

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

MARCIN ZAREMBA

**Ekspresja białek oporności wielolekowej (p-
gp, MRP, LRP, BCRP)
w chłoniakach nieziarniczych u dzieci**

Praca doktorska

Promotor: dr hab.n.med Anna Pituch-Noworolska

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii Klinicznej
i Transplantologii Collegium Medicum UJ

Kierownik jednostki: Prof.dr hab.n.med. Marek Zembala

KRAKÓW 2009

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi
niniejszej pracy doktorskiej
Pani dr hab. n.med. Annie Pituch-Noworolskiej za ciekawy
wybór tematu, naukowe kierownictwo, wszechstronną
pomoc przy wykonywaniu niniejszej pracy, za życzliwość
i cenne uwagi.
Dziękuję wszystkim, którzy wspierali mnie dobrym słowem.
Dziękuję mojej Rodzinie za nieustanne wsparcie,
wrozumiałość i życzliwość.*

1. WSTĘP

1.1. Chłoniaki z dojrzałych limfocytów B (mature B-cell NHL)	9
1.1.1. Chłoniak Burkitta i typu Burkitta (Burkitt/Burkitt like lymphoma)	9
1.1.2. Chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL)	10
1.2. Chłoniaki prekursorowe (lymphoblastic lymphoma)	11
1.2.1. Chłoniaki prekursorowe z linii limfocyta T.....	11
1.2.2. Chłoniaki prekursorowe z linii limfocyta B.....	12
1.3. Chłoniaki anaplastyczne (anaplastic large cell lymphoma, ALCL)	12
1.4. Diagnostyka, czynniki prognostyczne, rokowanie i leczenie	13
1.5. Mechanizmy lekooporności komórek nowotworowych	15
1.5.1. Mechanizmy prowadzące do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia leku (zaburzenia transportu leku).....	17
1.5.1.1. Mechanizmy związane ze zmniejszeniem napływu leku do komórki	17
1.5.1.2. Mechanizmy związane ze zwiększeniem usuwania leku z wnętrza komórki	17
1.5.2. Mechanizmy lekooporności związane ze zmniejszoną aktywacją lub nasiloną inaktywacją wewnątrzkomórkową leku	18
1.5.3. Mechanizmy związane z modyfikacją białek "docelowych" dla leku1.5.4	19
1.5.4. Mechanizmy związane z modyfikacją procesów naprawczych DNA	20
1.5.5. Mechanizmy związane z hamowaniem lub obniżaniem zdolności komórek do apoptozy	21
1.6. Białka związane z lekoopornością	21
1.6.1. Glikoproteina p (p-gp, p170)	22
1.6.2. Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1)	23
1.6.3. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2, MXR)	24
1.6.4. Lung Resistance Protein (LRP, p110)	25
1.7. Metody badania białek oporności wielolekowej (MDR)	25
1.8. Ekspresja białek oporności wielolekowej w prawidłowych komórkach układu hematopoetycznego	26
1.9. Oporność wielolekowa w nowotworach pochodzenia hematologicznego	27

2. ZAŁOŻENIA I CELE BADAWCZE

2.1. Założenia	29
2.2. Cele badawcze	29

3. MATERIAŁ I METODYKA

3. 1. Pacjenci	30
3.2. Materiał diagnostyczny i metody laboratoryjne	30
3.2.1. Ocena immunofenotypu	30
3.2.1.1. Przygotowanie materiału do badania	32
3.2.1.2. Analiza cytometryczna	33
3.2.2. Barwienia immunohistochemiczne	34
3.3. Ocena kliniczna	34
3.3.1. Ocena stanu klinicznego pacjenta przed rozpoczęciem leczenia	35
3.3.3. Ocena odległych skutków leczenia	35
3.4. Białka oporności wielolekowej	36
3.4.1. Barwienie immunohistochemiczne	36
3.4.1.1. Immunologiczne podstawy technik immunohistologicznych	36
3.4.1.2. Metody reakcji immunohistochemicznych	37
3.4.2. Ocena ekspresji białek oporności wielolekowej	37
3.4.2.1. Przeciwciała monoklonalne/odczynniki	37
3.4.2.2. Przygotowanie i barwienie preparatów	38
3.4.3. Kontrola i standaryzacja procedury barwienia	39
3.4.3.1. P-gp	39
3.4.3.2. MRP1	39
3.4.3.3. LRP	39
3.4.3.4. BCRP	40
3.4.4. Zasady oceny ilościowej i jakościowej	40
4. WYNIKI	
4.1. Ogólna charakterystyka grupy badanej	42
4.2. Charakterystyka immunofenotypowa	43
4.2.1. Chłoniaki nieziarnicze z linii limfocyta T	44
4.2.2. Chłoniaki nieziarnicze z linii limfocyta B	44
4.3. Charakterystyka histologiczno-kliniczna	45
4.3.1. Chłoniaki nieziarnicze prekursorowe	45
4.3.2. Chłoniaki nieziarnicze z dojrzałych (obwodowych) limfocytów B	46
4.3.3. Chłoniaki nieziarnicze o typie anaplastycznym	46
4.4. Przebieg kliniczny i wyniki leczenia	47
4.4.1. Chłoniaki nieziarnicze o typie prekursorowym	47
4.4.2. Chłoniak nieziarnicze o typie dojrzałych limfocytów B	47
4.4.3. Chłoniaki nieziarnicze o typie anaplastycznym (ALCL)	48
4.5. Ekspresja białek lekooporności	48

4.5.1. Ekspresja białek lekooporności w grupach zależnych od immunofenotypu komórek chłoniaka	49
4.5.1.1. Ekspresja p-gp	49
4.5.1.2. Ekspresja MRP1	50
4.5.1.3. Ekspresja LRP	51
4.5.1.4. Ekspresja BCRP	51
4.5.2. Ekspresja białek lekooporności z typach NHL według klasyfikacji histologiczno-klinicznej	52
4.5.2.1. Ekspresja p-gp	52
4.5.2.2. Ekspresja MRP1	53
4.5.2.3. Ekspresja LRP	53
4.5.2.4. Ekspresja BCRP	53
4.6. Współwystępowanie białek lekooporności	54
4.7. Zależność pomiędzy przebiegiem klinicznym a obecnością białek lekooporności	56
4.7.1 Ekspresja p-gp a przebieg kliniczny	56
4.7.2. Ekspresja MRP1 a przebieg kliniczny	57
4.7.3. Ekspresja LRP a przebieg kliniczny	57
4.7.4. Ekspresja BCRP a przebieg kliniczny	58
4.7.5. Współwystępowanie białek lekooporności a przebieg kliniczny	58
5. DYSKUSJA	
5.1. Podsumowanie wyników własnych	60
5.2. Znaczenie ekspresji p-gp w chłoniakach nieziarniczych	61
5.3. Ekspresja MRP1 w chłoniakach nieziarniczych i jej znaczenie	62
5.4. Ekspresja LRP i jej znaczenie kliniczne	63
5.5. Ekspresja BCRP i jej znaczenie kliniczne	64
5.6. Współwystępowanie białek lekooporności i znaczenie kliniczne	65
6. WNIOSKI	67
7. STRESZCZENIE	68
8. ABSTRACT	70
9. WYKAZ PODSTAWOWYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	71
10. SPIS TABEL	72
11. SPIS RYCIN	74
12. SPIS FOTOGRAFII	76
13. LITERATURA:	79

1. WSTĘP

Chłoniaki (lymphoma) stanowią heterogenną grupę nowotworów złośliwych wywodzących się z układu chłonnego. Nowotwory te mogą rozwijać się zarówno w narządach bogatych w utkanie limfatyczne (jak węzły chłonne, grasicą, śledzioną, tkanka limfatyczna błon śluzowych) jak i w narządach ubogich w tkankę limfatyczną (skóra, centralny system nerwowy). Spośród nowotworów wieku dziecięcego chłoniaki zajmują trzecie miejsce pod względem częstości występowania (po rozrostach białaczkowych i pierwotnych nowotworach centralnego systemu nerwowego). Chłoniaki dzielą się na ziarnicze (ziarnica złośliwa, Hodgkin's lymphoma, HD) oraz nieziarnicze (non-Hodgkin's lymphoma, NHL). Te ostatnie stanowią większość (około 60%) wszystkich chłoniaków występujących w wieku dziecięcym, co stanowi około 7-10% spośród wszystkich nowotworów rozpoznawanych u osób poniżej 20-go roku życia [1, 2].

Najczęściej chłoniaki nieziarnicze występują u nastolatków (2 dekada życia), sporadycznie obserwuje się je u dzieci poniżej 3 lat. Wyższą zachorowalność stwierdza się u osób rasy kaukaskiej oraz płci męskiej (chłopcy : dziewczynki = 3:1). Do czynników predysponujących należą również zespoły niedoboru odporności (zarówno wrodzone jak i nabyte), zakażenia wirusowe (szczególnie EBV), zaburzenia chromosomalne (zespół łamliwości chromosomalnej, z Downa, z. Nijmegen) oraz niektóre czynniki środowiskowe jak promieniowanie jonizujące czy niektóre środki chemiczne [1, 3].

Współczesna klasyfikacja chłoniaków nieziarniczych oparta jest o immunofenotyp komórek rozrostowych, który pozwala na określenie linii pochodzenia (linia limfocyta B, linia limfocyta T, komórki o charakterystyce NK-natural killers) oraz stopień zróżnicowania/dojrzałości komórek (postacie prekursorowe lub dojrzałe). Na podstawie tej klasyfikacji wyróżniamy cztery podstawowe grupy chłoniaków nieziarniczych: nowotwory z prekursorowych limfocytów B, nowotwory z prekursorowych limfocytów T/NK, nowotwory z dojrzałych (obwodowych) limfocytów B oraz nowotwory z dojrzałych (obwodowych) limfocytów T i komórek NK [4]. Zarys klasyfikacji WHO chłoniaków

nieziarniczych (bez uwzględniania podtypów i wariantów morfologicznych) przedstawia tabela 1 [5].

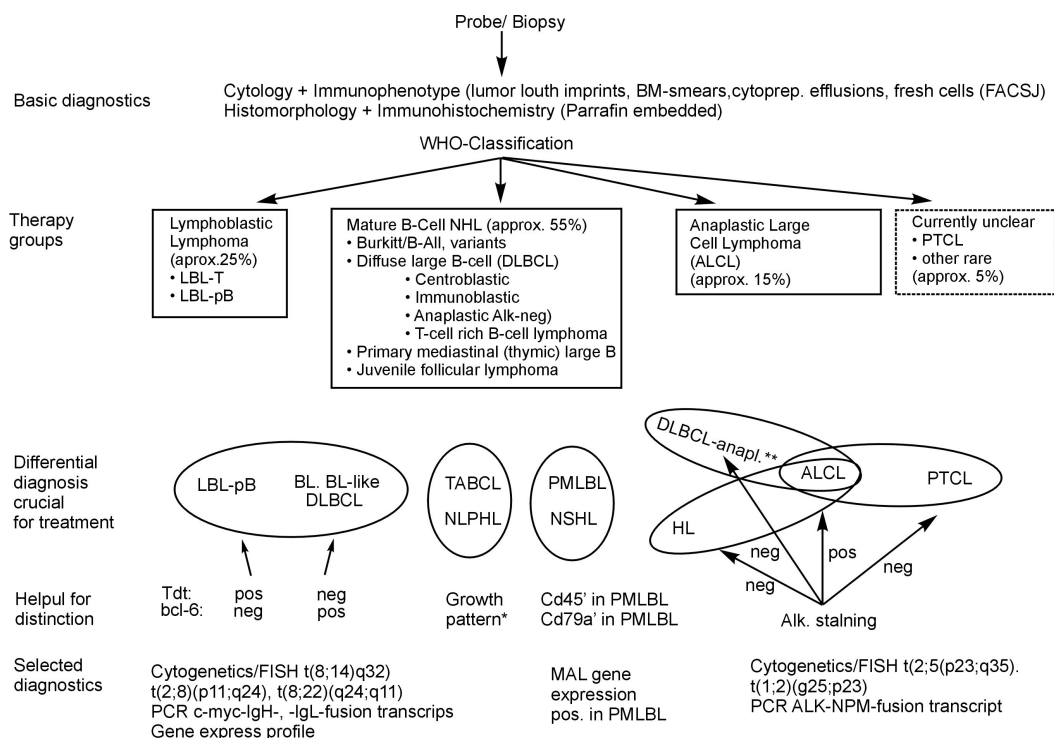
Typowy obraz kliniczny	Nowotwory z komórek B	Nowotwory z komórek T
	Nowotwory limfocytów prekursorowych B Białaczka/chłoniak z prekursorowych limfoblastów B	Nowotwory limfocytów prekursorowych T - Chłoniak/białaczka z prekursorowych limfoblastów T - Chłoniak blastyczny z komórek NK
	Nowotwory dojrzałych (obwodowych) limfocytów B - przewlekła białaczka limfocytarna - z komórek B/chłoniak z małych limfocytów B - białaczka prolimfocytarna z komórek B - chłoniak limfoplazmocytny - chłoniak z komórek B strefy brzeżnej śledziony - białaczka włochatokomórkowa - szpiczak plazmatycznokomórkowy	Nowotwory dojrzałych (obwodowych) limfocytów T - białaczka prolimfocytarna z komórek T - białaczka limfocytarna z ziarnistych komórek T - agresywna białaczka z komórek NK - T-komórkowy chłoniak/białaczka dorosłych (HTLV1+)
Chłoniaki z wczesnym uogólnionym rozsiewem i/lub obrazem białaczkowym		
Chłoniaki pierwotnie pozawęzłowe	- odosobnione (jednoogniskowe) plasmocytoma kostne - plasmocytoma pozakostna - pozawęzłowy chłoniak typu MALT z komórek B strefy brzeżnej - śródpiersiowy (grasiczy) chłoniak z dużych limfocytów B - chłoniak pierwotnie wysiękowy	- pozawęzłowy chłoniak z komórek NK/T, typ nosowy - chłoniak T-komórkowy typu enteropatycznego - wątrobowo-śledzionowy chłoniak z komórek T gamma/delta - chłoniak T-komórkowy tkanki podskórnej naśladujący <i>panniculitis</i> - ziarniniak grzybiasty/zespół Sezary'ego - pierwotnie skórny chłoniak anaplastyczny z dużych komórek
Chłoniaki pierwotnie zajmujące węzły chłonne	- węzłowy chłoniak z komórek B strefy brzeżnej - chłoniak grudkowy - chłoniak strefy płaszczka - rozlany chłoniak z dużych limfocytów B - chłoniak Burkitta/białaczka z komórek Burkitta	- chłoniak z obwodowych komórek T, nieokreślony w inny sposób - angioimmunoblastyczny chłoniak T-komórkowy - chłoniak anaplastyczny z dużych komórek

Tabela 1. Klasyfikacja WHO nowotworów limfocytarnych – chłoniaki nieziarnicze [5]

Chłoniaki wieku dziecięcego różnią się od większości postaci występujących w wieku dorosłym. Podczas gdy u osób dorosłych występują głównie postaci o niskiej lub pośredniej złośliwości, chłoniaki dziecięce w większości charakteryzują się wysokim stopniem złośliwości (mierzonym wysokim wskaźnikiem proliferacyjnym) i gwałtownym przebiegiem klinicznym. Ponieważ u dzieci spotykanych jest jedynie kilka typów spośród chłoniaków uwzględnionych w klasyfikacji WHO/REAL, ze względu na przebieg kliniczny oraz sposób leczenia przyjęto podział chłoniaków wieku dziecięcego na trzy podstawowe grupy:

- 1) chłoniaki z dojrzałych limfocytów B (mature B-cell NHL) – ok. 55% przypadków obejmujących chłoniaki Burkitta/typu Burkitta oraz chłoniaki rozlane z dużych limfocytów B (DLBCL)
- 2) chłoniaki prekursorowe – ok. 25 % przypadków obejmujących zarówno chłoniaki B- jak i T-komórkowe
- 3) anaplastyczne chłoniaki olbrzymiokomórkowe (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) ok. 15 % przypadków

Pozostałe 5% stanowią inne, bardzo rzadko występujące u dzieci typy chłoniaków jak np. chłoniaki typu MALT wywodzące się z tkanki limfoidalnej błony śluzowej czy pierwotne chłoniaki skórne (mycosis fungoides i zespół Sezary'ego) [6, 7]. Podstawowy podział chłoniaków nieziarniczych wieku dziecięcego wraz ze schematami diagnostycznymi przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Podział chłoniaków nieziarniczych u dzieci wraz ze schematami diagnostycznymi [7]

1.1. Chłoniaki z dojrzałych limfocytów B (mature B-cell NHL)

U dzieci do grupy tej zalicza się dwie podstawowe jednostki: chłoniaka Burkitta/typu Burkitta oraz chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B (DLBCL).

1.1.1. Chłoniak Burkitta i typu Burkitta (Burkitt/Burkitt like lymphoma)

Chłoniak Burkitta/typu Burkitta jest to najczęstszy chłoniak wieku dziecięcego stanowiący około 40-50% wszystkich przypadków. Jest to nowotwór o najwyższym wskaźniku proliferacyjnym spośród wszystkich nowotworów u człowieka (99% komórek znajduje się w fazie cyklu komórkowego). Klasyczny chłoniak Burkitta zbudowany jest ze średniej wielkości komórek o niskim poliformizmie, owalnymi lub okrągłymi jądrami z wyraźnymi jąderkami oraz widoczną znaczną ilością figur podziału komórki. Immunofenotyp komórek chłoniaka jest porównywalny do fenotypu dojrzałego limfocyta B krwi obwodowej. Na powierzchni komórki wykazuje się ekspresję powierzchniową antygenów charakterystycznych dla linii limfocyta B (CD19, CD20, CD22, CD10) oraz łańcuchów ciężkich immunoglobulin z restrykcją w produkcji łańcuchów lekkich immunoglobulin (kappa lub lambda). Ponadto obserwuje się zaburzenia ekspresji

polegające na obecności determinanty prekursorowej (CD10), która nie występuje na prawidłowych, dojrzałych limfocytach B. W cytoplazmie komórki tego typu chłoniaka stwierdza się obecność determinant restrykcyjnych (liniowych - CD79a i CD22), bez obecności TdT (terminalna transferaza deoksynukleotydylowa) charakterystycznej dla etapów prekursorowych. W badaniach cytogenetycznych charakterystyczna jest translokacja onkogenu c-myc z chromosomu 8 w pobliże genów kodujących fragmenty immunoglobulin [t(8,14), rzadziej t(8,2) lub t(8,22)] [7-10].

Klinicznie wyróżnia się trzy postacie:

- postać endemiczną, występującą w Afryce Równikowej oraz regionie Papui/Nowej Gwinei
- postać związana z immunosupresją
- postać sporadyczną (najczęstsza, rozpoznawana u dzieci na całym świecie)

Najczęstszą lokalizacją w tej postaci NHL jest jama brzuszna (80%) głównie w okolicy krętniczo-kątniczej, rzadsze pierwotne lokalizacje to okolice głowy i szyi, obwodowe węzły chłonne, śródpiersie, jądra, centralny system nerwowy. Objawy kliniczne zależą głównie od lokalizacji guza (ból brzucha, zaburzenia łaknienia w przypadkach guzów jamy brzusznej, zaburzenia połykania i oddychania w przypadkach guzów okolicy głowy i szyi). W badaniach laboratoryjnych obserwuje się podwyższone poziomy kwasu moczowego i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [2, 7-10].

Odmianą chłoniaka Burkitta jest tzw. chłoniak „typu Burkitta” (Burkitt-like lymphoma, atypical Burkitt lymphoma). Jest to chłoniak morfologicznie zbliżony do klasycznego chłoniaka Burkitta i cechujący się równie wysokim wskaźnikiem proliferacyjnym, jednak z zaznaczonym większym polimorfizmem komórek nowotworowych i translokacją c-myc rozpoznawaną jedynie w części przypadków. Z klinicznego punktu widzenia traktowany jest on podobnie jak klasyczna postać chłoniaka Burkitta [6].

