνικών αναδιατάξεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών αντίστοιχα. Στη βασική έρευνα, η προσφορά της έγκειται στην απομόνωση και κλωνοποίηση σπάνιων γονιδίων, απομόνωση γονιδίων από ελάχιστες ποσότητες DNA, ανάλυση ποικιλομορφίας σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και στην *in vitro* μεταλλαξογένεση.

Από την αρχή της εφαρμογή της έως σήμερα, έχει γίνει σημαντική πρόοδος ως προς την τελειοποίηση της, με αποτέλεσμα το προοδευτικά αυξανόμενο εύρος των εφαρμογών της.

Εκτός της κλασσικής PCR, η πολλαπλή PCR (multiplex PCR) και η PCR με την αντίστροφη μεταγράψηση (RT-PCR), αντιπροσωπεύουν εξελικτικά στάδια της^{40,41}.

Σε αντίθεση με την κλασσική PCR, η

οποία μελετά το DNA, η RT-PCR απομονώνει από τα κύτταρα ολικό mRNA και φαίνεται να κατακτά όλο και περισσότερο χώρο στην έρευνα των μικρομεταστάσεων.

Μικροδιατομές με laser (laser microdissection)

Τα τελευταία χρόνια, η δυνατότητα μελέτης των βιοπτικών υλικών με την χρήση των μικροδιατομών, έδωσε νέα ώθηση στις ήδη εξειδικευμένες και συχνά δύσκολα εφαρμόσιμες από όλα τα εργαστήρια, μοριακές τεχνικές. Πιο συγκεκριμένα, η εν λόγω τεχνική αποτελεί προκαταρκτική συνιστώσα των μοριακών τεχνικών και δίδει τη δυνατότητα λήψης από μία ιστολογική τομή παραφίνης ενός συγκεκριμένου, ύποπτου, κυττάρου ή μιας επίσης ιδιαίτερα περιορισμένης, αμφίβολης διαγνωστικά, αλλοίωσης^{42,43}.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΙΚΡΟΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΜΥΕΛΟ

Ο κλινικά αποδεκτός ορισμός της μικρομετάστασης στον μυελό, δεν φαίνεται να έχει τύχει ανάλογης ανταπόκρισης μεταξύ των ογκολόγων, αναφορικά με την κλινική της σημασία.

Οι κατά καιρούς εκφραζόμενες επιφυλάξεις, ως προς τις προγνωστικές προεκτάσεις της μικρομετάστασης, έχουν αποδοθεί σε μια σειρά παραγόντων εκ των οποίων οι συχνότερα συζητούμενοι είναι:

α) Έλλειψη μεγάλων σειρών ασθενών, με προδιαγραφές που να προσφέρονται για στατιστική αξιολόγηση και συμπεράσματα. Το τελευταίο αυτό, σε αντίθεση με τις αιματολογικές κακοήθειες, ενισχύεται και από την κατηγοριοποίηση και υποκατηγοριοποίηση των μελετών, ανάλογα με την πρωτοπαθή ανατομική

θέση εμφάνισης της νόσου.

β) Ύπαρξη μεμονωμένων κλινικών μελετών, ειδικά σχεδιασμένων για την προγνωστική σημασία της μικρομετάστασης στον μυελό.

γ) Έντονη αμφισβήτηση της κλινικής σημασίας της διήθησης του μυελού από μεμονωμένα καρκινωματώδη κύτταρα, κυκλοφορούντα (CTC) ή εγκαθιστάμενα στον μυελό μετά διασπορά (DTC), τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα με συμβατικές τεχνικές⁴⁴.

δ) Αδυναμίες τεχνολογικής υποδομής και μεθοδολογίας διαγνωστικών κέντρων, στην προσέγγιση και αξιολόγηση των μικρομεταστάσεων.