1.1.2. Chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL)

Ten najczęstszy typ chłoniaka nieziarniczego u dorosłych, stanowi 10-20% przypadków chłoniaków nieziarniczych wieku dziecięcego (rozpoznawany u dzieci głównie w drugiej dekadzie życia). Morfologicznie zbudowany jest ze średnich lub dużych limfoidalnych komórek z jądrem o jasnej chromatynie i kilkoma wyraźnymi jąderkami.

Kształt i barwność cytoplazmy podobnie jak stosunek jądro-cytoplazmatyczny są zmienne, frakcja proliferacyjna (40-90%) jest niższa w porównaniu do chłoniaka Burkitta [2, 6]. Ze względu na morfologię komórek wyróżnia się 4 podtypy DLBCL: postać centroblastyczną, immunoblastyczną, anaplastyczną oraz tzw. chłoniaka z komórek B bogatego w limfocyty T/histiocyty (T-cell/histiocyte rich B-cell lymphoma) [4]. W ocenie immunofenotypu komórek DLBCL stwierdza się ekspresję antygenów charakterystycznych dla dojrzałego limfocyta B, zarówno na powierzchni (CD19, CD20, CD22) jak i w cytoplazmie (CD79a, bez obecności TdT) komórek. W większości przypadków wykazuje się również obecność powierzchniowych immunoglobulin wraz z restrykcją w produkcji łańcuchów lekkich. Część przypadków wykazuje również powierzchniową ekspresję antygenów CD10 i CD5. W badaniach cytogenetycznych nie stwierdza się translokacji specyficznych dla tej grupy [2, 7]. Obraz kliniczny zbliżony jest do chłoniaka Burkitta, jednak chłoniak ten częściej występuje w postaci zlokalizowanej i rzadziej stwierdza się zajęcie szpiku kostnego i/lub centralnego systemu nerwowego [3, 8].

Odrębny podtyp, przez niektórych uważany za odrębną jednostkę, stanowiący około 20% przypadków DLBCL to tzw. chłoniak śródpiersiowy (grasiczy) z dużych limfocytów B (primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma). Cechuje się on obecnością komórek morfologicznie zbliżonych do komórek Reed-Sternberga lub Hodgkina w ziarnicy złośliwej, występowaniem głównie u starszych dzieci oraz gorszą odpowiedzią na leczenie w stosunku do innych przypadków dziecięcych DLBCL [6, 11].

1.2. Chłoniaki prekursorowe (lymphoblastic lymphoma)

Wg klasyfikacji WHO chłoniaki niezianicze i białaczki limfoblastyczne stanowią jedną grupę rozrostów, w których kryterium różnicowania stanowi odsetek komórek nowotworowych (limfoblastów) w szpiku kostnym. W powszechnie stosowanej w pediatrii klasyfikacji wg Szpitala św. Judy odsetek limfoblastów w szpiku konieczny do rozpoznania białaczki wynosi 25%. Chłoniaki prekursorowe stanowią około 30% wszystkich przypadków chłoniaków wieku dziecięcego [6, 10].

1.2.1. Chłoniaki prekursorowe z linii limfocyta T

Chłoniaki prekursorowe o immunofenotypie limfocyta T stanowią około 75% przypadków chłoniaków prekursorowych. Morfologicznie komórki chłoniaka (limfoblasty)

są nieco większe od prawidłowego limfocyta krwi obwodowej, cechują się zwykle małym zróżnicowaniem oraz wysokim stosunkiem jądro-cytoplazmatycznym. W ocenie immunofenotypu komórek tych chłoniaków stwierdza się cytoplazmatyczną ekspresję TdT oraz CD3 (determinanta restrykcyjna dla linii limfocyta T). Na powierzchni komórek obserwuje się ekspresję determinant typowych dla linii limfocyta T (jak CD1a, CD2, CD3, CD4/CD8, CD7) charakteryzujących się znaczną zmiennością. Często spotykane są determinanty typowe dla linii limfocyta B (CD10) lub mieloidalnej (CD13, CD33). W badaniach cytogenetycznych najbardziej charakterystyczna jest translokacja 14q11.2, inne zmiany chromosomalne nie zostały jak dotąd dobrze scharakteryzowane [2, 3, 6, 7].

Klinicznie chłoniak prekursorowy z linii limfocyta T najczęściej występuje jako szybko rosnąca, guzowata masa zlokalizowana w śródpiersiu przednim (ok. 50-70% przypadków). Inne typowe lokalizacje to obwodowe węzły chłonne, skóra, śledziona, wątroba czy pierścień Waldeyera. Objawy kliniczne zależą od lokalizacji masy guza (najczęściej duszność, kaszel, zespół żyły głównej górnej w przypadku śródpiersiowej lokalizacji głównej masy guza) [3, 8]. Jak dotąd nie wykazano jednoznacznego związku pomiędzy wariantami fenotypowymi (stopniem dojrzałości) tego typu chłoniaka a cechami klinicznymi i rokowaniem [6].

1.2.2. Chłoniaki prekursorowe z linii limfocyta B

Chłoniaki prekursorowe o immunofenotypie limfocyta B stanowią mniej niż 25% przypadków chłoniaków prekursorowych. Morfologicznie komórki zbliżone są do limfoblastów T-komórkowych, są nieco większe od prawidłowego limfocyta krwi obwodowej, z dużym okrągłym lub owalnym jądrem wykazującym różny stopień „pofałdowania” błony komórkowej, rozproszoną chromatyną i mało wyraźnym jądrem. W ocenie immunofenotypu komórek chłoniaka stwierdza się w prawie wszystkich przypadkach cytoplazmatyczną ekspresję TdT i CD79a (marker liniowy limfocyta B) oraz powierzchniową CD19 i HLA-DR. Ekspresja pozostałych determinant charakterystycznych dla linii limfocyta B (CD22, CD10, CD20) jest zmienna i zależy od stopnia dojrzałości komórki prekursorowej. W przeciwieństwie do dojrzałych postaci chłoniaka B-komórkowego chłoniaki prekursorowe nie wykazują ekspresji powierzchniowej łańcuchów immunoglobulin. Spośród zmian genetycznych do najczęstszych i jak dotąd najlepiej scharakteryzowanych w tej grupie należą translokacje t(v; 11q23) i t(1;19) związane z gorszym rokowaniem [2, 3, 6, 7].

Do typowych lokalizacji tego typu chłoniaka należą obwodowe węzły chłonne, tkanki miękkie, skóra i kości. W przeciwieństwie do chłoniaków prekursorowych T-komórkowych, zajęcie śródpiersia jest rzadkie. Objawy kliniczne zależą od lokalizacji masy guza [3, 8].

1.3 Chłoniaki anaplastyczne (anaplastic large cell lymphoma, ALCL)

Chłoniaki anaplastyczne stanowią około 10% dziecięcych NHL [11]. Rozpoznawane są najczęściej u nastolatków (pomiędzy 10 a 15 rokiem życia). Morfologicznie komórki ALCL są bardzo zróżnicowane, od drobnych komórek zbliżonych wielkością do małych limfocytów o polimorficznych obrysach jąder aż do komórek olbrzymich, anaplastycznych przypominających niskozróżnicowane formy raka. Zróżnicowanie morfologiczne komórek chłoniaków anaplastycznych doprowadziło do wyróżnienia szeregu wariantów m.in. limfohistiocytarny, drobnokomórkowy, olbrzymiokomórkowy, ziarniczopodobny, mięsakopodobny, mieszany często współistniejących w jednym przypadku. Wspólną cechą wszystkich wariantów jest obecność komórek o nerkowatych, brzeźnie położonych jądrach z wyraźnymi jąderkami i kwasochłonnym przejaśnieniem okołojądrowym. W ocenie immunofenotypu stwierdza się ekspresję determinant typowych dla dojrzałego limfocyta T w większości przypadków. Często obserwuje się brak ekspresji niektórych determinant – immunofenotyp niepełny. W 10-20% przypadkach stwierdza się immunofenotyp typowy dla limfocyta B a w 15-25% nie udaje się określić linii pochodzenia (tzw. fenotyp „null”). Wszystkie przypadki wykazują dodatkowo ekspresję determinanty CD30 (Ki-1), częsta jest też ekspresja antygenu błonowo-nabłonkowego (EMA). W badaniach cytogenetycznych typowa dla ALCL jest translokacja t(2;5)(p23;q35), która prowadzi do powstania hybrydowego genu NMP-ALK (nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase) i nadprodukcji aktywnej kinazy ALK, co stanowi istotny czynnik w patogenezie tego typu chłoniaka [2, 3, 6, 7].

Do najczęstszej lokalizacji ALCL należą węzły chłonne obwodowe i jamy brzusznej, rzadziej zajęte jest śródpiersie, płuca, kości i nerki. Bardzo rzadko dochodzi do zajęcia centralnego systemu nerwowego i/lub szpiku kostnego. Objawy kliniczne podobnie jak w przypadku pozostałych typów chłoniaków zależą od lokalizacji głównej masy guza [3, 8].

1.4. Diagnostyka, czynniki prognostyczne, rokowanie i leczenie

Do potwierdzenia wstępnego rozpoznania chłoniaka nieziarniczego konieczna jest ocena histopatologiczna materiału tkankowego. Najlepszy materiał do badania mikroskopowego stanowią fragmenty guza pobrane przez chirurga (możliwość oceny histologicznej, cytogenetyczne, molekularnej oraz określenia immunofenotypu komórek chłoniakowych). W przypadkach, w których stwierdza się rozsiew chłoniaka i/lub stan chorego uniemożliwiający pobranie chirurgiczne bioptatu guza) materiał do badania stanowi biopsja aspiracyjna szpiku kostnego, krew obwodowa lub płyny z jam ciała (otrzewnej lub opłucnej). Ocena stopnia zaawansowania choroby opiera się o badania obrazowe (RTG, USG, tomografia komputerowa), stwierdzenie obecności komórek chłoniakowych poza guzem pierwotnym (biopsja aspiracyjna/trepanobiopsja szpiku kostnego oraz badanie płynu mózgowo rdzeniowego). Z badań biochemicznych obok podstawowych pozwalających na ocenę stanu klinicznego pacjenta (jak morfologia krwi obwodowej, jonogram, ocena funkcji nerek i wątroby) oznacza się poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH), który stanowi istotny czynnik rokowniczy [1, 2, 7].

Obok typu histologicznego NHL, najbardziej istotnym czynnikiem wpływającym na rokowanie w przypadkach jest stopień zaawansowania choroby w momencie jej rozpoznania. Do oceny stopnia zaawansowania stosuje się klasyfikację wg Szpitala Św. Judy w modyfikacji Murphyego (tabela 2) [12].

Stadium	Umiejscowienie
I	Pojedynczy guz węzłowy lub pozawęzłowy z wyłączeniem śródpiersia i jamy brzusznej
II	Pojedynczy guz (pozawęzłowy) z zajęciem regionalnych węzłów chłonnych. Dwie lub więcej guzów/grup węzłów z tej samej strony przepony. Pierwotny guz przewodu pokarmowego z równoczesnym zajęciem lub bez zajęcia regionalnych węzłów chłonnych, który może być usunięty chirurgicznie.
III	Dwie lub więcej guzów/grup węzłów po obu stronach przepony. Pierwotne guzy w klatce piersiowej (śródpiersie, opłucna, grasica). Pierwotny guz jamy brzusznej, który nie może być usunięty chirurgicznie. Guzy okołordzeniowe lub nadoponowe.
IV	Zajęcie szpiku kostnego i/lub O.U.N. bez względu pozostałą lokalizację.

Tabela 2. Stopniowanie zaawansowania klinicznego chłoniaków nieziarnicznych u dzieci wg klasyfikacji Szpitala Św. Judy w modyfikacji Murphy'ego

Około 20-30% przypadków w momencie diagnozy stanowią przypadki w stopniu klinicznym I lub II (wczesne stadium, choroba zlokalizowana), pozostałe 70-80% to postaci zaawansowane w stopniu III i IV. Rokowanie w stadium I/II choroby jest bardzo dobre niezależnie od typu chłoniaka. Odsetek wyleczeń w tej grupie wynosi 90-100%. Znacznie gorsze rokowanie występuje w przypadkach w III/IV stopniu zaawansowania i uzależnione jest również od typu chłoniaka. W grupie chłoniaków z linii limfocyta B (Burkitt/Burkitt like i DLBCL) odsetek pełnych wyleczeń waha się pomiędzy 80 a 90%, podobny odsetek wyleczeń występuje w grupie chłoniaków limfoblastycznych. Najgorsze rokowanie jest w grupie chłoniaków anaplastycznych, gdzie odsetek pełnych wyleczeń wynosi 60-75% [1-3, 6]. W przypadkach wznowy choroby, odsetek wyleczeń w grupach chłoniaków B-komórkowych i limfoblastycznych spada do ok. 10-20% [1-3, 6], podczas gdy w przypadkach wznowy ALCL nie spada tak wyraźnie i nadal wynosi około 60% spośród osób leczonych agresywną terapią „drugiej linii” [13].

Współczesna terapia chłoniaków nieziarniczych u dzieci obejmuje chemioterapię i miejscową radioterapię oraz leczenie chirurgiczne. Ponieważ chłoniaki nieziarnicze rozpoznawane u dzieci nawet we wczesnych stadiach zaawansowania klinicznego są uważane za choroby układowe, podstawą leczenia jest wielolekowa, skojarzona chemioterapia, w której stosowane protokoły leczenia zależą od typu histopatologicznego/immunologicznego chłoniaka oraz stopnia zaawansowania choroby. W chłoniakach wywodzących się z dojrzałych komórek B (Burkitt/DLBCL) podstawą leczenia jest krótka (4-7 miesięcy w zależności od stopnia zaawansowania choroby), intensywna chemioterapia wielolekowa. W skład wielolekowych cykli chemioterapii wchodzi takie leki jak: cyklofosfamid, winkrystyna, prednizon, wysokie dawki metotreksatu, doksorubicyna, cytarabina i etopozyd [7, 14]. W Polsce najczęściej stosowany jest protokół LMB-89 (French Society of Pediatric Oncology) [14].

Leczenie chłoniaków limfoblastycznych (z linii limfocyta T i B) jest podobne do terapii ostrych białaczek limfoblastycznych i obejmuje 2-letni protokół chemioterapii składający się z fazy indukcji, konsolidacji i podtrzymywania remisji. Do leków stosowanych w cyklach chemioterapii należą: prednizon, deksametazon, winkrystyna, daunorubicyna, cytarabina, cyklofosfamid, merkaptopuryna, tioguanina (fazy indukcji i konsolidacji) oraz metotreksat i merkaptopuryna w okresie podtrzymywania remisji. Dodatkowo w III/IV stopniu zaawansowania stosuje się profilaktyczne napromienianie centralnego układu nerwowego. W Polsce w leczeniu chłoniaków limfoblastycznych najczęściej stosuje się protokół BFM-95 (Berlin-Frankfurt-Munster) [1, 6, 7].

Leczenie anaplastycznych chłoniaków wielokomórkowych jest zbliżone do schematów leczenia chłoniaków B-komórkowych (krótka intensywna chemioterapia) i obejmuje takie leki jak: deksametazon, cyklofosfamid, metotreksat, cytarabina, doksorubicyna, etopozyd, vinblastyna oraz ifosfamid. W Polsce w leczeniu tego typu chłoniaków stosuje się protokół ALCL 99 (Europejska Grupa ALCL) [1, 6, 7].

W przypadkach niepowodzeń terapeutycznych (progresja lub wznowa choroby) nie ma standardowego postępowania, zwykle stosowana są leki tzw. drugiego rzutu oraz chemioterapia wysokodawkowana (megachemioterapia) z następowym autologicznym lub allogenicznym przeszczepieniem szpiku kostnego.

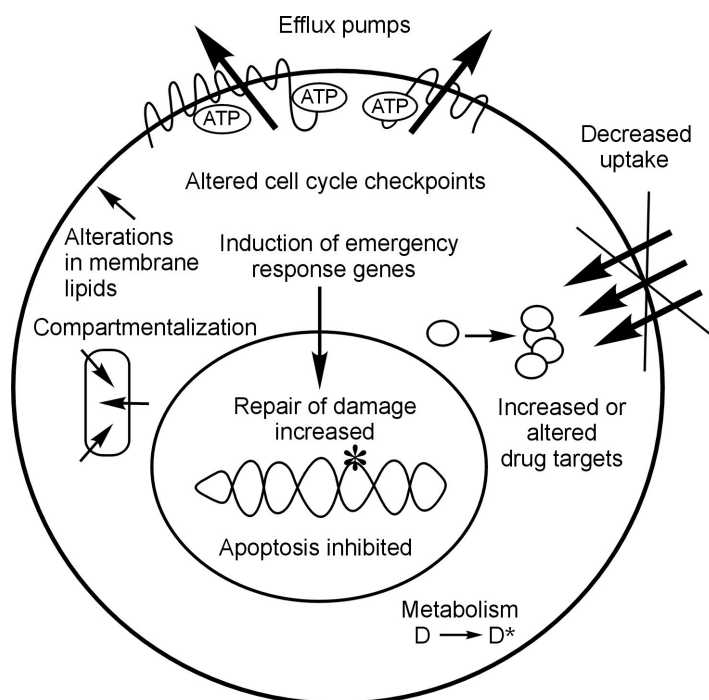
1.5. Mechanizmy lekooporności komórek nowotworowych

Podstawowym mechanizmem działania leków chemioterapeutycznych jest zahamowanie proliferacji komórki nowotworowej (aktywność cytostatyczna) i/lub indukowanie apoptozy (aktywność cytotoksyczna). Efekt stosowania leku cytostatycznego zależy od etapów działania: a) przejścia leku przez błonę komórkową do wnętrza i osiągnięcia odpowiedniego wewnątrzkomórkowego stężenia, b) aktywacji bądź podtrzymania aktywnej formy leku w komórce, c) uszkodzenia białka (enzymu) będącego „celem” dla danego leku, wreszcie d) zahamowania cyklu komórkowego i/lub e) indukcji śmierci komórki nowotworowej poprzez apoptozę. Komórka nowotworowa wykazuje zdolność do wykształcenia mechanizmów zmniejszających lub osłabiających działanie cytostatyku na każdym z powyższych etapów działania leku. W związku z powyższym wyróżnia się następujące mechanizmy lekooporności komórkowej [15-19]:

- zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia leku wskutek zmniejszenia napływu i/ lub zwiększenia usuwania leku z wnętrza komórki w oparciu o aktywność białek transportujących,
- zmniejszenie aktywacji lub wzmożenia inaktywacji leku wewnątrz komórki,
- ilościowe i jakościowe zmiany dotyczące białek komórkowych będących „celem” dla chemioterapeutyku (np. zmniejszenie ich powinowactwa do leku)
- modyfikacje mechanizmów naprawczych uszkodzeń DNA,
- obniżenie zdolności komórki do procesu apoptozy

Schemat podstawowych mechanizmów lekooporności na poziomie komórkowym

przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Podstawowe mechanizmy lekooporności na poziomie komórkowym [18]

1.5.1. Mechanizmy prowadzące do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia leku (zaburzenia transportu leku)

Jednym z warunków działania chemioterapeutyku na komórkę nowotworową jest osiągnięcie odpowiedniego stężenia wewnątrzkomórkowego danego leku. W komórce nowotworowej mogą zostać wytworzone mechanizmy utrudniające lub uniemożliwiające osiągnięcie terapeutycznego stężenia danego leku wewnątrz komórki.

1.5.1.1. Mechanizmy związane ze zmniejszeniem napływu leku do komórki

Większość leków cytostatycznych przedostaje się do wnętrza komórki w oparciu o bierną dyfuzję przez błonę komórkową zgodnie z gradientem stężeń. Jedynie niektóre leki cytostatyczne (jak np. inhibitor reduktazy dihydrofolianowej – metotreksat, czy inhibitor syntazy tymidylowej - raltireksed) wymagają do transportu specyficznych nośników. Leki te są transportowane do wnętrza komórki przy pomocy zredukowanych nośników folianowych (reduced folate carrier – RFC). Wykazano, że zmniejszona

ekspresja tych nośników w błonie komórkowej i/lub obecność mutacji prowadzących do zmniejszenia powinowactwa tych nośników do leku lub nawet utratą ich funkcji transportowych upośledzają w znacznym stopniu transport metotreksatu do wnętrza komórki, a w konsekwencji ułatwiają wytworzenie oporności na ten rodzaj leku [18, 19].

1.5.1.2. Mechanizmy związane ze zwiększeniem usuwania leku z wnętrza komórki

Innym rodzajem mechanizmów prowadzących do obniżenia stężeń leków wewnątrz komórki są mechanizmy związane ze wzmożonym usuwaniem leku z wnętrza komórek. Metotreksat w komórkach nowotworowych podlega procesowi tzw. poliglutaminacji (enzymatyczne przyłączanie grup glutaminowych), co umożliwia dłuższe wewnątrzkomórkowe pozostawanie aktywnej formy leku i zwiększa skuteczność jego działania. Wykazano, że zaburzenie poliglutaminacji polegające na obniżeniu zdolności enzymatycznej do przyłączania grup glutaminowych prowadzi do zwiększonego wydalania leku z komórek za pomocą transportu lizosomalnego. Obniżenie aktywności enzymu może być skutkiem mutacji genu kodującego ten enzym. Innym mechanizmem prowadzącym do tego samego efektu jest zwiększenie aktywności enzymu odpowiedzialnego za rozkład poliglutaminowych pochodnych metotreksatu [18-20].

Kluczową rolę w tworzeniu lekooporności przypisuje się mechanizmom umożliwiającym aktywne usuwanie cząsteczek leków z wnętrza komórek nowotworowych, związanych z obecnością w ich błonach komórkowych specyficznych białek transportowych. Białka te mają charakter pomp transportujących z wnętrza komórki różne substraty (w tym i leki) wbrew gradientowi stężeń, przy udziale energii pochodzącej z redukcji ATP. Białka te należą do tzw. rodziny ABC (ATP-Binding Cassette - omówione szczegółowo w rozdziale 1.6) [17, 21, 22].

1.5.2. Mechanizmy lekooporności związane ze zmniejszoną aktywacją lub nasiloną inaktywacją wewnątrzkomórkową leku.

Do pełnej aktywności niektórych leków stosowanych w chemioterapii przeciwnowotworowej konieczne jest wewnątrzkomórkowe przekształcenie w aktywny metabolit. Do leków takich należą m.in. 5-fluorouracyl (5-FU), czy irinotecan (CPT-11). Wykazano, iż zmniejszona aktywność enzymów, takich jak fosforylaza tymidynowa, fosforylaza urydynowa, transferaza fosforybozylowa (metabolizm 5-FU), czy

karboksylesteraza (metabolizm CPT-11), odpowiedzialnych za tworzenie form aktywnych leku może odgrywać istotną rolę w powstawaniu lekooporności [19].

Niektóre leki (np. czynniki alkilujące - pochodne platyny: cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna) mogą wiązać się z obecnym w komórkach S-glutationem (GSH), co prowadzi do ich inaktywacji. Glutation, obecny prawie we wszystkich komórkach ssaków jest silnym czynnikiem antyoksydacyjnym chroniącym komórki przed uszkodzeniem spowodowanym aktywnymi formami tlenu, wolnymi rodnikami oraz innymi szkodliwymi czynnikami zarówno egzo- jak i endogennego pochodzenia. Wiązanie leków przeciwnowotworowych z GSH ułatwia ich usuwanie z wnętrza komórek nowotworowych przy udziale białek transportowych (w tym także białek z rodziny ABC-transporterów) [23]. Ponadto GSH jako antyoksydant stanowi dodatkowy czynnik ochronny dla DNA przed uszkodzeniami wywoływanymi przez leki. Katalizatorami wiązania leków z GSH są enzymy z rodziny transferaz S-glutationu (GST). Wykazano, że oporność na cisplatynę w niektórych typach nowotworów związana jest z wysokim poziomem GST- π , jednego z podtypów transferazy-S-glutationu. Ponadto niski poziom GST- π korelował się ze zwiększoną przeżywalnością po leczeniu cisplatyną w niektórych nowotworach głowy i szyi [19]. Sugeruje się również, że inne enzymy biorące udział w metabolizmie glutationu (syntetaza γ -glutamylcysteinowa i γ -glutamylotransferaza) są związane z powstawaniem oporności na pochodne platyny. Ponadto w komórkach nowotworów opornych na ten typ leków stwierdzano wysoki poziom wewnątrzkomórkowego GSH, a zwiększenie wrażliwości komórek na leczenie cisplatyną obserwowano po zastosowaniu związków obniżających poziom wewnątrzkomórkowego glutationu [20].

1.5.3. Mechanizmy związane z modyfikacją białek "docelowych" dla leku.

Zmiany dotyczące białek komórkowych (enzymów) będących „celem” dla chemioterapeutyku mogą wiązać się z obniżeniem skuteczności tego leku. Mogą mieć one charakter ilościowy polegający na zwiększeniu ilości danego białka bądź jakościowy polegający na obniżeniu powinowactwa enzymu do danego leku.

Ilościowe zmiany prowadzące do zwiększenia poziomu danego białka w komórce są najczęściej wynikiem zmian genetycznych w obrębie genów kodujących dane białko. Wykazano, że amplifikacja genu kodującego reduktazę dwuhydrofolianową prowadzi do wzrostu jej poziomu w komórkach opornych na metotreksat [17]. U pacjentów homozygotycznych w zakresie genu kodującego syntazę tymidylową (TS - enzymu

hamowanego przez jeden z aktywnych metabolitów 5-FU) (TSER3/TSER3) a wykazującego polimorfizm promotora, obserwowano nasiloną ekspresję tego enzymu, a wysoki jego poziom korelował ze zwiększoną opornością na leczenie 5-FU. Zwiększenie ekspresji danego enzymu może być również wynikiem zahamowania mechanizmów sprzężeń zwrotnych regulujących poziom tego enzymu przez lek. Zaobserwowano, że samo leczenie 5-FU indukowało zwiększoną ekspresję TS, co przypisano zahamowaniu mechanizmów sprzężenia zwrotnego regulujących poziom tego enzymu przez lek [19].

Zmiany jakościowe, związane są głównie z obecnością mutacji w obrębie genów kodujących białka będące "celem" dla leków chemioterapeutycznych. Mutacje te mogą powodować obniżenie powinowactwa danego enzymu do leku, a w konsekwencji - obniżenie skuteczności danego leku stosowanego w konwencjonalnych dawkach. Mutacje takie opisywano m. in. dla reduktazy dihydrofolianowej (obniżenie powinowactwa do metotreksatu). Podobnie w przypadku leków z grupy inhibitorów topoizomerazy I (enzym biorący udział w replikacji DNA), jak CPT-11, obserwowano zmniejszoną wrażliwość na te leki w komórkach nowotworowych z obecną zmutowaną formą tego enzymu [19].

Sugeruje się również, że zmiany w obrębie wrzeciona podziałowego (np. obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu tubuliny - białka będącego jego głównym składnikiem, czy obecność zmutowanych form podtypu β tego białka) mogą prowadzić do oporności na leki działające poprzez hamowanie tworzenia wrzeciona podziałowego (tarany, alkaloidy vinca), jednak znaczenie kliniczne tych mechanizmów nie zostało jeszcze dokładnie określone [19].

1.5.4. Mechanizmy związane z modyfikacją procesów naprawczych DNA

Procesy naprawcze DNA odgrywają istotną rolę w ochronie komórki przed szkodliwymi czynnikami, w tym również lekami przeciwnowotworowymi (głównie lekami alkilującymi, jak np. pochodne platyny). Zwiększony poziom lub brak niektórych białek stanowiących element systemów naprawczych DNA może wiązać się z opornością na niektóre leki przeciwnowotworowe. Wykazano, że zwiększony poziom białek z rodziny ERCC (Excision Repair Cross-Completing protein) stanowiących część kompleksu NER (Nucleotide Excision Repair) będącego jednym z głównych „ścieżek” naprawy DNA w komórkach nowotworowych, a szczególnie białka ERCC1 był związany z opornością na cisplatynę [17, 19]. Klinicznie, wysoki poziom tego białka korelował ze słabszą odpowiedzią na leczenie pochodnymi platyny w takich nowotworach jak rak jajnika,

żołądka czy niedrobnokomórkowy rak płuca. W komórkach nowotworowych opornych na cisplatynę stwierdzano również nadekspresję innego składnika kompleksu ER, białka XPA (xeroderma pigmentosum group A), co sugeruje istotną rolę tego kompleksu naprawczego w tworzeniu lekooporności na pochodne platyny [19]. Innym kompleksem naprawczym DNA, któremu przypisuje się udział w tworzeniu lekooporności jest system MMR (Mismatch Repair System). Defekt genów kodujących niektóre białka z tego kompleksu (szczególnie hMLH1) i hMSH2) obserwowano w części nowotworów jelita grubego, sutka czy jajnika. Wykazano, że brak prawidłowo funkcjonującego systemu MMR (związany m.in. z uszkodzeniem w/w genów) wiązał się z opornością na szerokie spektrum leków uszkadzających DNA, takich jak pochodne platyny czy inhibitory topoizomerazy II [24]. Rolę w powstawaniu lekooporności przypisuje się również zwiększeniu ilości i/lub aktywności w komórkach nowotworowych innego enzymu biorącego udział w naprawie DNA – chloro-0-6-alkyloguanino-DNA-alkylotransferazy (AGT), kodowanego przez gen MGMT. Nasilona ekspresja tego enzymu wiązała się z opornością komórek na karmustynę (BCNU) i inne leki z tej grupy [25].

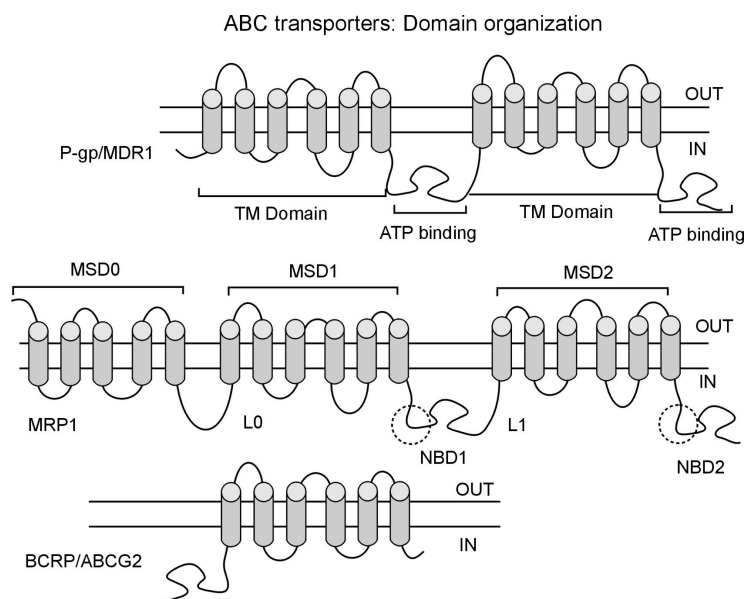
1.5.5. Mechanizmy związane z hamowaniem lub obniżaniem zdolności komórek do apoptozy

Końcowym etapem działania każdego leku przeciwnowotworowego jest zahamowanie zdolności komórki do dalszego podziału i indukcja jej śmierci poprzez mechanizm apoptozy. Zaburzenia mechanizmów warunkujących prawidłowy proces indukcji apoptozy skutkują obniżeniem efektywności działania chemioterapeutyku i wytworzeniem lekooporności. Kluczową rolę w tym procesie przypisuje się białku p53. Białko to, syntetyzowane przez komórkę w odpowiedzi na różne czynniki uszkadzające DNA (w tym i leki) powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego celem umożliwienia naprawy DNA. Natomiast w sytuacji w której naprawa uszkodzonego DNA nie jest możliwa, białko to prowadzi do aktywacji genów indukujących apoptozę i śmierć uszkodzonej komórki. Brak aktywnej formy białka p53 zaburza działanie w/w mechanizmów, co skutkuje utratą zdolności komórek nowotworowych do apoptozy a w następstwie oporność na chemioterapię. Wykazano, że w komórkach wielu nowotworów opornych na chemioterapię, jak np. w rakach jelita grubego istnieją mutacje w obrębie genu Tp53 prowadzące do braku lub wytwarzania nieaktywnej formy

białka p53 [17]. Innym sposobem z którego może korzystać komórka do zahamowania indukcji apoptozy jest wysoki poziom białek o charakterze antyapoptotycznym (np. bcl-2). Wysoka ekspresja bcl-2 stwierdzana w niektórych nowotworach w tym również w chłoniakach korelowała ze słabą odpowiedzią na chemioterapię [26]. Sugeruje się, że obniżona ekspresja białek pro-apoptotycznych (np. bax) może zmniejszać łatwość indukcji apoptozy i pośrednio zmniejszać skuteczność terapii. Istnieją dane wskazujące, że zaburzenia innych mechanizmów kontrolnych apoptozy, takich jak system Fas/FasL, system tyrozynowych kinaz białkowych (Protein Tyrosine Kinases – PTKs) oraz kaspaz mogą mieć pośredni związek z odpowiedzią na leczenie [17, 19, 26].

1.6. Białka związane z lekoopornością

Mechanizm lekooporności oparty o aktywne usuwanie cząsteczek leków z wnętrza komórek nowotworowych jest związany z obecnością w błonach komórkowych białek transportowych należących do tzw. rodziny ABC (ATP-binding cassette). Białka te obecne są w komórkach wszystkich gatunków organizmów, od bakterii aż po człowieka. Ich obecność wykazano w większości tkanek ludzkich związanych z kontaktem z substancjami spoza organizmu lub ich przetwarzaniem (wątroba, nerki, jelita, gonady, bariera krew-mózg). U człowieka opisanych obecnie jest 49 białek z tej rodziny podzielonych na 7 podklas (A-G) [22]. Białka te cechują się podobną strukturą (ATP-zależne pompy lub kanały błonowe składające się z dwóch domen przezbłonowych i dwóch domen przyłączających nukleotydy) oraz pełnią podobne funkcje (aktywny transport przez błony biologiczne rozmaitych substratów – od niewielkich cząstek jak jony aż do dużych związków białkowych). Fizjologicznie pełnią one rolę ochronną dla komórek przed potencjalnie szkodliwymi substancjami (jak ksenobiotyki czy toksyny naturalne). Do ich substratów należą również leki cytostatyczne naturalnego pochodzenia takie jak: adriamycyna, daunorubicyna, winkrystyna, winblastyna czy mitoxantron [21, 22, 27].



Ryc. 3. Schemat budowy podstawowych białek z rodziny ABC transporterów (p-gp, MRP1, BCRP) [28].

1.6.1. Glikoproteina p (p-gp, p170)

Pierwszym i jak dotąd najlepiej poznanym białkiem z rodziny ABC z udowodnioną rolą w wytwarzaniu lekooporności jest glikoproteina p (permeability-related glycoprotein, p-gp). Jest to glikozylowane białko o ciężarze cząsteczkowym 170 kD, kodowane przez gen *MDR1* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 7 (7q21). Białko to występuje w błonie komórkowej i jak większość z białek z rodziny ABC zbudowane jest ono z dwóch domen przezbłonowych (po 6 segmentów każda) odpowiadających za rozpoznanie substratu oraz dwóch domen przyłączających ATP (ryc. 3) [22, 28]. Fizjologicznie wysoką ekspresję tego białka stwierdzono w komórkach takich narządów jak wątroba, nerki, trzustka, jelito cienkie i grube oraz łożysko, w których lokalizuje się ono głównie na powierzchni nabłonków wyściełających przewody [29, 30]. Ekspresję tego białka wykazano również na komórkach hematopoetycznych szpiku kostnego oraz komórkach krwi obwodowej [31].

Do substratów dla p-gp należy wiele leków pochodzenia naturalnego, w tym również leki stosowane w terapii przeciwnowotworowej, takie jak: daunorubicyna, doksorubicyna, aktynomycyna D, etopozyd, mitoxantron, winkrystyna czy winblastyna [21, 22, 30].

Występowanie i aktywność p-gp była badana bardzo szczegółowo w wielu typach nowotworów a jej poziom w komórkach nowotworowych odpowiada często fizjologicznej

ekspresji tego białka w danym narządzie. Wysoki poziom p-gp stwierdzano w komórkach nowotworów jelita, nerek, nadnercza, trzustki czy wątroby, natomiast niską ekspresję tego białka stwierdzano w nowotworach wywodzących się z płuc, żołądka, jajnika czy sutka. W wielu przypadkach znacznie wyższą ekspresję p-gp wykazywały komórki obecne w przerzutach lub nawrotach lokalnych po zastosowanej chemioterapii, co potwierdzałoby rolę tego białka w wytwarzaniu lekooporności [17, 21, 22]. Wysoki poziom p-gp wykazywano również w niektórych nowotworach układu hematopoetycznego jak ostre białaczki mieloidalne, przewlekłe białaczki limfoidalne [22, 32, 33] oraz limfoblastyczne z linii limfocyta T i nieziarnicze chłoniaki T-komórkowe [34].

1.6.2. Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1)

W drugiej połowie lat 80-tych zaobserwowano zjawisko lekooporności nie związane z obecnością p-gp, co doprowadziło do odkrycia i opisanie kolejnego białka z rodziny ABC-transporterów nazwanego multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1). Białko to należy do większej podrodziny białek ABC oznaczanych jako MRP liczącej 9 białek (MRP1-9). MRP1 jest cząsteczką o ciężarze 190 kD, wykazującą homologię z białkiem p-gp jedynie w 15% [35, 36]. Białko to lokalizuje się głównie w błonie komórkowej, aczkolwiek jego obecność stwierdzono również na retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego. Fizjologicznie ekspresję tego białka u człowieka wykazywano w większości tkanek. Szczególnie wysoką ekspresję MRP1 stwierdzano w tkankach płuc i jąder, podczas gdy w pozostałych narządach była ona niska [22, 28, 30]. Odpowiednio do tego wysoką ekspresję MRP1 stwierdzono w takich nowotworach jak niedrobnokomórkowy rak płuca, rak jajnika, niektóre typy raka sutka, a także w przewlekłych białaczkach limfatycznych, białaczkach mieloidalnych i szpiczaku mnogim [37-39].

W przeciwieństwie do p-gp, której substratami są duże, hydrofobowe kationy, białka z rodziny MRP wykazują największe powinowactwo do organicznych anionów. Substratami MRP1 są m.in. leki transportowane w połączeniu z glutationem (GSH). Pomimo, że substraty dla p-gp i MRP1 różnią się swoimi właściwościami, część chemioterapeutyków stanowi substraty dla obydwu tych białek. Do wyjątków należą taksany i mitoxantron, które nie stanowią substratów dla MRP1 a są usuwane z komórek przez aktywną p-gp. Wykazano, że również część innych białek z rodziny MRP (jak MRP2, MRP3, MRP4 i MRP5) ma zdolność do transportu niektórych chemioterapeutyków,

aczkolwiek różnią się między sobą powinowactwem do poszczególnych leków a ich rola w indukcji lekooporności nie została jednoznacznie udowodniona [36, 40, 41].