Η αναγνώριση, στον μυελό π.χ., μεμονωμένων καρκινωματώδων κυττάρων, που δίδουν θετική ανοσοαντίδραση στον επιθηλιακό δείκτη κυτταροκερατίνη (anticytokeratin antibody), δεν είναι πάντα αποδεικτική μικρομετάστασης⁴⁵. Ως γνωστόν, τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι μια νεοπλασματική εξεργασία συνίσταται από ένα κλώνο κυττάρων, προερχόμενο από ένα προγονικό κύτταρο, μετά από ένα πρωταρχικό γεγονός, π.χ. σωματική μετάλλαξη. Οπωσδήποτε όμως για να χαρακτηριστεί ένα κύτταρο ως κακόηθες, απαιτούνται επιπρόσθετες γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις⁴⁶.

Επιπρόσθετα των όσων αναφέρονται σχετικά με τους μηχανισμούς ογκογένεσης και μικρομετάστασης στον μυελό, θα πρέπει να σημειωθούν ιδιαίτερα οι ξέχωρες ιδιότητες του μυελού, αναφορικά με το περιβάλλον του. Το τελευταίο αυτό προσφέρεται για αποικισμό, προσκόλληση, αδρανοποίηση, προσαρμογή και ανάπτυξη των κυτταρικών στοιχείων των μικρομεταστάσεων. Τα μεσεγχυματικά κυτταρικά στοιχεία του

στρώματος του μυελού θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποτελέσουν κύτταροστόχο, για την διερεύνηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι πραγματοποιούνται κατά την αλληλεπίδραση επιθηλιακών κυττάρων και κυττάρων στρώματος του μυελού⁴⁷.

Ανεξάρτητα από τις συγκλίνουσες και αποκλίνουσες απόψεις, αναφορικά με την γονοτυπική και ανοσοφαινοτυπική ιδιότητα των “μεταστατικών” στο μυελό κυττάρων, η παρουσία τους θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως: α) αποδεικτικό στοιχείο αρχόμενης λανθάνουσας διασποράς της νόσου β) παράγοντας επικείμενης μετάστασης και, ως εκ τούτου, κακής προγνωστικής σημασίας γ) δείκτης ευαισθησίας στη θεραπεία.

Κλινικές μελέτες, οι οποίες ενισχύουν αλλά και υποστηρίζουν την προγνωστική σημασία στον μυελό της μικρομετάστασης, εμφανίζονται με προοδευτικά αυξανόμενο ρυθμό και αφορούν κυρίως τον μαστό^{48,49}.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατο δημοσίευμα, σχετικά με την σημασία της μικρομετάστασης στον μυελό ασθενών με καρκίνο του μαστού⁵⁰. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποτελούν προϊόν συνεργασίας δεκαέξι κέντρων και στηρίζονται στην δεκαετή παρακολούθηση 4.703 ασθενών με καρκίνο μαστού σταδίων I, II, και III. Μικρομεταστάσεις του μυελού ανευρέθησαν σε ποσοστό 30,6% των ασθενών. Συγκριτική μελέτη των ασθενών, με και χωρίς μικρομεταστάσεις στον μυελό έδειξε ότι, σε ασθενείς με μικρομεταστάσεις, ο πρωτοπαθής όγκος ήταν μεγαλύτερος, υψηλότερου ιστολογικού βαθμού κακοήθειας, ενώ ήταν συχνότερες τόσο η προσβολή των λεμφαδένων όσο και η ανεύρεση όγκων με αρνητι-

κούς ορμονικούς υποδοχείς.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΡΓΑΣΙΕΣ

Η ανίχνευση κλωνικότητας στις λεμφουπερπλαστικές εξεργασίες προσεγγίζεται είτε ανοσοφαινοτυπικά με την ταυτοποίηση «περιορισμού» των ελαφρών και βαρέων αλύσεων των ανοσοσφαιρινών είτε με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών. Από τις τελευταίες η PCR, σε τομές παραφίνης και αρχειοθετημένο κατ' επέκταση βιοπτικό υλικό, έχει τύχει ευρείας εφαρμογής στην καθ' ημέρα πράξη ενός παθολογοανατομικού εργαστηρίου.^{51,52}

Η ανίχνευση κλωνικότητας στοχεύει στην: α) επιβεβαίωση της νεοπλασματικής φύσης μιας λεμφουπερπλαστικής εξεργασίας, β) ενίσχυση της διάγνωσης του λεμφώματος σε μια ύποπτη ιστολογικά λεμφοκυτταρική διήθηση, και γ) διαφορική διάγνωση μεταξύ αντιδραστικής και νεοπλασματικής λεμφοκυτταρικής παρουσίας στο μυελό. Η τελευταία κατηγορία είναι εκείνη, η οποία πολύ συχνά θέτει διλήμματα στη τελική αξιολόγησή της.

Ως γνωστόν, λεμφοκυτταρικές διηθήσεις στο μυελό, με τη μορφή συνήθως αθροίσεων, αλλά και με διάμεση κατανομή, σπάνια δε παρά τις οστικές δοκίμες, δυνατόν να παρατηρούνται κατά τη σταδιοποίηση η επανεκτίμηση ασθενών με διαγνωσμένο λέμφωμα η κλινική υποψία λεμφώματος. Ανάλογες διηθήσεις δυνατόν να παρατηρούνται σε υπερήλικες η και ενήλικες καθώς και σε ασθενείς με νοσήματα αυτοανόσου υποστρώματος στα πλαίσια πιθανού συνοδού-αντιδραστικού φαινομένου.⁵³ Δυνατόν ακόμη, αντίστοιχου τύπου λεμφοκυτταρικές διηθήσεις να συνυπάρχουν με άλ-

λες αιματολογικές κακοήθειες, είτε σαν αντιδραστικό φαινόμενο είτε στα πλαίσια σύνθετου λεμφώματος ή και συνύπαρξης με άλλη αιματολογική κακοήθεια. Μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, μυελώματα, δυνατόν επίσης να χαρακτηρίζονται από άλλοτε άλλης έκτασης λεμφοκυτταρική παρουσία.

Επιπρόσθετα, επανεκτίμηση του μυελού σε ασθενείς με διαγνωσμένο Β-λέμφωμα και μετά θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD20 (rituximab) δυνατόν να συνοδεύονται με την παρουσία στο μυελό λεμφοκυτταρικών αθροίσεων Τ-κυτταρικής προέλευσης. Οι τελευταίες, εφ' όσον δεν προϋπάρχει ευαισθητοποίηση αναφορικά με την ερήμωση του μυελού από Β-λεμφοκύτταρα μέχρι και 12 μήνες μετά θεραπεία με rituximab, ερμηνεύονται εσφαλμένα είτε στα πλαίσια της νόσου με μορφολογικά και μόνο κριτήρια είτε ως Τ-λέμφωμα κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη⁵⁴.

Ως γνωστόν έχουν δοθεί κατά καιρούς στη βιβλιογραφία μορφολογικά κριτήρια και οδηγία σημεία τα οποία ενισχύουν ή υποστηρίζουν τον αντιδραστικό ή νεοπλασματικό χαρακτήρα της διήθησης. Στοιχεία τα οποία συνδέονται με την νεοπλασματική φύση της διήθησης είναι: παραδοκιδώδης εντόπιση, μέγεθος άθροισης >1 mm, ασάφεια ορίων, κυτταρική ατυπία, Β-προέλευσης λεμφοκύτταρα σε μεγαλύτερο ή και απόλυτο ποσοστό. Είναι γεγονός ότι σε ένα αριθμό περιπτώσεων τα παραπάνω δεδομένα δυνατόν να ενισχύσουν ή και να θέσουν τη διάγνωση του λεμφώματος. Εν τούτοις, κάθε μια από τις παραπάνω ενδείξεις έχει τις εξαιρέσεις της, οι οποίες τείνουν να γίνουν κανόνας. Προς την

κατεύθυνση αυτή οδηγεί προοδευτικά η πληροφόρηση που προκύπτει από τον πολυδιάστατο τρόπο προσέγγισης και μελέτης της οστεομυελικής βιοψίας. Τα λεμφώματα π.χ. από την οριακή ζώνη χαρακτηρίζονται πολύ συχνά από συνύπαρξη αυξημένου ποσοστού αντιδραστικών – συνοδών Τ-λεμφοκυττάρων, τα οποία όμως, σε αρκετές περιπτώσεις, δυνατόν να επισκιάζουν τον νεοπλασματικό Β-κυτταρικό πληθυσμό.