1.6.3. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2, MXR)

W drugiej połowie lat 90-tych odkryto kolejny transporter z rodziny ABC, nazwany BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2). W przeciwieństwie do „klasycznych” ABC transporterów, BCRP należy do grupy tzw. ”pół-transporterów” (*half-transporters*) i jest zbudowane z jednej domeny przezbłonowej i jednej domeny przyłączającej nukleotydy (ryc. 3). Białko to występuje w błonie komórkowej, a fizjologicznie jego wysoką ekspresję stwierdzono w komórkach takich narządów jak łożysko, wątroba, jelito cienkie i grube. Słabszą ekspresję BCRP wykazano w komórkach nerek, płuc, nadnerczy oraz w leukocytach krwi obwodowej i komórkach szpiku. [42-44]. Ekspresję BCRP stwierdzano m.in. w gruczolakorakach przewodu pokarmowego, rakach endometrium, płuc, a także w części przypadków białaczek limfoblastycznych i mieloblastycznych [45].

Do substratów BCRP należą takie leki jak: mitoxantron (stąd inna nazwa tego białka – Mitoxantron Resistance Protein – MXR), topotecan, w mniejszym stopniu metotreksat i antracykliny. Zdolność do transportu tej ostatniej grupy leków jest uzależniona od obecności mutacji BCRP w obrębie kodonu 482 i zastąpienia argininy przez glicynę lub treoninę [45].

1.6.4. Lung Resistance Protein (LRP, p110)

Do białek związanych z wytwarzaniem lekooporności nie należących do rodziny ABC transporterów należy białko LRP (Lung Resistance Protein). Białko to określane również jako MVP (Major Vault Protein) stanowi zasadniczą część kompleksów rybonukleoproteinowych zwanych „vaults” [46, 47]. Kompleksy te, w przeciwieństwie do ABC-transporterów nie występują w błonie komórkowej, ale w cytoplazmie (związane z elementami cytoszkieletu komórki) i jądrze komórkowym (w szczególności w błonie jądrowej). Fizjologiczna rola białek *vaults* nie została jak dotąd dokładnie określona, prawdopodobnie biorą one udział w transporcie wewnątrzkomórkowym, a szczególnie jądrowo-cytoplazmatycznym. Uważa się, że LRP może być związane z lekoopornością poprzez „zabieranie” leków od punktów ich docelowego działania (np. jądra komórki) oraz ich transport do pęcherzyków egzocytujących lub pomp powodujących ich usuwanie poza komórkę [47, 48]. Fizjologicznie wysoką ekspresję tego białka stwierdzono w komórkach

kanalików proksymalnych nerek i w korze nadnerczy, częściową ekspresję wykazano też w tkankach oskrzeli, jelita cienkiego i grubego, w jądrach oraz tkance mięśniowej [49, 50]. Wysoką ekspresję LRP stwierdzano w takich nowotworach jak raki jelita grubego, sutka i jajnika a także w nowotworach układu hematopoetycznego jak ostre białaczki mieloidalne, limfoblastyczne i szpiczak mnogi [46, 47].

Do substratów dla LRP należą takie chemioterapeutyki jak: antracykliny, alkaloidy *Vinca rosacea* (winkrystyna i winblastyna) i leki alkilujące [47].

1.7. Metody badania białek oporności wielolekowej (MDR)

Do najczęściej stosowanych metod badania wyżej wymienionych białek oporności wielolekowej należą analizy :

a) ekspresji białek za pomocą metod immunohistochemicznych lub w cytometrii przepływowej z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Do najczęściej stosowanych przeciwciał należą [51-55]:

- p-gp: JSB1, MRK16, UIC-2, 4E.3, C-219
- MRP1: MRPr1, MRPm6
- BCRP: BXP-21, BXP-34
- LRP: LRP-56

b) obecności mRNA dla genów kodujących badane białka za pomocą metod biologii molekularnej (PCR, RT-PCR) [39, 56]

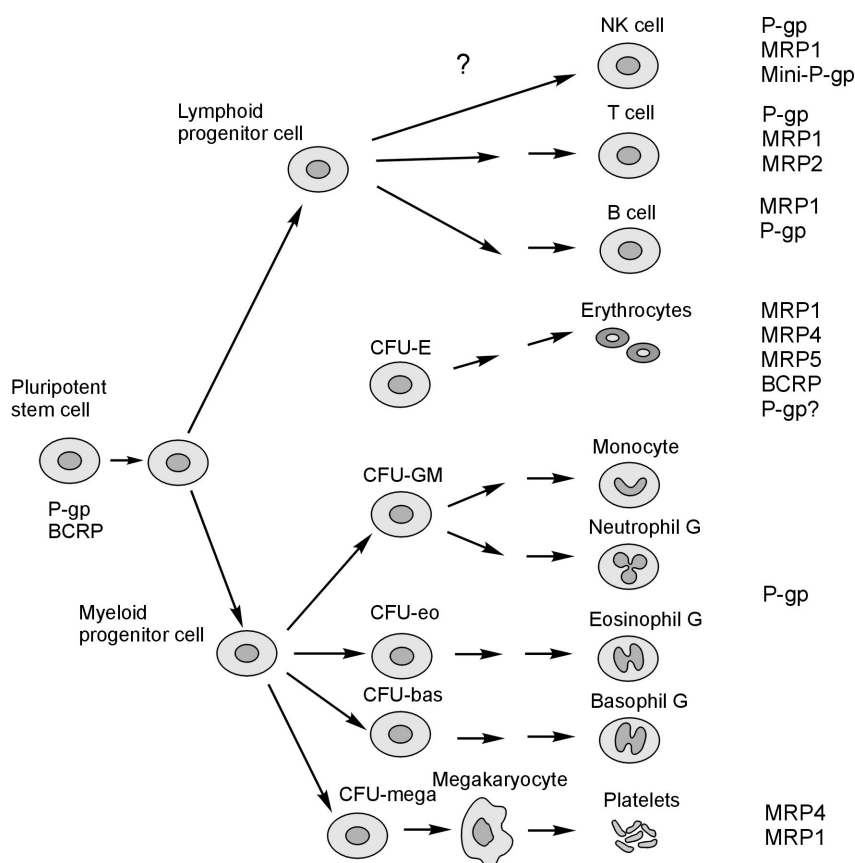
c) czynności białka za pomocą pomiarów ilości usuwanego barwnika fluorescencyjnego z komórki za pomocą cytometru przepływowego. Do powszechnie stosowanych barwników należą Hoechst 33342 (dla p-gp, MRP1 i BCRP), rodamina 123 i DiO(C2)3 (dla p-gp) czy kalceina i CF (dla MRP1) [51, 57].

1.8. Ekspresja białek oporności wielolekowej w prawidłowych komórkach układu hematopoetycznego

Ekspresja białek z rodziny ABC transporterów w komórkach układu hematopoetycznego była szeroko badana. Wykazano wysoką ekspresję aktywnych białek p-gp i BCRP na komórkach macierzystych szpiku natomiast na ekspresja na poszczególnych etapach ontogenetycznych limfocytów B i prekursorach limfocytów T była zmienna [58]. W zależności od zastosowanych metod badawczych stwierdzano

ekspresję tego białka na 20-80% limfocytów B oraz 30-100% limfocytów T [59-62]. Najwyższą ekspresję p-gp (w aspekcie intensywności reakcji, co odpowiada ilości molekuł na komórce) wykazywano na komórkach NK (CD56+), następnie limfocytach T CD8+ i limfocytach T CD4+, najslabszą ekspresję wykazywały limfocyty B (CD19+) [60-62]. Najsilniejszą ekspresję MRP1 wykazywano na limfocytach T, przy czym ekspresja ta była największa w populacji limfocytów T CD4+. Słabszą i zbliżoną do siebie ekspresję MRP1 wykazano w limfocytach B i komórkach NK [31]. Nie wykazano istotnej ekspresji BCRP na dojrzałych komórkach linii limfocytarnej [31].

Ekspresję białek z rodziny ABC wykazywano również na innych dojrzałych komórkach układu krwiotwórczego: p-gp na granulocytach obojętnochłonnych, zasado- i kwasochłonnych oraz monocytach, MRP1 na krwinkach czerwonych i płytkowych a BCRP tylko na krwinkach czerwonych [31]. Szczegółową ekspresję ABC transporterów na komórkach układu hematopoetycznego przedstawia ryc. 4.



Ryc. 4. Ekspresja białek z rodziny ABC-transporterów na komórkach układu hematopoetycznego [31].

Niewiele jest badań dotyczących ekspresji LRP w dojrzałych komórkach układu hematopoetycznego. Przy użyciu metod immunohistochemicznych wykazano bardzo silną

ekspresję tego białka w makrofagach, nie wykazano jej jednak w dojrzałych limfocytach [49, 50].

1.9. Oporność wielolekowa w nowotworach pochodzenia hematologicznego

Najczęstszym nowotworem układu hematopoetycznego w którym badano ekspresję molekuł lekooporności była ostra białaczka zarówno z linii mieloidalnej jak i limfoidalnej [32, 57, 63-65]. Początkowo badano jedynie cząsteczkę p-gp i jej aktywność a następnie w miarę opisywania kolejnych odkrywanych białek lekooporności włączano je do tych badań [52, 65-67]. Wnioski opierane o badania molekuł oporności wielolekowej wskazywały na istotne znaczenie dla efektów leczenia w białaczce mieloidalnej (prawdopodobnie ze względu na substraty tych molekuł jakimi są dokсорubicyna i jej pochodne) [68].

W oparciu o te obserwacje i mechanizm działania molekuł z grupy ABC transporterów opisano również metody zmniejszenia ich aktywności przez zablokowanie kanału wapniowego w komórce (stosowanie np. verapamilu) [32]. W schematach terapeutycznych białaczek ostrych modyfikacje kombinacji leków prowadziły do zmniejszenia efektu działania molekuł lekooporności nie mniej jednak rola tych białek jest nadal istotna w przetrwaniu pojedynczych komórek stanowiących chorobę resztkową [69]. Badania wykazujące wyższy odsetek komórek z ekspresją białek lekooporności we wznowie (np. p-gp) potwierdzał rolę tych komórek w osłonie komórek białaczkowych przed działaniem leków cytostatycznych i cytolitycznych w niektórych doniesieniach klinicznych [70, 71]. Brak jednoznacznej zależności pomiędzy ekspresją białek lekooporności i wyleczeniem oraz wprowadzenie rutynowo czułych metod wykrywania choroby resztkowej w ostrej białaczce zmniejszyło zapotrzebowanie na ocenę obecności poszczególnych białek lekooporności na komórkach białaczkowych.

Natomiast w chłoniakach nieziarniczych ze względu na wysoki stopień złośliwości tych rozrostów u dzieci istotne były badania i charakterystyka komórek chłoniaków, poszukiwanie czynników o znaczeniu rokowniczym oraz modyfikacje leczenia prowadzące do uzyskania jak najlepszych wyników. Optymalizacja leczenia i wykorzystanie nowoczesnych metod detekcji masy resztkowej guza spowodowały, że zainteresowanie samym metabolizmem i biologią komórki chłoniaka jest obecnie mniejsze. W tej sytuacji badania dotyczące ekspresji i aktywności białek oporności wielolekowej w komórkach chłoniaków nieziarniczych są sporadyczne [72-76], a u dzieci

prorowadzone bardzo rzadko [34]. Z drugiej strony porównanie rozrostu białaczkowego i chłoniaka zwłaszcza typu prekursorowego, w których komórki pochodzą z tej samej linii (np. limfocyta T) pozwalało na wykorzystanie wyników badań lekooporności w białaczce w odniesieniu do chłoniaka nieziarniczego. Może to być kolejnym elementem, który zmniejszał zainteresowanie badaniami lekooporności w chłoniakach mimo, że w niektórych typach chłoniaków wyniki leczenia nawet bardzo agresywnego, wciąż nie są zadowalające.

2. ZAŁOŻENIA I CELE BADAWCZE

2.1. Założenia

Wśród badań dotyczących lekooporności w nowotworach (guzy łe i białaczki) stosunkowo niewiele danych dotyczy chłoniaków nieziarnicznych, które stanowią grupę rozrostów o zróżnicowanej odpowiedzi na chemioterapię. Wydaje się, że mechanizmy oporności wielolekowej związane z aktywnością białek lekooporności mogą mieć wpływ na skuteczność leczenia chłoniaków nieziarnicznych tym bardziej, że chłoniaki występujące w wieku dziecięcym charakteryzuje wysoki stopień złośliwości. Stanowiło to podstawę do badań obecności białek lekooporności w komórkach chłoniaków nieziarnicznych u dzieci.

2.2. Cele badawcze

Zasadniczymi celami było określenie:

1. ekspresji białek związanych z lekoopornością, takich jak p-gp, MRP1, LRP i BCRP w komórkach różnych typów chłoniaków nieziarnicznych występujących w wieku dziecięcym
2. wzajemnej zależności ekspresji badanych białek oporności wielolekowej
3. związku pomiędzy immunofenotypem komórki chłoniaka a obecnością białek związanych z lekoopornością
4. związku pomiędzy ekspresją powyższych białek a odpowiedzią na leczenie, ocenianą okresem od uzyskania remisji i dalszym przebiegiem klinicznym choroby (wyleczenie, długotrwała remisja, wznowy, progresja),
5. znaczenia ekspresji białek lekooporności dla uzyskania wyleczenia i długotrwałego przeżycia chorych

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. Pacjenci

Materiał badany pochodził od pacjentów w wieku 1-18 lat kierowanych ze wstępnym rozpoznaniem chłoniaka nieziarniczego do Kliniki Hematologii i Onkologii Dziecięcej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie w latach 1994-2006. Badania objęły 54 pacjentów z potwierdzonym rozpoznaniem chłoniaka nieziarniczego hospitalizowanych w latach 1994-2006. Szczegółowa charakterystyka grupy badanej znajduje się w rozdziale 4.1.

3.2. Materiał diagnostyczny i metody laboratoryjne

Materiał do badań i charakterystyki komórek chłoniakowych stanowiły chirurgicznie pobrane fragmenty guza i/lub zmienionego węzła chłonnego. Pobrany wycinek był dzielony na fragmenty wykorzystane do oceny:

1. morfologicznej obecności rozrostu w badanym materiale (skrawki mrożakowe – uzyskane techniką zamrażania przy pomocy CO₂ materiału nieutrwalanego)
2. immunofenotypu metodą cytometrii przepływowej (zawiesina komórkowa z materiału nieutrwalanego)
3. histologicznej i barwień immunohistochemicznych (materiał utrwalany w 10% zbuforowanej formalinie).

To postępowanie było zgodne ze standardami diagnostyki chłoniaków nieziarniczych, które postulują przeprowadzenie oceny morfologicznej, określenie immunofenotypu komórek chłoniaka oraz barwień immunohistochemicznych.

3.2.1. Ocena immunofenotypu

Cytometria przepływowa jest współczesną metodą diagnostyczną pozwalającą na określenie właściwości komórki/cząsteczki (takich jak wielkość, ziarnistość, intensywność fluorescencji) podczas ich liniowego przepływu w kapilarze pomiarowej. Ocena immunofenotypu przeprowadza się wykorzystując zawiesinę żywych komórek uzyskanych z pobranego wycinka. Badanie obejmuje ocenę ekspresji powierzchniowej i obecności

cytoplazmatycznej determinant restrykcyjnych i nierestrykcyjnych. Pozwala to na ustalenie linii pochodzenia komórek, określenie stopnia ich zróżnicowania i dojrzałości oraz ocenę ewentualnych zaburzeń immunofenotypu. Ekspresję determinant ocenia się wykorzystując przeciwciała mono (lub rzadziej poliklonalne) skierowanych przeciwko określonym determinantom.

Zestawy przeciwciał monoklonalnych wykorzystywane w diagnostyce immunofenotypowej chłoniaków nieziarniczych uwzględniające pochodzenie komórek chłoniaków nieziarniczych pozwalają na ocenę ekspresji determinant:

linia limfocyta B:

- CD19 - determinanta restrykcyjna obecna w ontogenezie limfocyta B od stadium komórki ukierunkowanej aż do dojrzałej komórki
- HLA-DR – determinanta obecna na wszystkich etapach dojrzewania limfocyta B
- CD22 - determinanta restrykcyjna obecna w zarówno w prekursorowych jak i dojrzałych limfocytach B
- CD10 - determinanta nierestrykcyjna obecna na krótkim etapie prekursorowym limfocyta B
- CD20 - determinanta pojawiająca się w późniejszym etapie prekursorowym limfocyta B równolegle do zanikania ekspresji CD10
- łańcuchy ciężkie i lekkie immunoglobulin - występują na powierzchni dojrzałych limfocytów B

linia limfocyta T:

- CD2 - determinanta obecna od wczesnego prekursorowego etapu ontogenezy aż do dojrzałej komórki włącznie,
- CD5, CD7 - determinanty nierestrykcyjne, obecne od wczesnego etapu prekursorowego aż do dojrzałego limfocyta T
- CD3 - determinanta restrykcyjna dla linii limfocyta T obecna w cytoplazmie na etapie prekursorowym, w miarę ich różnicowania występuje na powierzchni co charakteryzuje dojrzałe limfocyty T
- CD4/CD8 – determinanty pojawiające się na etapie grasiczym rozwoju limfocyta T, ich równoczesne występowanie charakteryzuje prekursora (tzw. tymocyt) limfocyta T, dojrzałe komórki wykazują ekspresję tylko jednej z tych determinant

inne determinanty:

- CD45 – determinanta obecna na wszystkich komórkach pochodzenia hematopoetycznego,
- CD38 - obecna na prekursorach zarówno limfocytów B i T,
- CD30 - determinanta charakterystyczna dla komórek ziarnicy złośliwej, rzadko obecna na komórkach chłoniaków anaplastycznych
- CD16, CD56 – determinanty komórek NK – rzadka postać chłoniaka anaplastycznego

Przeciwciała były znakowane 2-ma (izotiocjanian fluoresceiny - FITC i fykoerytryna - PE) lub 3 – ma (FITC, PE oraz chlorowodorek perydyny – PerCP) fluorochromami, co pozwalało na ocenę równoczesnego występowania kilku determinant na komórkach (wielokolorowa cytometria).

3.2.1.1. Przygotowanie materiału do badania

Z nieutralonego fragmentu guza lub węzła chłonnego drogą mechaniczną (przecieranie przez jałowe stalowe sitko) uzyskiwano zawiesinę komórkową. W sytuacji znacznej domieszki erytrocytów zawiesinę komórek oczyszczano z krwinek czerwonych metodą lizy lub nieciągłego gradientu. Uzyskane komórki płukano w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, 1800 obrotów/min, 5 min). Po doprowadzeniu komórek do stężenia $1 \times 10^6/\text{ml}$ nakładano po 50 μl do probówek przystosowanych do cytometru (Falcon) zawierających następujące kombinacje przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami (firmy DAKO Cytomation, Glostrup, Dania lub Becton-Dickinson, San Jose, CA):

1. kontrola izotypowa IgG1 PE / IgG1 FITC
2. CD3 PE/ CD2 FITC (lub CD3/CD4/CD8)
3. CD8 PE/ CD4 FITC
4. HLA-DR PE/ CD7 FITC
5. CD19 PE/ CD5 FITC
6. CD22 PE/ CD20 FITC
7. sIg (G+A+M) FITC*

8. łańcuch lekki kappa FITC*
9. łańcuch lekki lambda FITC*
10. CD30 FITC
11. CD38 FITC
12. CD45/CD3/CD19

* przeciwciała poliklonalne, od 2005 r. stosowano zestaw przeciwciał monoklonalnych uwzględniający 3 - fluorochromy - CD19 PerCP/ lambda PE/ kappa FITC (DAKOCytomation, Glostrup Denmark).

Barwienie komórek przeciwciałami przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta przeciwciał. Wybarwione i odpłukane komórki (dwukrotnie w PBS) zawieszano w objętości 0,4 ml PBS i zbierano do analizy ekspresji determinant w cytometrze przepływowym (model FACScan, od roku 2004 model FACS Calibur). W części przypadków nie wykonano oceny immunofenotypowej ze względu na brak bezpośrednio pobranego materiału (nieutrwalony fragment), co wynikało z pobierania wycinków poza USD.

3.2.1.2. Analiza cytometryczna

Z każdej próbki zawierającej zawiesinę wyznakowanych komórek pobierano nie mniej niż 10000 elementów. Analizę ekspresji determinant przeprowadzano przy użyciu programu CellQuest (B-D).

Ocena obejmowała:

- a. charakterystykę fizyczną komórek w badanym materiale (wykres punktowy FSC/SSC)
- b. ekspresję poszczególnych determinant na populacji komórek o charakterystyce limfoidalnej
- c. równoczesne występowanie determinant na określonej (bramkowanie) populacji komórek.

W większości materiałów badane komórki stanowiły populację o jednolitej charakterystyce fizycznej i analiza obejmowała wszystkie komórki. W niektórych materiałach stwierdzano obecność fragmentów uszkodzonych komórek („detritus”) lub kilka populacji komórkowych - w tych materiałach analiza uwzględniała wyselekcjonowaną populację komórkową. Bramkowanie populacji opierało się o charakterystykę fizyczną lub ekspresję determinanty CD45, która w takich materiałach była dodatkowo wykorzystywana do barwienia komórek. Występowanie danej

determinanty określano jako dodatnie, jeżeli więcej niż 20% badanych komórek wykazywało ekspresję danej determinanty (fluorescencja powyżej kontroli izotypowej). W tabelach nr IV i V przedstawiono szczegółowe immunofenotypy komórek chłoniaków w badanej grupie pacjentów.

3.2.2. Barwienia immunohistochemiczne

Do diagnostyki histopatologicznej wykorzystywano fragmenty wycinków utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie (przez 24 godziny) a następnie zatopione w kostkach parafinowych. Skrojone skrawki tkankowe umieszczano na szkiełkach podstawowych i po odparafinowaniu i płukaniu rutynowo barwiono hematoksyliną-eozyną. W części przypadków wykonywano również dodatkowe barwienia immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał dla determinant: CD20 (pan-B), CD45RO (panT), CD30, ALK-1 (dokładny opis metody przygotowywania preparatów i barwienia immunohistochemicznego w rozdziale 3.4.2.2).

3.3. Ocena kliniczna

Ze względu na rozbieżności pomiędzy klasyfikacją opartą na immunofenotypie (ocena linii pochodzenia, stopnia zróżnicowania i dojrzałości komórek chłoniaka) a klasyfikacją histologiczno-kliniczną (zmodyfikowane WHO/REAL) przeprowadzono dwukrotną analizę uwzględniając obydwie klasyfikacje. Pacjentów przypisano do poszczególnych grup zależnie od:

1. immunofenotypu komórek chłoniakowych:

- z linii limfocyta T – immunofenotyp przedgrasiczy ($CD3^-$, $CD4/CD8^-$, $CD2^+$, $CD5^+$, $CD7^+$) i grasiczy ($CD3^{+/-}$, $CD4^+/CD8^+$)
- z linii limfocyta B – immunofenotyp prekursorowy (sIg^- , $kappa/lambda^-$, $CD10^+$) i dojrzałego limfocyta B (sIg^+ , $kappa$ lub $lambda^+$)

Ten podział nie uwzględniał chłoniaków anaplastycznych ponieważ w tej grupie rozrostów ocena immunofenotypu nie pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników.

2. klasyfikacji histopatologiczno-klinicznej:

- prekursorzy (limocyty T i B)
- dojrzałe B (Burkitt/Burkitt-like, DLBCL)

- anaplastyczne (ALCL)

Ocena przebiegu klinicznego choroby uwzględniono uwzględniała ocenę stanu klinicznego pacjenta przed rozpoczęciem leczenia, ocenę wczesnych oraz odległych skutków leczenia.

3.3.1. Ocena stanu klinicznego pacjenta przed rozpoczęciem leczenia:

W ocenie stanu klinicznego pacjenta uwzględniono następujące parametry:

- wiek i płeć pacjenta
- lokalizacja głównej masy guza pierwotnego: klatka piersiowa/śródpiersie, jama brzuszna, inna - np. obwodowe węzły chłonne, centralny system nerwowy
- stopień kliniczny choroby (w tym zajęcie szpiku kostnego)
- obecność niespecyficznych objawów klinicznych (gorączki o niejasnej etiologii, poty

nocne, utrata masy ciała >10%)

- parametry biochemiczne i hematologiczne: OB, poziom dehydrogenazy mleczanowej

(LDH) i kwasu moczowego, poziomy enzymów wątrobowych (AspAT, AlAT) poziom bilirubiny, jonogram, parametry morfologii krwi obwodowej (Hb, Ht, RBC, WBC, PLT)

3.3.2. Ocena wczesnych skutków leczenia

Ocena wczesnych skutków leczenia obejmowała:

- uzyskanie (lub nie) pełnej remisji choroby (klinicznej i radiologicznej)
- czas do uzyskania remisji (mierzony w tygodniach) od momentu rozpoczęcia leczenia

3.3.3. Ocena odległych skutków leczenia

W ocenie odległych skutków leczenia uwzględniono:

- wystąpienie (lub nie) wznowy choroby
- w przypadkach wznowy - czas od uzyskania pełnej remisji do momentu stwierdzenia wznowy (mierzony w tygodniach)
- liczbę wznów choroby
- zgon pacjenta

- czas od momentu diagnozy do zgonu (mierzony w tygodniach)
- niepowodzenie terapii, określane jako wystąpienie pierwszej wznowy choroby lub zgon pacjenta przed zakończeniem obserwacji (związany z nieuzyskaniem remisji lub powikłaniami leczenia)

Całkowity okres obserwacji klinicznej pacjentów włączonych do badań przed rokiem 2002 obejmował 5 lat (260 tygodni) od momentu stwierdzenia pełnej remisji choroby, u chorych, u których rozpoznanie chłoniaka nieziarniczego ustalono po 2002 roku czas obserwacji klinicznej był odpowiednio krótszy (obserwacje do czerwca 2007 r.).

3.4. Białka oporności wielolekowej

Obecność białek oporności wielolekowej stwierdzano w komórkach chłoniakowych na podstawie obecności reakcji barwnej (barwienie immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych dla poszczególnych białek).

3.4.1. Barwienie immunohistochemiczne

Immunohistochemia, jest metodą pozwalającą na wykrywanie w komórkach i/lub tkankach substancji o charakterze antygenowym przy wykorzystaniu znakowanych przeciwciał. Jest to obecnie jedna z podstawowych metod diagnostycznych stosowanych w nowoczesnej histopatologii, która z uwagi na swoją wysoką czułość i specyficzność umożliwiła uwidocznienie składników komórek i tkanek w oparciu o reakcję antygen-przeciwciała.

3.4.1.1. Immunologiczne podstawy technik immunohistologicznych

Pojęcie antygeny obejmuje cząsteczki obecne na różnych komórkach (białka, cukrowce, związki białkowocukrowcowe itp.) wykorzystywane do reakcji antygen-przeciwciała stanowiącej podstawę wielu metod laboratoryjnych. Przeciwciała, należą do klasy immunoglobulin i są produkowane przez układ odporności w odpowiedzi na obcy antygen. We współczesnych metodach immunohistochemicznych do wykrywania obecności antygenów wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne, które wykazują swoistość wobec danego antygeny lub poliklonalne (produkowane w organizmie zwierząt np. królików).

Ze względu na jednorodność struktury molekularnej i pełną swoistość reakcji stosowane są przede wszystkim przeciwciała monoklonalne. Ich właściwości powodują, że

możliwość niespecyficznego wiązania jest minimalna. Przeciwciała poliklonalne z uwagi na swą niejednorodność mogą wiązać się czasami z innymi antygenami o zbliżonej konfiguracji przestrzennej (reakcje krzyżowe), co zmniejsza ich specyficzność a zwiększa tzw. tło. Przeciwciała są sprzężone z enzymami (peroksydaza, fosfataza alkaliczna) a reakcja z substratem prowadzi do barwnego uwidocznienia obecności badanego antygeny w komórce/tkance [77, 78].

3.4.1.2. Metody reakcji immunohistochemicznych

Najprostszą metodą zlokalizowania badanego antygeny jest zastosowanie przeciwciała sprzężonego z enzymem w metodzie bezpośredniej (jednostopniowej). Znakowane przeciwciało wiąże się bezpośrednio z antygenem, a następnie w wyniku reakcji enzymatycznej z substratem uwidacznia w preparacie miejsca wiązania przeciwciała z antygenem.

Metoda bezpośrednia cechuje się niską czułością co wynika ze stosowania bardzo niskich rozcieńczeń przeciwciał, w immunohistochemii stosuje się zazwyczaj metody pośrednie, pozwalające na wzmocnienie reakcji i uniknięcie wybarwienia tkanek/komórek nie zawierających badanego antygeny (tzw. tła). W tym przypadku przeciwciało pierwsze nie jest sprzęgnięte ze znacznikiem, sprzężone jest przeciwciało drugie (barwienie dwuetapowe) skierowane przeciwko immunoglobulinie mysiej. Odmianą metody pośredniej są stosowane we współczesnej immunohistochemii metody trójetapowe, gdzie przeciwciało wtórne nie jest znakowane, umożliwia ono wiązanie kompleksu odpowiedzialnego za wytworzenie reakcji barwnej. Do najczęściej stosowanych metod tego typu należą m.in. metoda PAP (peroksydaza-antyperoksydaza), ABC (awidyna-biotyna) czy B-SA (biotyna-streptawidyna) [77, 78].

3.4.2. Ocena ekspresji białek oporności wielolekowej

Ocena ekspresji białek oporności wielolekowej w badanym materiale została przeprowadzona metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych dla danego białka i zestawu umożliwiającego wywołanie reakcji barwnej (dwustopniowej).

3.4.2.1. Przeciwciała monoklonalne/odczynniki

Do badania ekspresji białek oporności wielolekowej wykorzystano następujące

przeciwciała monoklonalne:

- p-gp (p170) – clone JSB-1 (MONOSAN, Uden, Netherlands);
- MRP1 – clone MRPr1 (MONOSAN, Uden, Netherlands);
- BCRP – clone BXP-21 (MONOSAN, Uden, Netherlands);
- LRP – clone LRP-56 (MONOSAN, Uden, Netherlands);

Do uzyskania reakcji barwnej wykorzystano zestaw EnVision+ System-HRP (dwuaminobenzydyna) do stosowania z podstawowymi przeciwciałami mysimi (DakoCytomation, nr kat. K4007). Zestaw ten oparty jest o polimer znakowany peroksydazą chrzanową (HRP) związany drugimi przeciwciałami, co pozwala na eliminację lub znaczne ograniczenie nieswoistego barwienia.

3.4.2.2. Przygotowanie i barwienie preparatów

Procedura przygotowania preparatów do barwienia immunohistochemicznego obejmowała następujące etapy:

- krojenie utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie materiałów tkankowych na
- skrawki o grubości 3 μm i umieszczanie ich na szkiełkach podstawowych
- odparafinowywanie preparatów w ksylenie (2x10 min. w temperaturze 55 °C a następnie 10 min. w temperaturze pokojowej)
- przeprowadzanie preparatów przez malejące stężenia alkoholu celem uwodnienia preparatu (kolejno: alkohol absolutny, 96%, 70% i 50% po 5 min w każdym roztworze) a następnie płukanie w wodzie destylowanej
- inkubacja w 3% roztworze H_2O_2 przez 10 minut celem zablokowania aktywności endogennej peroksydazy
- odblokowywanie antygenów poprzez dwukrotne gotowanie preparatów w kuchence mikrofalowej w 0.01M buforze cytrynianowym (5 min. moc 750W i 15 min. moc 100W) - etap ten przeprowadzano wyłącznie dla preparatów barwionych na obecność p-gp, MRP1 i BCRP
- płukanie w buforze TBS (5 min.)

Procedurę barwienia przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta przy użyciu dostarczonych odczynników i obejmowała ona następujące etapy:

- blokowanie endogennej peroksydazy (peroxidase block) – 5 min., z następowym płukaniem w buforze TBS

- inkubacja preparatu z surowicą pierwotną – czas inkubacji i rozcieńczenie surowicy zależnie od zastosowanego przeciwciała pierwotnego i następowym płukaniem (TBS)
- inkubacja preparatu z polimerem znakowanym peroksydazą (labelled polymer-HRP anti-mouse) – 30 min. i następowym płukaniem (TBS)
- inkubacja preparatu z roztworem substrat-chromogen (DAB+ substrate Buffer i DAB+ chromogen) – 5-10 min. z następowym płukaniem w wodzie destylowanej.
- barwienie negatywne hematoksyliną, płukanie i montowanie preparatu w balsamie kanadyjskim

3.4.3. Kontrola i standaryzacja procedury barwienia

3.4.3.1. P-gp

Jako kontroli użyto fragmentów tkankowych prawidłowej nerki ludzkiej, w której metodą immunohistochemiczną stwierdza się silną ekspresję tego białka na komórkach kanalików proksymalnych, natomiast w komórkach kanalików dystalnych, cewek zbiorczych i kłębuszkach nerkowych białko to jest nieobecne [49]. Skrawek nerki został wykorzystany jako różnicujący odczyn dodatni, ujemny oraz tło. Po kilku testach obejmujących rozcieńczenia od 1:20 do 1:200 oraz czas inkubacji od 2 do 24 godzin jako optymalne rozcieńczenie dla użytego przeciwciała ustalono 1:100 i czas inkubacji 12-24 godziny (inkubacja całonocna).

3.4.3.2. MRP1

Do kontroli oznaczenia ekspresji tego białka posłużyły fragmenty tkankowe prawidłowej nerki ludzkiej, gdzie podobnie jak w przypadku p-gp wyraźną ekspresję tego białka stwierdza się w komórkach kanalików proksymalnych, natomiast w komórkach kanalików dystalnych, cewek zbiorczych i kłębuszków nerkowych białko to jest nieobecne [49]. Badany skrawek został wykorzystany jako różnicujący odczyn dodatni, ujemny oraz tło. Po serii testów obejmujących rozcieńczenia od 1:20 do 1:200 oraz czas inkubacji od 30 min do 24 godzin przyjęto rozcieńczenie 1:100 i czas inkubacji 2 godziny jako optymalny dla danego przeciwciała.

3.4.3.3. LRP

Jako kontrolę dla badanego białka użyto fragmentów tkankowych prawidłowej nerki ludzkiej. Ekspresję tego białka metodą immunohistochemiczną stwierdza się na komórkach kanalików proksymalnych, natomiast pozostałe komórki (kanalików dystalnych, cewek zbiorczych oraz kłębuszków) nie wykazują ekspresji tego białka [49]. Skrawek nerki wykorzystano celem zróżnicowania odczynu dodatniego, ujemnego oraz tła. Po przeprowadzeniu kilku testów wstępnych obejmujących rozcieńczenia od 1:20 do 1:200 oraz czasy inkubacji od 2 do 24 godzin jako optymalne rozcieńczenie dla użytego przeciwciała ciała przyjęto 1:50 i czas inkubacji 2 godziny.

3.4.3.4. BCRP

Jako kontroli ekspresji tego białka użyto fragmentów tkankowych prawidłowego łożyska ludzkiego, w którym na komórkach syncytiotrofoblastu wykazano obecność BCRP natomiast komórki cytotrofoblastu nie wykazują tej ekspresji ocenianą metodą immunohistochemiczną [43]. Wybarwione skrawki łożyska zostały wykorzystane do zróżnicowania odczynu dodatniego, ujemnego oraz tła. Po serii testów obejmujących rozcieńczenia przeciwciała pierwotnego od 1:20 do 1:200 oraz czasy inkubacji od 30 min. do 24 godzin, za optymalne rozcieńczenie przyjęto 1:100 i czas inkubacji 2 godziny.

3.4.4. Zasady oceny ilościowej i jakościowej

Wybarwione na obecność badanych białek preparaty oceniano za pomocą mikroskopu świetlnego marki Reichert, w powiększeniu 400x (10x40). Analiza mikroskopowa każdego preparatu obejmowała nie mniej niż 400 komórek (po 100 z 4 reprezentatywnych miejsc). W ocenie nie uwzględniano komórek z obrzeży preparatu oraz z miejsc gdzie prawidłowa ocena morfologiczna tkanki była utrudniona. Ilościową ocenę obecności danego białka w danym preparacie przedstawiono jako odsetek komórek dodatnich (wykazujących immunohistochemicznie obecność badanego białka). Ekspresję danego białka w preparacie uznawano za dodatnią, jeżeli min. 10% komórek badanych wykazywało pozytywny odczyn barwny na dane białko.

Dla oceny ilościowej białek przyjęto następujący schemat:

- (-) - ekspresja ujemna - <10% komórek dodatnich w preparacie
- (+) - ekspresja niska - 10-40% komórek dodatnich w preparacie
- (++) - ekspresja średnia - 41-75% komórek dodatnich w preparacie

- (+++)
ekspresja wysoka (pełna) - >75% komórek dodatnich w preparacie

Ocena jakościowa obecności danego białka obejmowała ocenę intensywności zabarwienia danego preparatu wg poniższego schematu:

- (+) - intensywność słaba - barwienie słabsze niż kontrola pozytywna
- (++) - intensywność silna - barwienie porównywalne do kontroli pozytywnej
- (+++) - intensywność bardzo silna - barwienie silniejsze niż kontrola pozytywna

3.5 Analizy

Analiza występowania białek oporności wielolekowej obejmowała:

- a) ocenę obecności i siły ekspresji poszczególnych białek (pgp, MRP1, BCRP, LRP) w badanych przypadkach – ocenę tą przeprowadzono zarówno dla grup immunofenotypowych (linia B, linia T) jak i grup histologiczno-klinicznych (chłoniaki prekursorowe, z dojrzałych limfocytów B, anaplastyczne)
- b) ocenę współwystępowania oraz zależności wzajemnej ekspresji badanych białek (w grupach immunofenotypowych i patologiczno-klinicznych)
- c) ocenę związku pomiędzy immunofenotypem chłoniaka a obecnością poszczególnych białek (dla rodzajów immunofenotypowych chłoniaka)
- d) ocenę zależności pomiędzy efektami leczenia (uzyskanie remisji, czas do uzyskania pełnej remisji, wznowa, czas odzyskania remisji do stwierdzenia wznowy, zgon) a występowaniem poszczególnych białek (dla grup histologiczno-klinicznych)

Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietu SPSS 14. Do badania korelacji pomiędzy cechami ilościowymi zastosowano korelacje r Pearsona.

4. WYNIKI:

4.1. Ogólna charakterystyka grupy badanej

Do grupy badanej zaliczono 54 przypadki ze wstępnym rozpoznaniem chłoniaka nieziarniczego (NHL). W tej grupie przeważali chłopcy (40 przypadków – 74%), w wieku między 5 a 12 lat. Pierwotny guz zlokalizowany w klatce piersiowej stwierdzono u 18 chorych (33.3%), a w jamie brzusznej u 24 chorych (44.4%). U pozostałych 11 pacjentów guz pierwotny zlokalizowany był w obwodowych węzłach chłonnych (20%), a u jednego chorego w okolicy rdzenia kręgowego w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. Objawy ogólne sugerujące chorobę nowotworową (gorączki niejasnego pochodzenia, utratę wagi >10%, osłabienie, poty nocne) stwierdzano u 15 chorych (27.7%), natomiast u pozostałych 39 chorych (72.3%) stwierdzano objawy jedynie związane z lokalizacją guza pierwotnego (duszność i przewlekły kaszel bez cech infekcji, niejasne bóle brzucha, niecharakterystyczne dolegliwości przewodu pokarmowego – nudności, dyskomfort, brak apetytu). W większości przypadków (92.5%) stwierdzono zaawansowany stopień w momencie rozpoznania choroby (III i IV stopień kliniczny, 35 i 15 przypadków odpowiednio) (tabela I).