Η διαφορική διάγνωση μεταξύ αντιδραστικής και νεοπλασματικής λεμφοκυτταρικής διήθησης του μυελού αποτελεί συχνό, αν όχι καθημερινό πρόβλημα, δύσκολο κατά κανόνα στην επίλυσή του. Στις περιπτώσεις αυτές, στην διαγνωστική προσέγγιση θα πρέπει αρχικά να ληφθούν υπ' όψιν οι ποσοτικές και ποιοτικές προϋποθέσεις που εκπληρεί το υπό μελέτη δείγμα, καθώς και το ιστορικό του ασθενούς. Επιπρόσθετα, κρίνεται αναγκαία η συνεχής ενημέρωση και εγρήγορση του παθολογοανατόμου σχετικά με τις «παγίδες» που κρύβουν οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις³¹. Ανοσοφαινοτυπικές εκτροπές, που δυνατόν να παρατηρηθούν σε διάφορους ιστολογικούς υπότυπους λεμφωμάτων, παρερμηνεία μη ειδικής ανοσοφαινοτυπικής έκφρασης, καθώς και αξιολόγηση ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων από την PCR ανάλυση, αποτελούν μερικές από τις «παγίδες», που οδηγούν σε παραπλανητική διάγνωση.

Η ανίχνευση κλωνικών αναδιατάξεων των βαρειών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών και του Τ-κυτταρικού υποδοχέα με την PCR ανάλυση σε “οριακές” διαγνωστικά λεμφοκυτταρικές διηθήσεις στο μυελό, θα πρέπει να συναξιολογούνται με τα ιστολογικά και ανοσοφαινοτυπικά δεδομένα, την κλινικοεργαστηριακή ει-

κόνα του ασθενούς και τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής. Στις περιπτώσεις εκείνες, όπου υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των ως άνω παραμέτρων, προτείνονται στον θεράποντα ιατρό παρακολούθηση και επανεκτίμηση.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στα τρέχοντα δεδομένα και τις προοπτικές της οστεομυελικής βιοψίας αναφέρεται ο τίτλος αυτού του κειμένου. Ο ρυθμός των εξελίξεων στην τεχνολογία και μεθοδολογία είναι τέτοιος, ώστε τα τρέχοντα δεδομένα να προλαμβάνονται από τις προοπτικές.

Στο επίπεδο της ΟΒ, όπως και στα άλλα όργανα και ιστούς, η διαγνωστική προσέγγιση και μελέτη μπορεί και θα πρέπει να είναι πολυδιάστατη, με βάση τη σύγχρονη τεχνολογία και κεντρικό πάντα άξονα, την ευαισθητοποίηση του διαγνωστή για όσα δεν εμπίπτουν στον κανόνα και την στενή συνεργασία του με τον θεράποντα ιατρό και τις εργαστηριακές εξειδικεύσεις τις συναφείς προς το γνωστικό αντικείμενο της αιμοπαθολογοανατομίας.

Η τεχνολογία των κυτταρικών μικροσυστοιχιών (tissue microarray/«gene chip») αποτελεί την τελευταία, υψηλής εξειδίκευσης, τεχνική που στοχεύει στην εις βάθος μελέτη των μηχανισμών ογκογένεσης, δεδομένου ότι τα γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μιας νεοπλασίας εξαρτώνται από τις αθροιστικές αλλοιώσεις του γενετικού υλικού και των πρωτεϊνικής φύσεως προϊόντων του⁵⁵.