W podstawowych badaniach laboratoryjnych stwierdzano podwyższone wartości OB u 19 chorych (67.8 %), prawidłowe wartości tylko u 9 (32.1 %). U pozostałych chorych (26 przypadków) nie przeprowadzono takiego badania w okresie diagnostycznym. W ocenie morfologii krwi obwodowej parametry w granicach normy stwierdzano u 47 chorych (87.1 %), niedokrwistość stwierdzano u 6 chorych (11.1 %), a małopłytkowość tylko u 1 chorego (1.9%). W żadnym badanym przypadku nie stwierdzono nieprawidłowości w zakresie układu białokrwinkowego (leukocytoza/leukopenia) (tabela II).

W związku z wstępnym rozpoznaniem chłoniaka nieziarniczego i diagnostyką różnicową rozrostu nowotworowego oznaczano takie parametry jak: poziom dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), poziom kwasu moczowego i poziom enzymów wątrobowych. W pracy nie uwzględniono wyników innych badań biochemicznych (np. poziom kwasu wanilino-migdałowego) wykonywanych w ramach diagnostyki różnicowej

guzów litych wieku dziecięcego takich jak neuroblastoma. Najczęściej stwierdzano podwyższony poziom dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) - 30 chorych (83.3%), u 18 chorych nie wykonano tego badania w okresie diagnostycznym. Podwyższone wartości kwasu moczowego obserwowano u 14 chorych (33.3%), u 28 (66.7%) mieściły się one w granicach wartości prawidłowych. U 14 chorych (27.4%) obserwowano podwyższone poziomy enzymów wątrobowych (AspAT, AlAT), u 37 chorych (72.5%) były one prawidłowe (tabela II).

Porównując uzyskane wyniki badań w grupie 54 chorych, stwierdzono, że najczęstszym parametrem biochemicznym wykazującym odchylenia od normy jest wartość OB oraz poziom LDH, co jest zgodne z opisywanymi zaburzeniami towarzyszącymi rozwojowi chłoniaków nieziarniczych.

Spośród 54 badanych przypadków, pełną remisję choroby po zastosowaniu chemioterapii (wg protokołu przewidzianego dla danego typu chłoniaka) uzyskano w 47 przypadkach (87%), w pozostałych 7 przypadkach (13%) remisji nie udało się uzyskać. U pacjentów ze stwierdzoną pełną remisją, wznowa choroby wystąpiła w 11 przypadkach (23.4%), zaś całkowita liczba zgonów w badanej grupie 54 pacjentów wyniosła 17 przypadków (31.5 %). W 3 przypadkach nie udało się ustalić dalszego przebiegu choroby po uzyskaniu remisji.

Ogółem, spośród 51 przypadków, w których udało się przeprowadzić długotrwałą obserwację po uzyskaniu remisji choroby niepowodzenie terapii (wystąpienie wznowy choroby lub zgon) stwierdzono u 20 chorych (37.0 %) (tabela III).

4.2. Charakterystyka immunofenotypowa

Ocenę immunofenotypu komórek uzyskanych z fragmentu bioptycznego przeprowadzono z wykorzystaniem pełnego zestawu przeciwciał u 41 chorych z chłoniakami z grupy prekursorowych (linia limfocyta T i B) i dojrzałych limfocytów B. W 4 przypadkach nie przeprowadzono oceny immunofenotypu komórek chłoniakowych ze względu na wstępną diagnostykę przeprowadzoną w innym ośrodku i brak nieutrwalonego fragmentu tkanki do badań. Z oceny immunofenotypowej wyłączono chłoniaki anaplastyczne ze względu na znaczną heterogenność immunofenotypów oraz niską ekspresję determinant hematopoetycznych (ekspresja pojedynczych determinant, niewielki odsetek komórek chłoniakowych wykazujących obecność danej determinanty). Ponadto, na trudność w uzyskaniu wiarygodnego wyniku wpływa fakt, że w czasie barwienia

i płukania komórki chłoniaka anaplastycznego często ulegają uszkodzeniu.

4.2.1. Chłoniaki nieziarnicze z linii limfocyta T

Do grupy z NHL z linii limfocyta T wliczono 18 chorych, u których przeprowadzono ocenę linii pochodzenia komórek chłoniakowych. W 16 przypadkach wykonano pełną ocenę immunofenotypu za pomocą cytometrii przepływowej. W porównaniu do etapów prawidłowej ontogenezy limfocyta T ekspresję jedynie determinant typowych dla wczesnego etapu prekursorowego limfocyta T (CD2, CD5, CD7) stwierdzono w 7 przypadkach. W 4 przypadkach stwierdzano równoczesną ekspresję CD4 i CD8 bez ekspresji CD3 na powierzchni komórki, co odpowiadało wczesnemu etapowi grasiczego różnicowania limfocyta T. W 3 przypadkach poza równoczesną ekspresją CD4 i CD8 stwierdzano ekspresję CD3 na powierzchni komórek, co odpowiadało późnemu etapowi grasiczego różnicowania limfocyta T. W dwóch przypadkach stwierdzano immunofenotypy dojrzałych limfocytów T - W jednym przypadku stwierdzono immunofenotyp obwodowego limfocyta T (CD2, CD3, CD8, CD5, CD7), natomiast w drugim – wykazano jedynie brak łańcuchów alfa/beta receptora limfocyta T (TCR α/β). Ponadto do grupy NHL z linii limfocyta T zaliczono 2 przypadki, w których na podstawie barwień immunohistochemicznych ustalono linię pochodzenia komórek chłoniakowych i stopień dojrzałości komórek bez określenia stopnia zróżnicowania i dojrzałości limfocytów metodą cytometryczną (tabela IV).

4.2.2. Chłoniaki nieziarnicze z linii limfocyta B

Do grupy chłoniaków z linii limfocyta B wliczono 27 przypadków, z czego w 25 przeprowadzono pełną ocenę immunofenotypu. W grupie tej jedynie w 3 przypadkach stwierdzono immunofenotyp odpowiadający prekursorowemu etapowi ontogenezy limfocyta B (ekspresja determinant charakterystycznych dla linii limfocyta B jak CD19, CD20, CD22, HLA-DR i CD10, brak powierzchniowej ekspresji łańcuchów ciężkich i łańcucha lekkiego immunoglobulin). U 22 pacjentów obserwowano immunofenotyp dojrzałego limfocyta B (w oparciu o obecność na powierzchni komórki chłoniaka łańcuchów ciężkich i jednego łańcucha lekkiego immunoglobulin - sIg). Analiza obecności łańcuchów lekkich immunoglobulin wykazała ekspresję łańcucha lekkiego kappa w 5 przypadkach a lambda w 12 przypadkach. W dwóch przypadkach nie stwierdzono ekspresji łańcucha lekkiego, a w dwóch wykazano obecność obydwu typów łańcucha

lekkiego i zostało to uznane za wiązanie niespecyficzne. U jednego pacjenta nie wykonano badania na obecność łańcuchów lekkich. Do analizy włączono również dwa przypadki chłoniaka z linii limfocyta B, w których nie zostało wykonane badanie immunofenotypowe natomiast linię pochodzenia i stopień dojrzałości komórek ustalono na podstawie barwień immunohistochemicznych (Tabela V).

4.3. Charakterystyka histologiczno-kliniczna

Klasyfikacja histologiczno-kliniczna została oparta o wynik oceny histopatologicznej wycinka guza, określony immunofenotyp, stopień zaawansowania klinicznego oraz schemat zastosowanego leczenia. Obejmuje ona: chłoniaki typu prekursorowego (limfoblastyczne) zarówno z linii limfocyta T jak i B, chłoniaki z dojrzałych limfocytów B oraz chłoniaki anaplastyczne (ALCL). W charakterystyce przypadków w poszczególnych typach NHL uwzględniono następujące parametry: wiek, płeć, typ histologiczny chłoniaka, lokalizację głównej (pierwotnej) masy guza, kliniczny stopień zaawansowania w momencie rozpoznania, zajęcie szpiku kostnego, obecność ogólnych objawów klinicznych oraz niektóre parametry biochemiczne.

4.3.1. Chłoniaki nieziarnicze prekursorowe

Zgodnie z klasyfikacją (podrozdział 3.3) do grupy NHL limfoblastycznych (prekursorowych) włączono 21 przypadków w tym chłoniaki prekursorowe z linii limfocyta T - 16 przypadków, a z linii limfocyta B - 3 przypadki. Ponadto w oparciu o obraz kliniczny i zastosowany schemat leczenia do tej grupy włączono również 2 chorych z rozpoznaniem NHL-T o immunofenotypie dojrzałego limfocyta T (pacjenci 03 i 12).

U 14 pacjentów stwierdzano guz w obrębie śródpiersia, u 3 - guz w jamie brzusznej u pozostałych 4 pacjentów pierwotną lokalizację stanowiły obwodowe węzły chłonne. W tej grupie u 5 pacjentów stwierdzano objawy ogólne, u 6 - podwyższone OB, a u 2 - niedokrwistość. U 11 pacjentów obserwowano podwyższony poziom LDH, a tylko u 4 - podwyższony poziom kwasu moczowego podobnie jak i podwyższony poziom enzymów wątrobowych. W ocenie klinicznej stopnia zaawansowania tylko u 1 chorego stwierdzono II stopień, natomiast u 12 - III stopień a u 8 - IV stopień zaawansowania, co

oznacza, że u większości chorych stwierdzano guz pierwotny przekraczający barierę narządu lub rozsiew (Tabela VI).

4.3.2. Chłoniaki nieziarnicze z dojrzałych (obwodowych) limfocytów B

W tej grupie chłoniaków w 19 przypadkach rozpoznano chłoniak Burkitta/typu Burkitta, w 2 przypadkach - chłoniak z dużych rozlanych limfocytów B (DLBCL) a w 3 - chłoniak z obwodowych limfocytów B bez określania podtypu histologicznego. Guz pierwotny zlokalizowany w jamie brzusznej obserwowano w 18 przypadkach. U pozostałych 6 chorych stwierdzono zajęcie węzłów chłonnych (5 przypadków) oraz guz okolicy rdzenia (1 przypadek). U 5 pacjentów obecne były objawy ogólne.

Podwyższone wartości OB notowano u 6 chorych. Z zaburzeń hematologicznych w 3 przypadkach stwierdzano niedokrwistość, a w jednym dodatkowo małopłytkowość. Podwyższony poziom LDH obserwowano był u 16 chorych, a kwasu moczowego u 9 pacjentów. Podwyższony poziom enzymów wątrobowych stwierdzano w 7 przypadkach. Wg oceny klinicznej aż w 22 przypadkach stwierdzono zaawansowaną postać choroby (III i IV stopień kliniczny, odpowiednio 17 i 5 przypadkach), jedynie w 2 przypadkach stwierdzono II stopień zaawansowania klinicznego (Tabela VII).

4.3.3. Chłoniaki nieziarnicze o typie anaplastycznym

Do grupy chłoniaków anaplastycznych zakwalifikowano 9 przypadków – 6 przypadków, w których komórki chłoniakowe pochodziły z linii limfocyta T, 1 przypadek - z linii limfocyta B. W 2 przypadkach nie udało się określić linii pochodzenia chłoniaka. Lokalizację guza pierwotnego w śródpiersiu obserwowano u 4 pacjentów, w jamie brzusznej - u 3 pacjentów. W pozostałych 2 przypadkach pierwotną lokalizację nowotworu stanowiły obwodowe węzły chłonne. U 5 pacjentów obecne były ogólne objawy kliniczne.

W badaniach laboratoryjnych wykonanych w okresie diagnostyki w 7 przypadkach stwierdzono podwyższone wartości OB, w 3 - podwyższony poziom LDH i enzymów wątrobowych, jedynie jeden pacjent miał podwyższony poziom kwasu moczowego, również tylko w jednym przypadku stwierdzono niedokrwistość. W ocenie klinicznej stopnia zaawansowania w 8 przypadkach stwierdzono zaawansowane stadium choroby (III i IV stopień, odpowiednio 6 i 2 pacjentów), natomiast II stopień kliniczny choroby w momencie rozpoznania notowano tylko u jednego chorego (Tabela VIII).

4.4. Przebieg kliniczny i wyniki leczenia

4.4.1. Chłoniaki nieziarnicze o typie prekursorowym

Do analizy przebiegu klinicznego NHL o typie prekursorowym włączono 21 przypadków. W leczeniu tej grupy u 15 pacjentów zastosowano jako podstawowy protokół oparty o schemat BFM-nonB-NHL (z odpowiednimi modyfikacjami w zależności od okresu, w jakim pacjent był leczony), a u 4 pacjentów - EURO-LB-2002. W dwóch przypadkach z uwagi na zajęcie szpiku w momencie rozpoznania, zastosowano protokół leczenia jak dla białaczek (PGP-ALL-95 i ALLIC-2002).

Pierwszą remisję uzyskano w 20 przypadkach. Jedyne przypadki, w których remisji nie uzyskano dotyczyły pacjenta z NHL o immunofenotypie dojrzałego limfocyta T (pacjent 03). Ponadto, w jednym przypadku nie było możliwe ustalenie daty remisji, gdyż guz pierwotny został usunięty w całości w czasie zabiegu operacyjnego (pacjent 10). Średni czas do uzyskania remisji w tej grupie wynosił 9,9 tygodni (z wyłączeniem pacjenta 10). Wznowę choroby stwierdzono u 4 pacjentów (01, 02, 13, 17) z rozpoznaniem NHL-T o typie prekursorowym, a średni czas od remisji do wystąpienia wznowy wynosił 103,5 tyg. Nie obserwowano wznowy w przypadkach NHL o typie prekursorowym z linii limfocyta B. W jednym przypadku nie udało się uzyskać danych dotyczących dalszego przebiegu choroby po uzyskaniu pierwszej remisji (pacjent 16). W badanej grupie obserwowano 4 przypadki zgonów - w dwóch (pacjenci 01 i 13), u których stwierdzono wznowę choroby, jeden (pacjent 03), u którego nie udało się uzyskać remisji oraz jeden przypadek (pacjent 14) zgonu z powodu powikłań terapii pomimo uzyskania pełnej remisji. U pozostałych 13 pacjentów w okresie obserwacji nie stwierdzono nawrotu choroby (Tabela IX).

4.4.2. Chłoniak nieziarnicze o typie dojrzałych limfocytów B

Do analizy przebiegu klinicznego u chorych z rozpoznaniem NHL o typie dojrzałego limfocyta B włączono 24 przypadki. Podstawowy schemat leczniczy w tej grupie stanowił protokół BFM-NHL lub LMB dla chłoniaków B-komórkowych (z modyfikacjami w zależności od okresu, w którym dany pacjent był leczony).

Pełną remisję uzyskano u 21 pacjentów. W 3 przypadkach nie udało się osiągnąć remisji (pacjenci 21, 30, 35). Średni czas do uzyskania remisji w tej grupie wynosił 11,6

tyg. U 4 pacjentów (pacjenci 29, 33, 38 i 40) stwierdzono wznowę choroby, a średni czas od stwierdzenia remisji do wystąpienia wznowy wynosił 23,5 tyg. W grupie tej 8 pacjentów zmarło (4 pacjentów ze wznową choroby, 3 pacjentów, u których nie udało się uzyskać remisji oraz jeden przypadek (pacjent 25) z powodu powikłań leczenia w pełnej remisji). W jednym przypadku (pacjent 37) nie uzyskano danych dotyczących dalszego przebiegu klinicznego choroby po uzyskaniu remisji. U 15 pacjentów w badanej grupie nie stwierdzono nawrotu choroby w okresie obserwacji (Tabela X).

4.4.3. Chłoniaki nieziarnicze o typie anaplastycznym (ALCL)

Analiza objęła grupę 9 przypadków, w których rozpoznano typ anaplastyczny chłoniaka (6 przypadków - z linii limfocyta T, 1 przypadek - z linii limfocyta B i 2 przypadki bez określenia linii pochodzenia). W 7 przypadkach pierwotny schemat leczenia stanowił protokół BFM-LCAL, natomiast w dwóch - protokół LCAL-99. Pierwszą remisję choroby udało się uzyskać u 6 pacjentów, a średni czas od rozpoczęcia leczenia do stwierdzenia remisji wynosił 12 tyg. U 3 pacjentów (pacjenci 47, 50, 53) w badanej grupie remisji nie uzyskano. Wznowę choroby zanotowano u 3 pacjentów (pacjenci 49, 51, 52). Średni czas od uzyskania pierwszej remisji do stwierdzenia wznowy choroby wyniósł 15,3 tyg. Pięciu pacjentów zmarło – w 3 przypadkach nie uzyskano pierwszej remisji a w 2 przypadkach stwierdzono wznowę choroby). U jednego pacjenta (pacjent 46) nie udało się uzyskać danych dotyczących dalszego przebiegu choroby po stwierdzeniu remisji. Jedynie u 2 pacjentów z tej grupy chłoniaków stwierdzono bezobjawowy przebieg (bez nawrotu choroby) w okresie obserwacji (Tabela XI).

4.5. Ekspresja białek lekooporności

Pełną ocenę ekspresji badanych białek oporności wielolekowej (p-gp, MRP1, LRP, BCRP) obejmującą zarówno ilość komórek wykazujących ekspresję danego białka jak i ocenę intensywności reakcji immunohistochemicznej przeprowadzono we wszystkich badanych 54 przypadkach.

W ocenie ekspresji białek lekooporności uwzględniono podział na grupy zależny od immunofenotypu komórek NHL (linia limfocyta T, limfocyta B) z wraz z podziałem na prekursorową i dojrzałą formę komórki. Zasadnicza analiza ekspresji białek lekooporności dotyczyła grup pacjentów wyodrębnionych w oparciu o klasyfikację histologiczno-

kliniczną chłoniaków wieku dziecięcego (zmodyfikowana wg. WHO/REAL) z uwzględnieniem skuteczności terapii i przypadków niepowodzenia terapeutycznego (progresje, wznowy, zgony).

Uwzględniając wszystkie badane materiały obecność p-gp w komórkach chłoniakowych stwierdzano w 43 przypadkach (79.6 %). W większości przypadków (31 – 72.1%) obserwowano wysoką ekspresję (ponad 75% komórek chłoniakowych) tego białka. Niezależnie od poziomu ekspresji, intensywność ocenioną jako słabą obserwowano w 25 przypadkach (58.1%), w pozostałych notowano intensywność silną (16 przypadków – 37.2%) i bardzo silną (2 przypadki – 4.7%).

Obecność MRP1 stwierdzono w 40 z 54 badanych przypadków (74.0%), z czego w 28 przypadkach (70.0%) ekspresja była wysoka. Intensywność oceniana jako słaba występowała w 13 przypadkach (32.5%), natomiast silna i bardzo silna w pozostałych 27 przypadkach (20 przypadków (50.0%) i 7 przypadków (17.5%) odpowiednio).

Ekspresję LRP stwierdzano w 46 przypadkach (85.2%), z czego w 30 przypadkach (65.2%) była to ekspresja wysoka, w 13 przypadkach (28.3%) – średnia a jedynie w 3 przypadkach (6.5%) - niska. Słabą intensywność ekspresji obserwowano w 22 przypadkach (47.8%), w pozostałych oceniano ją jako silną i bardzo silną - 16 przypadków (34.7%) i 8 przypadków (17.4%) odpowiednio.

Obecność BCRP stwierdzano w 46 przypadkach (85.2%), z czego aż w 37 przypadkach była to ekspresja wysoka (80.4%), średnia w 5 przypadkach (10.9%) a niska jedynie w 4 przypadkach (8.7%). Intensywność bardzo silną obserwowano tylko w 2 przypadkach (4.3%), natomiast silną i słabą w 27 przypadkach (58.7%) i 17 przypadkach (37.0%) odpowiednio.

Szczegółowe dane dotyczące ekspresji białek lekooporności u wszystkich badanych pacjentów przedstawiono w tabelach XII, XIII i XIV.

4.5.1. Ekspresja białek lekooporności w grupach zależnych od immunofenotypu komórek chłoniaka

4.5.1.1. Ekspresja p-gp

W grupie chłoniaków z linii limfocyta T (18 przypadków) obecność p-gp w komórkach nowotworowych wykazano w 17 przypadkach (94.5%) z czego w chłoniakach o immunofenotypie przedgrasiczym we wszystkich 7 przypadkach i grasiczym - w 6 przypadkach (85.7%). W 13 przypadkach (76.4%) oceniono ekspresję

jako wysoką (> 75% komórek). W chłoniakach o immunofenotypie przedgrasiczym wysoką ekspresję wykazano w 5 z 7 przypadków (71.4%) a w chłoniakach o immunofenotypie grasiczym – w 4 z 6 przypadków (66.7%) . W większości przypadków (12 przypadków – 70.6%) intensywność była silna, zarówno w chłoniakach o immunofenotypie przedgrasiczym jak i grasiczym, odpowiednio 6 przypadków (85.7%) i 4 przypadki (66.7%) (Ryc. 4.1 do 4.3).

W grupie NHL z linii limfocyta B (27 przypadków) ekspresję p-gp stwierdzono w 19 przypadkach (70.4%), - w 2 przypadkach NHL o immunofenotypie prekursorowym i 17 przypadkach NHL o fenotypie dojrzałego limfocyta B. W 13 przypadkach (68.4%) stwierdzano wysoką ekspresję tego białka - 1 przypadek o prekursorowym immunofenotypie i 12 przypadków NHL o immunofenotypie dojrzałego limfocyta B (70.6%). Intensywność ekspresji była zróżnicowana. W obydwu przypadkach chłoniaka B prekursorowego wykazującego ekspresję p-gp intensywność ekspresji była słaba, natomiast w chłoniakach z dojrzałych limfocytów B (9 przypadków – 52.9%) dominowała intensywność silna (Ryc. 4.4 do 4.6).

4.5.1.2. Ekspresja MRP1

W grupie chłoniaków z linii limfocyta T obecność MRP1 stwierdzono jedynie w 5 przypadkach (27.8%) z czego w 2 przypadkach (28.6%) chłoniaków o immunofenotypie przedgrasiczym i 3 przypadkach (42.9%) chłoniaków o immunofenotypie grasiczym. Tylko u 2 pacjentów ekspresja tego białka była wysoka – oba to przypadki chłoniaka o immunofenotypie przedgrasiczym, w pozostałych przypadkach wykazujących ekspresję tego białka (NHL-T o immunofenotypie grasiczym) była ona niska. Intensywność była zróżnicowana, słaba - w NHL-T o immunofenotypie grasiczym, silna - w NHL-T o immunofenotypie przedgrasiczym (Ryc. 4.7 do 4.9).

W grupie NHL z linii limfocyta B (27 przypadków) ekspresję MRP1 wykazano u 26 pacjentów (96.3%) - 3 przypadki NHL o typie prekursorowym i 23 przypadki (95,8%) NHL o immunofenotypie dojrzałego limfocyta B. W ocenie ekspresji w grupie NHL B-komórkowych o typie prekursorowym obserwowano znaczne zróżnicowanie tj. po 1 przypadku dla każdego przedziału (ekspresja niska, wysoka i bardzo wysoka). W grupie NHL o immunofenotypie dojrzałego limfocyta B dominowała ekspresja wysoka – 18 przypadków (78.2%). Intensywność ekspresji w przypadkach NHL o typie prekursorowym była słaba w 2 przypadkach, natomiast w chłoniakach z dojrzałych limfocytów B

dominowała intensywność silna - 11 przypadków (47.8%) (Ryc. 4.10 do 4.12).

4.5.1.3. Ekspresja LRP

W grupie NHL z linii limfocyta T obecność LRP stwierdzono w 17 z 18 przypadków (94.4%). Wszystkie badane przypadki NHL-T o immunofenotypie przedgrasiczym (7 pacjentów) jak i grasiczym (7 pacjentów) wykazywały ekspresję badanego białka. Jedyny przypadek gdzie nie stwierdzono obecności LRP dotyczył pacjenta u którego nie wykonano pełnego oznaczenia immunofenotypu (pacjent 03). W większości przypadków ekspresja badanego białka była wysoka – 10 przypadków (58.8%) dla całej grupy (5 przypadków NHL-T o typie przedgrasiczym, 4 przypadki NHL-T o typie grasiczym, jeden przypadek NHL z dojrzałych limfocytów T). Intensywność ekspresji była zróżnicowana, jednak w większości przypadków dominowała intensywność słaba – 10 przypadków z całej grupy, w tym 5 przypadków NHL-T o typie przedgrasiczym, 3 przypadki NHL-T o typie grasiczym i obydwa przypadki NHL z dojrzałych limfocytów T. W grupie o immunofenotypie grasiczym w 3 przypadkach stwierdzano intensywność silną (Ryc. 4.13 do 4.15).

W grupie NHL z linii limfocyta B ekspresję LRP wykazano w 20 z 27 przypadków (74.1%), z czego we wszystkich 3 przypadkach NHL-B o typie prekursorowym i 17 przypadkach NHL o immunofenotypie dojrzałego limfocyta B. Wysoką ekspresję obserwowano w 10 przypadkach chłoniaków z dojrzałych limfocytów B (58.8%), natomiast ekspresję średnią w 2 przypadkach (66.7%) NHL o typie prekursorowym. W ocenie intensywności we wszystkich 3 przypadkach NHL-B o typie prekursorowym oraz w większości NHL z dojrzałych limfocytów B (9 przypadków – 52.9%) obserwowano słabą intensywność barwienia (Ryc. 4.16 do 4.18).

4.5.1.4. Ekspresja BCRP

W grupie NHL z linii limfocyta T ekspresję BCRP stwierdzono w 14 z 18 przypadków (77.8%). W podgrupie NHL-T o immunofenotypie przedgrasiczym obecność tego białka wykazano w 4 przypadkach (57.1%), natomiast NHL-T o immunofenotypie grasiczym – w 6 przypadkach (85.7%). W większości przypadków ekspresja badanego białka była wysoka - 10 przypadków dla całej grupy (71,4%) w tym 3 przypadki NHL-T przedgrasiczych i 3 przypadki NHL-T grasiczych oraz wszystkie 4 NHL-T o dojrzałym bądź nieokreślonym stopniu zróżnicowania. W obu podgrupach dominowała słaba

intensywność barwienia – po 4 przypadki NHL-T przedgrasiczych i NHL-T grasiczych (Ryc. 4.19 do 4.21).

W grupie NHL z linii limfocyta B ekspresję BCRP stwierdzono w 24 z 27 przypadków (88.9%), w tym jedynie w jednym z 3 przypadków NHL-B o typie prekursorowym i 23 przypadkach (95.8%) NHL o immunofenotypie dojrzałego limfocyta B. W większości przypadków ekspresja BCRP była wysoka – 21 przypadków (87.5%) dla całej grupy, w tym – 1 przypadek NHL-B prekursorowego oraz 20 przypadków (86.9%) NHL z dojrzałego limfocyta B. We wszystkich badanych podgrupach dominowała silna intensywność ekspresji białka: 17 przypadków (70.8%) dla całej grupy w tym 1 przypadek prekursorowy NHL-B i 16 przypadków (69.7%) NHL z dojrzałych limfocytów B (Ryc. 4.22 do 4.24).

Zbiorcze porównanie ekspresji poszczególnych białek lekooporności z zależności od linii pochodzenia komórek przedstawia **(Ryc. 4.25)**.

W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że zgodnie z dotychczasowymi obserwacjami (ostre białaczki limfoblastyczne u dzieci) ogólna ekspresja p-gp jest skojarzona z linią limfocyta T jako linią pochodzenia komórki rozrostowej. Natomiast w zakresie ekspresji białka MRP1 stwierdza się wysoką asocjację z linią limfocyta B jako linią rozrostową. Wysoka ekspresja LRP w chłoniaka z linii limfocyta T oraz wysoka ekspresja p-go sugeruje współwystępowanie tych białek lekooporności w rozrostach z linii limfocyta T.

4.5.2. Ekspresja białek lekooporności z typach NHL według klasyfikacji histologiczno-klinicznej.

4.5.2.1. Ekspresja p-gp

W grupie chłoniaków prekursorowych p-gp obecna była w 19 przypadkach (90.5%), w grupie NHL z dojrzałych limfocytów B w 17 przypadkach (70.8%) a w grupie chłoniaków anaplastycznych obecność p-gp stwierdzono u 7 pacjentów (77.8%). Oceniając ekspresję p-gp stwierdzono w większości przypadków wysoką ekspresję (ponad 75% komórek) we wszystkich grupach klinicznych – 14 z 19 przypadków w grupie NHL o typie prekursorowym (73.7%), 12 z 17 przypadków w grupie NHL z dojrzałych limfocytów B (70.6 %) i 5 z 7 przypadków w grupie NHL o typie anaplastycznym (71.4 %).

W ocenie intensywności barwienia obserwowano słabą intensywność w większości

przypadków w grupie NHL o typie prekursorowym (12 przypadków – 63.2%) oraz anaplastycznym (wszystkie 7 przypadków), podczas gdy w komórkach chłoniaków z dojrzałych limfocytów B przeważała intensywność silna – 9 z 17 przypadków (52.9%) (Ryc. 4.26 do 4.28).

4.5.2.2. Ekspresja MRP1

W grupie NHL o typie prekursorowym obecność MRP1 wykazano jedynie w 8 przypadkach (38.1%), natomiast w grupie NHL z dojrzałych limfocytów B w 23 przypadkach (95.8%) a w grupie NHL o typie anaplastycznym u wszystkich 9 badanych pacjentów.

U połowy pacjentów z grupy NHL o typie prekursorowym (4 przypadki) stwierdzano niską ekspresję badanego białka. W grupach NHL z dojrzałych limfocytów B i anaplastycznych białko to w większości przypadków było obecne na prawie wszystkich komórkach (ekspresja wysoka) - 18 przypadków (78.3%) i 7 przypadków (77.8%) odpowiednio.

W grupie NHL o typie prekursorowym obserwowano w większości słabą intensywność barwienia immunohistochemicznego – 5 przypadków (62.5%), podczas gdy w grupie NHL z dojrzałych limfocytów B oraz anaplastycznych dominowała intensywność silna i bardzo silna - 11 przypadków (47.8%) i 6 przypadków (66.7 %) odpowiednio (Ryc. 4.29 do 4.31).

4.5.2.3. Ekspresja LRP

W grupie NHL o typie prekursorowym obecność LRP stwierdzono u 20 z 21 pacjentów (95.2%), w grupie NHL z dojrzałych limfocytów B u 17 z 24 pacjentów (70.8%), natomiast w grupie NHL anaplastycznych we wszystkich 9 badanych przypadkach. We wszystkich grupach przeważała wysoka ekspresja badanego białka - 11 przypadków NHL o typie prekursorowym (55.0%), 10 przypadków NHL z dojrzałych limfocytów B (58.8%) oraz wszystkie 9 przypadków NHL o typie anaplastycznym.

W grupie NHL o typie prekursorowym oraz z dojrzałego limfocyta B przeważała słaba intensywność barwienia – 13 przypadków (65.0%) i 9 przypadków (53%) odpowiednio. W grupie NHL o typie anaplastycznym dominowała intensywność silna – 6 z 9 przypadków (66.7%) (Ryc. 4.32 do 4.34).

4.5.2.4. Ekspresja BCRP

W grupie NHL o typie prekursorowym obecność BCRP wykazano w 15 przypadkach (71.4%), w grupie NHL z dojrzałych limfocytów B w 23 przypadkach (95.8%), natomiast w grupie NHL o typie anaplastycznym w 8 z 9 przypadków (88.9%). We wszystkich grupach przeważała wysoka ekspresja badanego białka – 11 przypadków NHL o typie prekursorowym (73.3%), 20 przypadków NHL z dojrzałych limfocytów B (87.9%) oraz 6 przypadków NHL o typie anaplastycznym (75%).

W grupie NHL o typie prekursorowym przeważała słaba intensywność barwienia immunohistochemicznego – 9 przypadków (60.0%), w pozostałych 6 przypadkach była to intensywność silna. Natomiast, w grupie NHL z dojrzałego limfocyta B oraz w grupie NHL o typie anaplastycznym dominowała intensywność silna – 16 przypadków (69.6%) i 5 przypadków (62.5%) odpowiednio (Ryc. 4.35 do 4.37).

Zbiorcze porównanie ekspresji poszczególnych białek lekooporności z zależności typu histologiczno-klinicznego chłoniaka przedstawia (Ryc. 4.38.)

Zgodnie z fizjologicznym występowaniem molekuły p-gp na hematopoetycznych komórkach macierzystych w chłoniakach najwyższą jej ekspresję stwierdza się w postaciach prekursorowych. W miarę dojrzewania komórki spada ekspresja tego białka. Ponadto komórki chłoniaków o charakterystyce prekursorowej wykazują wysoką ekspresję LRP i BCRP, co wskazuje na współwystępującą (lub wzajemnie regulowaną) ekspresję z p-gp. W chłoniakach o typie anaplastycznym stwierdza się ekspresję wysoką MRP1 i LRP przy nieco niższej ekspresji pozostałych białek lekooporności. Chłoniaki z linii limfocyta B charakteryzują się wysoką ekspresją BCRP i MRP1.

4.6. Współwystępowanie białek lekooporności

We wszystkich analizowanych 54 przypadkach wykazano ekspresję przynajmniej dwóch spośród 4 badanych białek lekooporności. Równoczesne występowanie jedynie 2 białek lekooporności stwierdzano tylko w 7 przypadkach (13.0%), natomiast równoczesne występowanie 3 białek w 27 przypadkach (50.0%). Najczęściej spotykanymi kombinacjami były odpowiednio: MRP1 i BCRP (3 przypadki) oraz p-gp, LRP i BCRP (11 przypadków). W pozostałych 20 przypadkach (37.0%) stwierdzano występowanie wszystkich 4 badanych białek lekooporności (Tabela XV, XVI).

Istotnie statystycznie korelacje (współczynniki korelacji r Pearsona) wykazano

jedynie dla MRP1 i BCRP w grupie chłoniaków anaplastycznych (korelacja dodatnia) oraz dla MRP1 i BCRP w grupie chłoniaków prekursorowych (korelacja ujemna) (Tab XVIII).

Dodatkowo przeprowadzono analizę współwystępowania białek, których ekspresję określono jako „wysoką/pełną” (>75% komórek w badanym materiale) – najczęściej stwierdzano koekspresję 2 białek o wysokiej ekspresji (19 przypadków – 35.2%). Szczegółową analizę współwystępowania badanych białek przeprowadzono tylko dla grup histologiczno-klinicznych (Tabela XVII).

W grupie NHL o typie prekursorowym (21 przypadków) jednoczesną ekspresję dwóch badanych białek stwierdzano w 4 przypadkach (19%), a żadna z podwójnych kombinacji nie wystąpiła częściej niż 1 raz. Najczęściej występowała ekspresja 3 białek (14 przypadków – 66.7%), z czego aż 10 przypadków stanowiła kombinacja p-gp, LRP i BCRP, zaś u 4 pacjentów stwierdzono współwystępowanie p-gp, MRP1 i LRP. Obecność wszystkich badanych białek stwierdzono u 3 pacjentów (14.3%) z tej grupy. W przypadku białek, których ekspresję określono jako wysoką (>75% komórek), w badanej grupie najczęściej stwierdzano koekspresję 2 białek (11 przypadków – 52.4%), nie obserwowano ani jednego przypadku z wysoką ekspresją wszystkich badanych białek (Tabela XV, XVI, XVII).

W grupie NHL z dojrzałych limfocytów B współwystępowanie wszystkich 4 badanych białek stwierdzano w 11 przypadkach (45.8%) a 3 białek - w 10 przypadkach (41.7%). Dominowały kombinacje: p-gp, MRP1, BCRP oraz MRP1, LRP, BCRP (po 4 przypadki – 16.6%). Obecność dwóch białek wykazano jedynie w 3 przypadkach (12.5%) i była to wyłącznie kombinacja MRP1 i BCRP. W przypadkach pełnej ekspresji badanych białek (>75% badanych komórek), podobnie jak w grupie NHL o typie prekursorowym najczęściej wykazywano koekspresję 2 białek o wysokiej ekspresji (8 chorych – 33.3%), stwierdzono również 5 przypadków (20.8%) gdzie wszystkie badane białka wykazywały wysoką ekspresję (Tabela XV, XVI, XVII).

W grupie NHL o typie anaplastycznym wykazano równoczesną ekspresję wszystkich 4 badanych białek lekooporności w 6 przypadkach (66.7%), a obecność 3 białek stwierdzono u 3 badanych pacjentów (33.3%). W tym drugim przypadku stwierdzano obecność kombinacji MRP1, LRP i BCRP (2 przypadki) oraz p-gp, MRP1 i LRP (1 przypadek). Współwystępowanie pełnej ekspresji wszystkich badanych białek stwierdzono w 5 przypadkach (55.5%), oraz po 2 przypadki z pełną ekspresją 1 i 3 białek (Tabela XV, XVI, XVII).

W grupie chłoniaków prekursorowych stwierdzano najczęściej współwystępowanie 3 białek lekooporności, natomiast w chłoniakach o typie limfocyta B dojrzałego i anaplastycznych dominowało współwystępowanie wszystkich 4 białek lekooporności. Różnice w profilu białek lekooporności, nasileniu ekspresji tych białek wskazują na możliwość zróżnicowania odpowiedzi na stosowane leczenie i różnego stopnia lekooporności.

4.7. Zależność pomiędzy przebiegiem klinicznym a obecnością białek lekooporności

Przeprowadzono analizę zależności pomiędzy ekspresją białek lekooporności a przebiegiem klinicznym choroby z wyłączeniem 3 przypadków (po jednym z każdej grupy), w których po uzyskaniu remisji choroby nie prowadzono dalszej obserwacji pacjenta.

4.7.1 Ekspresja p-gp a przebieg kliniczny

W grupie NHL o typie prekursorowym ekspresję p-gp stwierdzano w 18 z 20 przypadków. W 17 przypadkach uzyskano remisję natomiast w jednym przypadku remisji nie udało się uzyskać. W tej grupie obserwowano wznowy w 4 przypadkach i zgon 4 pacjentów i w tych wszystkich przypadkach stwierdzano obecność p-gp.

W NHL z dojrzałych limfocytów B obecność p-gp stwierdzano w 16 z 23 przypadków, w tym we wszystkich 3 przypadkach, w których nie udało się uzyskać remisji. W grupie 20 przypadków, w których uzyskano remisję ekspresję p-gp wykazano jedynie z 13 przypadkach. Natomiast w 4 przypadkach, w których obserwowano wznowy i 8 przypadkach zakończonych zgonem ekspresję p-gp stwierdzano w 3 i 7 przypadkach odpowiednio.

W grupie NHL o typie anaplastycznym ekspresję p-gp notowano w 6 z 8 badanych przypadków. W 3 przypadkach nie udało się uzyskać remisji, a ekspresję p-gp obserwowano w 2 z nich. W tej grupie stwierdzono zgon 5 pacjentów, a ekspresję p-gp obserwowano tylko w 3 przypadkach zakończonych zgonem (Tabela XIX).

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy ekspresją p-gp a niepowodzeniem terapii (zgon) w grupie chłoniaków NHL-B. W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją p-gp a odpowiedzią na leczenie (uzyskanie remisji, czas do uzyskania remisji, wznowy) (współczynnik r Pearsona - Tabela XXIII).

4.7.2. Ekspresja MRP1 a przebieg kliniczny

W NHL o typie prekursorowym obecność MRP1 stwierdzono jedynie w 8 przypadkach z badanej grupy 20 przypadków. U wszystkich 8 pacjentów uzyskano remisję. Ogólnie, spośród 6 przypadków w badanej grupie zakończonych niepowodzeniem terapii tylko jeden z 6 pacjentów wykazywał ekspresję MRP1.