Στην ΟΒ αναφέρονται μεμονωμένες ανακοινώσεις, αναφορικά με την ταυτόχρονη αξιολόγηση ανοσοφαινοτυπικής έκφρασης σε μεγάλους αριθμούς δειγμάτων ή εκτίμηση ενός ευρέος φάσματος αντισωμάτων σε έναν συγκε-

κριμένο π.χ. ιστολογικό υπότυπο λεμφώματος. Σε επίπεδο όμως γενωμικού DNA και mRNA, σε αντίθεση με άλλα όργανα και ιστούς, η ΟΒ δεν παρουσιάζει αξιολογήσιμη ενεργό συμμετοχή προς το παρόν. Εξειδικευμένα όμως κέντρα, με γνωστικό αντικείμενο την ΟΒ, έχουν τη δυνατότητα αξιοποίησης της ως άνω τεχνικής σε υλικό εντυπωμάτων και αναρρόφησης μυελού και περιφερικού αίματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, IARC Press, 2001
2. Evans LS, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2003; 362: 139-146
3. Muller-Hermelink HK, Zettl A, Pfeifer W, et al. Pathology of lymphoma progression. *Histopathology* 2001; 38: 285 – 306
4. Harris NL, Stein H, Sarah E, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology* 2001(1) : 194-220
5. Frisch B, Bartl R. Biopsy of bone and bone marrow. In: Frisch B, Bartl R, (eds): Biopsy interpretation of bone and bone marrow. *Histopathology and immunohistology in paraffin and plastic*. London, Oxford University Press, 1999, pp 1-11
6. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381: 751-758
7. Kurtin Pj, Hobday KS, Ziesmer S, et al. Demonstration of distinct antigenic profiles of small B-cell lymphomas by paraffin section immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 319-329
8. Ozkalemkas F, Ozkocaman V, Ozcelik T, et al. The bone marrow aspirate and biopsy in the diagnosis of unsuspected nonhematologic malignancy. *BMC Cancer* 2005; 5: 144: in press
9. Chang JC, Naqui T. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with bone marrow metastasis and

- marrow metastasis and secondary myelofibrosis in cancer. *Oncologist* 2003; 8: 375-380
10. Krober SM, Horny HP, Greschniok A, et al. Reactive and neoplastic lymphocytes in human bone marrow: immunohistological and molecular biological investigations on biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1999; 52: 521-526
 11. Jeremy ST, Thomas J. The diagnosis of lymphoid infiltrates in the bone marrow trephine. *Curr Diagn Pathol* 2004; 10: 236-245
 12. Foucar K. Bone marrow examination: indications and techniques. In: Foucar K. (ed). *Bone Marrow Pathology*. 2nd ed. Chicago, ASCP Press, 2001, pp 31-49
 13. Zinzani PL, Magagnoli M, Galièni P, et al. Nongastrointestinal low grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: analysis of 75 patients. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1254-1258
 14. Thieblemont C, Berger F, Dumontet C, et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas is a disseminated disease in one third of 158 patients analysed. *Blood* 2000; 95: 802-806
 15. Kent SA, Variakojis D, Peterson LA. Comparative Study of marginal zone lymphoma involving bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 698-708
 16. Hammer RD, Glick AD, Greer JP, et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinct B-cell neoplasm. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 613-626
 17. Howell SJ, Grey M, Chang J, et al. The value of bone marrow examination in the staging of Hodgkin's lymphoma: a review of 955 cases seen in a regional cancer centre. *Brit J Haematol* 2002; 119: 408-411
 18. Humpries JE. Dry tap bone marrow aspiration: clinical significance. *Am J Hematol* 1990; 35: 247-250
 19. Hodges GF, Lenhardt TM, Cotelingam JD. Bone marrow involvement in large-cell lymphoma: prognostic implications of discordant disease. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 305-311
 20. Kremer M, Spitzer M, Mandl-Webes S, et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Lab Inv* 2003; 83: 107-114
 21. Franco V, Florena AM, Campesi G. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996; 29: 571-575
 22. Diel IJ, Cote Rj. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000; 26:53-65
 23. Fend F, Bock O, Kremer M, et al. Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies. *Virchow Arch* 2005; 447: 909-919
 24. Wolfrum F, Vogel I, Fandrich F, et al. Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 430-441
 25. Cauwelier B, Nollet F, de Laere E, et al. Simultaneous occurrence of myelodysplastic syndrome and monoclonal B lymphocytes with different clonal origin. *Leukemia and Lymphoma* 2001;43: 191-193
 26. Pajor L, Lacza A, Kereskai L, et al. Increased incidence of monoclonal B-cell infiltrate in chronic myeloproliferative disorders. *Mod Pathol* 2004; 17: 1521-1530
 27. Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz F, et al. Moderate increase of secondary hematologic malignancies after myeloblastic radiochemotherapy and autologous stem-cell transplantation in patients with indolent lymphoma: results of prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group *J Clin Oncol* 2004; 15: 4926-4933
 28. Quan ML, Cody III HS. Missed micrometastatic disease in breast cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 311-317
 29. Huvos AG, Hutter RV, Berg JW. Significance of axillary micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg* 1971; 173: 44-

30. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al. AJCC cancer staging manual In: Fleming ID, Cooper JS, et al.(eds). Breast. Philadelphia, PA Lippincott Raven,1997,pp171-180
31. D.Anagnostou. Pitfalls in the pattern of bone marrow infiltration in lymphoproliferative disorders *Curr Diagn Pathol* 2005;11: 170-179
32. Chetty R, Echerarreta G, Comley M, et al. Immunohistochemistry in apparently normal bone marrow trephine specimens from patients with nodal follicular lymphoma. *J Clin Pathol* 1995; 48: 1035-1038
33. Fraga M, Brousset P, Schlaifer D, et al. Bone marrow involvement in anaplastic large cell lymphoma: immunohistochemical detection of minimam disease and its prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1995;103:82-9
34. Gudgin EJ, Erber WN. Immunophenotyping of lymphoproliferative disorders: state of the art. *Pathology* 2005; 37: 457-478
35. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, et al. Rabbit monoclonal antibodies: A comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathhol* 2005; 124: 295-312
36. Miranda RN, Mark HFL, Medeiros LJ. Fluorescent in situ Hybridization in routinely processed bone marrow aspirate clot and core biopsy sections. *Am J Pathol* 1994; 145: 1309-1315
37. Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, et al. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002; 198:163-170
38. Crotty PL, Smith BR, Tallini G. Morphologic, immunophenotypic, and molecular evaluation of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7: 90-95
39. Van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, et al. 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; 14: 2257-2317
40. Sandberg Y, van Gastel-Mol EJ, Verhaaf B, et al. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor Polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J Mol Diagn* 2005, 7: 495-503
41. Guller U, Zajac P, Schider A, et al. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg* 2002; 236: 768-775
42. G-Zhou X, Sandvej K, Gregersen N et al. Detection of clonal B cells in microdissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1999; 52: 104-110
43. Kremer M, Cabras AD, Fend F, et al. PCR analysis of IgH gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Human Pathol* 2000; 31: 847-853
44. Braun S, Naume B. Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1623-6
45. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448-56
46. Song JA, Anton-Culver H, Singer DS. Meeting report:NCI think tank in Cancer biology. *Cancer Res* 2005;65(20):9117-9120
47. Hombauer H, Minguell JJ. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Brit J Cancer* 2000; 82: 1290-1296
48. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma

- are malignant. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2073-84
49. Yu JJ, Brennan M, Christos P, et al. bone marrow micrometastases and adjuvant treatment in breast cancer. *Breast J* 2004; 10: 181-185
 50. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 793-802
 51. Brinckman R, Kaufman O, Reinartz B, et al. Specificity of PCR-based clonality analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements for the detection of bone marrow involvement by low-grade B-cell lymphomas. *J Pathol* 2000; 190: 55-60
 52. Braunschweig R, Bauer AS, Delacretaz F, et al. Contribution of IgH-PCR to the evaluation of B-cell lymphoma involvement in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 634-642
 53. Thiele J, Zibes TK, Kvasnicka HM, et al. Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma – practical guideline. *J Clin Pathol* 1999; 52: 294-300
 54. Douglas VK, Gordon LI, Goolsby CL, et al. Lymphoid aggregates in bone marrow mimic residual lymphoma after rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 844-853
 55. Natkunam Y, van de Rijn M. The use of gene expression arrays and high density tissue microarrays in the study of hematolymphoid malignancies. *Histopathology* 2002 (suppl 2); 41: 520-525