W grupie NHL-B MRP1 stwierdzano w 22 z 23 przypadków. U 20 pacjentów uzyskano remisję a ekspresję MRP1 stwierdzano w 19 przypadkach. Obecność MRP1 stwierdzano we wszystkich przypadkach, w których wystąpiło niepowodzenie terapii (brak uzyskania remisji – 3 przypadki, wznowa – 4 przypadki oraz zgon – 8 przypadków).

W NHL o typie anaplastycznym obecność MRP1 stwierdzano u wszystkich 8 pacjentów, a co za tym idzie we wszystkich przypadkach w których uzyskano remisję choroby jak i wystąpiło niepowodzenie terapeutyczne (Tabela XX).

W żadnym z przypadków nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją MRP1 a odpowiedzią na leczenie (uzyskanie remisji, czas do uzyskania remisji, wznowa, zgon) (współczynnik r Pearsona - Tabela XXIII).

4.7.3. Ekspresja LRP a przebieg kliniczny

W NHL o typie prekursorowym obecność LRP stwierdzano w 19 z 20 przypadków i w 18 z 19 przypadków, w których uzyskano remisję. W 1 przypadku, w którym nie udało się uzyskać remisji oraz 4 przypadkach wznów i 4 przypadkach zgonów obserwowano obecność LRP.

W NHL-B ekspresję LRP stwierdzano w 16 z 23 przypadków z czego w 13 z 20 w których uzyskano remisję. We wszystkich przypadkach, w których nie uzyskano remisji (3 przypadki), wystąpiła wznowa (4 przypadki) oraz zgon (8 przypadków) obserwowano obecność tego białka.

W grupie NHL o typie anaplastycznym, LRP stwierdzano u wszystkich 8 pacjentów, a w konsekwencji we wszystkich przypadkach w których uzyskano remisję

bądź wystąpiło niepowodzenie terapeutyczne (Tabela XXI).

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy ekspresją LRP a niepowodzeniem leczenia (zgon) w grupie chłoniaków NHL-B. W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją LRP a odpowiedzią na leczenie (uzyskanie remisji, czas do uzyskania remisji, wznowy) (współczynnik r Pearsona - Tabela XXIII).

4.7.4. Ekspresja BCRP a przebieg kliniczny

W NHL o typie prekursorowym obecność BCRP stwierdzano w 14 z 20 przypadków w tym w 13 z 19 przypadków, w których uzyskano remisję. We wszystkich 6 przypadkach niepowodzenia terapeutycznego (brak remisji, wznowa, zgon) obserwowano obecność LRP.

W NHL z dojrzałych limfocytów B obecność BCRP stwierdzano w 22 z 23 przypadków, w tym we wszystkich, w których uzyskano remisję (20 przypadków). W przypadkach, w których wystąpiło niepowodzenie terapeutyczne BCRP stwierdzano w 2 z 3 przypadków braku remisji, wszystkich (4 przypadki) wznów i w 7 z 8 przypadków zgonów.

W NHL o typie anaplastycznym ekspresję BCRP stwierdzano w 7 z 8 przypadków z tego w 4 z 5 przypadków, w których uzyskano remisję. W przypadkach niepowodzeń terapeutycznych obecność BCRP stwierdzano we wszystkich 3 przypadkach braku remisji, w 2 z 3 przypadkach wznów i 4 z 5 przypadków zgonów (Tabela XXII).

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy ekspresją BCRP a niepowodzeniem leczenia (zgon) w grupie chłoniaków prekursorowych. W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją tego białka a odpowiedzią na leczenie (uzyskanie remisji, czas do uzyskania remisji, wznowy) (współczynnik r Pearsona - Tabela XXIII)

4.7.5. Współwystępowanie białek lekooporności a przebieg kliniczny

W grupie NHL o typie prekursorowym w 4 przypadkach gdzie obserwowano współwystępowanie dwóch spośród badanych 4 białek, nie obserwowano ani jednego przypadku niepowodzenia terapii. Z kolei w 5 z 13 przypadków gdzie stwierdzono ekspresję 3 badanych białek wystąpiło niepowodzenie terapeutyczne (brak remisji, wznowa, zgon – 1, 3 i 3 przypadki odpowiednio). Wszystkie z tych przypadków

niepowodzenia terapeutycznego wystąpiły u pacjentów z kombinacją pgp, LRP i BCRP. Spośród 3 przypadków gdzie występowały wszystkie 4 badane białka, niepowodzenie leczenia obserwowano u jednego pacjenta (wznowa i zgon) (Tabela XXIV, XXV).

W grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B, w 3 przypadkach, gdzie stwierdzono obecność dwóch białek, nie zanotowano niepowodzenia terapeutycznego. Z kolei spośród 10 chorych, u których stwierdzono współwystępowanie 3 spośród badanych białek nieskuteczność terapii stwierdzono w 2 przypadkach (po jednym dla kombinacji pgp, MRP1 i LRP oraz MRP1, LRP, BCRP). Wśród 10 przypadków, gdzie stwierdzono współwystępowanie wszystkich 4 badanych białek, niepowodzenie leczenia obserwowano u 6 chorych (brak remisji, wznowa, zgon – 2, 3 i 6 przypadków odpowiednio) (Tabela XXVI, XXVII).

W grupie chłoniaków anaplastycznych występowały jedynie przypadki ze współwystępowaniem 3 lub 4 badanych białek. Wszystkie 3 przypadki gdzie obserwowano 3 spośród 4 badanych białek zakończyły się niepowodzeniem terapeutycznym (brak remisji, wznowa, zgon – 1, 2 i 3 przypadki odpowiednio). Natomiast wśród u 5 chorych gdzie stwierdzano współwystępowanie wszystkich 4 białek, niepowodzenie leczenia obserwowano w 3 przypadkach (brak remisji, wznowa, zgon – 2, 1 i 2 przypadki odpowiednio). (Tabela XXVIII, XXIX).

Analiza wszystkich 51 przypadków, w których przeprowadzono długoterminową obserwację bez uwzględnienia rodzaju chłoniaka nieziarniczego a jedynie efektu leczenia (remisja całkowita versus niepowodzenie terapii) i pełnej ekspresji białek lekooporności wykazała związek ekspresji białek p-gp i LRP z niepowodzeniami terapii (dane nie ujęte w tekście).

Powyższe dane wskazują na tendencję do występowania więcej niż 2 białek lekooporności oraz występowania skojarzenia występowania wszystkich badanych białek w anaplastycznej postaci chłoniaka. Może to stanowić jeden z czynników wpływających na wysoki odsetek niepowodzeń terapii w tym typie NHL.

Obecność 3 i 4 białek lekooporności stwierdzano w 21 przypadkach chłoniaka NHL-B co wskazuje na inne czynniki związane z niepowodzeniem leczenia niż obecność i aktywność białek lekooporności.

5. DYSKUSJA

5.1. Podsumowanie wyników własnych

Wśród chłoniaków wieku dziecięcego charakteryzujących się wysokim stopniem proliferacji, metabolizmu i szybkim przyrostem masy guza wyróżnia się typ prekursorowy, z dojrzałych limfocytów B i anaplastyczny w oparciu o stopień zróżnicowania i dojrzałości komórki rozrostowej. Wyżej wymienione typy chłoniaków wykazują różny przebieg kliniczny, różną lekowrażliwość, a w konsekwencji – odmienne rokowanie.

Na lekowrażliwość komórek rozrostowych układu hematopoetycznego wpływa wiele czynników między nimi: odsetek komórek znajdujących się w fazie pozaspoczynkowej (stopień proliferacji), ekspresja receptora dla hormonów sterydowych [79] oraz obecność i aktywność białek lekooporności [32, 33, 57, 80]. W chłoniakach nieziarniczych to ostatnie zjawisko było badane sporadycznie.

W przedstawionej pracy oceny ekspresji białek lekooporności w komórkach 54 przypadków chłoniaków nieziarniczych u dzieci uwzględniając podział kliniczny stwierdzono: największą ekspresję p-gp w komórkach chłoniaków prekursorowych, najsilniejszą ekspresję MRP1 oraz LRP w komórkach chłoniaków anaplastycznych, natomiast ekspresję BCRP w komórkach chłoniaków z dojrzałych limfocytów B. We wszystkich trzech typach chłoniaków nieziarniczych odsetek występowania poszczególnych białek przekraczał 70% badanych przypadków, z wyjątkiem MRP1 w chłoniakach prekursorowych, w których występowanie tego białka stwierdzono mniej niż w połowie przypadków. Wysoką ekspresję (obecność badanego białka na >75% komórek chłoniaka) poszczególnych białek stwierdzano w większości przypadków we wszystkich badanych typach chłoniaków nieziarniczych, za wyjątkiem MRP1 w grupie chłoniaków prekursorowych (ekspresja niska). W tej grupie chłoniaków przeważały chłoniaki z linii limfocyta T charakteryzujące się niską ekspresją MRP1. We wszystkich badanych przypadkach stwierdzono współwystępowanie minimum dwóch badanych białek lekooporności. W grupach chłoniaków z dojrzałych limfocytów B i chłoniakach anaplastycznych obserwowano najczęściej koekspresję wszystkich 4 badanych białek lekooporności. Uwzględniając ekspresję białek lekooporności, stopień zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania choroby oraz zastosowany schemat leczenia poddano analizie ekspresję białek lekooporności w celu określenia znaczenia klinicznego

ekspresji tych białek i ich wpływu na wyniki leczenia.

Całościowa analiza 51 przypadków (bez uwzględnienia typu chłoniaka) wpływu obecności poszczególnych białek na skuteczność terapii, określana jako wystąpienie tzw. niepowodzenia terapeutycznego wykazała związek pełnej ekspresji p-gp i LRP z niepowodzeniami terapii. Szczegółowa analiza z uwzględnieniem typów chłoniaka nieziarniczego (prekursorowy, dojrzały B, anaplastyczny) wykazała podobne zależności pomiędzy ekspresją białek lekooporności a efektem leczenia. Niewielka liczebność grup chorych z rozpoznaniem określonego typu chłoniaka (zwłaszcza anaplastycznego) może wpływać na ocenę tej zależności (np. pacjent z niepowodzeniem terapeutycznym mimo braku ekspresji białek lekooporności). Statystyczną zależność pomiędzy ekspresją pojedynczych określonych białek oporności wielolekowej a przebiegiem klinicznym choroby wykazano jedynie w grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B pomiędzy ekspresją p-gp i LRP i niepowodzeniem terapii (zgony) oraz pomiędzy obecnością BCRP a zgonami w grupie chłoniaków prekursorowych.

Ze względu na dobre wyniki leczenia w chłoniakach z dojrzałych limfocytów B i chłoniakach prekursorowych wydaje się, że białka lekooporności nie mają istotnego znaczenia klinicznego. Natomiast w chłoniakach anaplastycznych charakteryzujących się gorszymi wynikami leczenia białka lekooporności mogą być czynnikiem związanym z mniejszą wrażliwością na stosowaną terapię w tym typie chłoniaka nieziarniczego.

5.2. Znaczenie ekspresji p-gp w chłoniakach nieziarniczych

Obecność p-gp i kliniczne znaczenie ekspresji tej molekuly było szeroko badane w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci. Badano zarówno ekspresję samego białka, ekspresję genu MDR1 (obecność mRNA) jak i aktywność molekuly. Ekspresja p-gp w dziecięcych ALL była zróżnicowana (0-53%) i w większości nie przekraczała połowy badanych przypadków [34,81-85]. Obserwowano wyższą częstotliwość występowania p-gp w białaczkach limfoblastycznych z linii limfocyta T niż z linii limfocyta B [34, 86], aczkolwiek część badaczy takiej zależności nie wykazywała [87]. W wielu doniesieniach o obecności i znaczeniu p-gp dla wyników leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej nie uwzględniane są linie pochodzenia komórek białaczkowych i białaczki z linii limfocyta B oraz linii limfocyta T są rozpatrywane łącznie [88]. W innych badaniach aktywność molekuly p-gp w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci wykazano w mniejszym odsetku przypadków aniżeli obecność tego białka (ekspresja)

[85, 88].

Kliniczne znaczenie obecności i aktywności tej molekuly w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci nie zostało jednoznacznie udowodnione [87, 89, 90].

Obserwowano wzrost odsetka przypadków z ekspresją p-gp u pacjentów ze wznową choroby w porównaniu do fazy ostrej białaczki [70, 71, 84, 91], jednakże istnieją również obserwacje nie potwierdzające tej obserwacji [92, 93]. W części badań wykazano związek pomiędzy ekspresją p-gp a wynikami leczenia. U pacjentów, u których udało się uzyskać całkowitą remisję choroby obserwowano znacznie niższą ekspresję i aktywność tego białka w porównaniu do komórek białaczkowych pacjentów, u których nie udało się uzyskać całkowitej remisji [94]. Obserwowano również dłuższy czas przeżycia wolnego od zdarzeń (EFS – Event Free Survival) pacjentów których komórki białaczkowe nie wykazywały ekspresji p-gp [71, 83, 88].

Stwierdzana u naszych pacjentów wysoka ekspresja p-gp w prekursorowym typie chłoniaka nieziarniczego z linii limfocyta T jest zgodna z obserwacjami w ostrych białaczkach limfoblastycznych z tej samej linii komórkowej [34, 64, 84, 90, 95].

Niewiele jest danych dotyczących badania ekspresji i znaczenia klinicznego p-gp w chłoniakach nieziarniczych. Badania ekspresji p-gp dotyczyły głównie grupy dorosłych chorych z rozsianą postacią chłoniaka z limfocytów B (DLBCL). U pacjentów z DLBCL ekspresja tej molekuly była związana z niższym odsetkiem przypadków w których uzyskano pełną remisję chłoniaka [74]. W przedstawionych wynikach własnych ekspresja p-gp była również związana z niepowodzeniem terapii w grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B co jest zgodne z obserwacjami w DLBCL. Ponadto wykazano, że niska ekspresja p-gp w połączeniu z niską ekspresją innego białka GPX1 (peroksydaza glutationu 1) wiązała się z mniejszym odsetkiem wczesnych wznów i dłuższym całkowitym przeżyciem. [75]. Istnieją również badania, w których wykazano brak związku ekspresji molekuly p-gp z wynikami leczenia w tym typie chłoniaka nieziarniczego (DLBCL), natomiast wskazuje się na znaczenie innych mechanizmów lekooporności związanych z indukcją apoptozy (ekspresja Bcl-2 i Tp53) [96].

5.3. Ekspresja MRP1 w chłoniakach nieziarniczych i jej znaczenie

Istnieje szereg danych dotyczących ekspresji MRP1 i jej znaczenia klinicznego w rozrostach nowotworowych pochodzenia limfocytarnego. Podobnie jak w przypadku p-gp badania dotyczą głównie ostrych białaczek. Większość badań MRP1 opierała się

o wykazanie obecności genu dla tego białka, co nie jest jednoznaczne z aktywnością molekuly obecnej w komórce [66]. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano związku pomiędzy ekspresją genu MRP1 a efektami leczenia ocenianymi przeżyciem bez zdarzeń (EFS) oraz przeżyciem całkowitym (OS) [97, 98]. Nie wykazano również zwiększonej ekspresji genu MRP1 u pacjentów ze wznową choroby [93, 97]. Istnieją pojedyncze doniesienia, w których wykazano, że ekspresja MRP1 jak i innych białek z tej podrodziny (MRP2, MRP3, MRp5 i MRP6) wiąże się z wyższym ryzykiem wznowy jak i krótszym okresem remisji [65]. W większości tych badań nie uwzględniano linii pochodzenia komórek białaczkowych poza obserwacją w której wykazano wysoką ekspresję w białaczkach z linii limfocyta B a brak tej ekspresji w białaczkach z linii limfocyta T [99].

Badania prowadzone w chłoniakach nieziarniczych są sporadyczne a dotyczyły DLBCL u dorosłych jako chłoniaka o złym rokowaniu [74] oraz chłoniaków z dojrzałych limfocytów T/NK [76]. Ekspresja MRP1 w DLBCL wahała się pomiędzy 44% a 68%, natomiast dane dotyczące klinicznego znaczenia ekspresji tej molekuly były niejednoznaczne. Wykazano, że ekspresja MRP1 wiązała się z niższym prawdopodobieństwem uzyskania całkowitej remisji choroby [74], aczkolwiek istnieją również obserwacje wykazujące brak związku ekspresji MRP1 z wynikami leczenia [73]. W chłoniaku z dojrzałych limfocytów T/NK ekspresja MRP1 wynosiła 74% ale znaczenie kliniczne nie było badane [76].

W przedstawionych badaniach własnych wykazano, że brak ekspresji molekuly MRP1 jest związany z pochodzeniem komórek chłoniaka prekursorowego z linii limfocyta T. Jest to zgodne z obserwacjami braku lub niskiej ekspresji na komórkach białaczkowych z linii limfocyta T [99]. Wykazana wysoka ekspresja na komórkach chłoniaka z dojrzałych limfocytów T/NK [76] może być wynikiem stopnia dojrzałości tych komórek oraz komponentą pochodzącą z linii komórek NK.

5.4. Ekspresja LRP i jej znaczenie kliniczne

Podobnie jak w przypadku p-gp i MRP1 większość danych dotyczących ekspresji LRP i jej znaczenia klinicznego w rozrostach nowotworowych pochodzenia limfocytarnego u dzieci pochodzi z badań ostrych białaczek limfoblastycznych. Większość badań nie wykazała różnicy pomiędzy ekspresją tego białka przed leczeniem a w czasie wznowy choroby [93, 97], chociaż istnieją dane wykazujące wyższy odsetek ekspresji tego

białka w komórkach białaczkowych pochodzących ze wznowy [100]. W ostrych białaczkach limfoblastycznych wykazano wysoką ekspresję LRP w prekursorowych postaciach z linii limfocyta B i była ona wyższa aniżeli w postaciach z linii limfocyta T [93, 99] stwierdzono ponadto wyższy poziom ekspresji tej molekuly we wczesnych prekursorowych postaciach ALL (pro-B ALL) niż w postaciach bardziej dojrzałych (common/pre-B ALL). Kliniczne znaczenie dla wyników leczenia nie jest jednoznaczne [66]. Wykazano, że u pacjentów u których nie obserwuje się ekspresji tego białka okres remisji trwał znacznie dłużej (relapse-free intervals) [100]. Ponadto, wykazano wyższe ryzyko niepowodzenia terapii (wznowa lub zgon) u pacjentów z wysoką ekspresją LRP stwierdzaną przed rozpoczęciem leczenia [98].

Dane dotyczące roli LRP w chłoniakach nieziarniczych są sporadyczne i dotyczą jedynie chłoniaków u dorosłych. W chłoniakach nieziarniczych ekspresję LRP opisywano głównie w DLBCL i była zmienna (23% - 68%). Wykazano natomiast związek pomiędzy obecnością LRP a niższym odsetkiem uzyskania całkowitych remisji oraz krótszym okresem przeżycia pacjentów [73, 74]. W przedstawionych własnych wynikach badań u dzieci ekspresję LRP stwierdzano we wszystkich badanych typach chłoniaka nieziarniczego i wynosiła ona ponad 70% badanych przypadków w każdym typie chłoniaka i była statystycznie istotnie skorelowana z niepowodzeniami terapii (zgony) w grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B. W oparciu o wyniki badań w DLBCL i własne wyniki z grupy chłoniaków B komórkowych można sugerować, iż LRP wpływa istotnie na wyniki leczenia w tych chłoniakach nieziarniczych u dzieci.

5.5. Ekspresja BCRP i jej znaczenie kliniczne

W badaniach ekspresji BCRP w komórkach ostrych białaczek limfoblastycznych wykazano wyższą ekspresję na komórkach białaczkowych z linii limfocyta B aniżeli z linii limfocyta T [101, 102], ale nie wykazano związku z wynikami leczenia [101] mimo, że aktywność BCRP w stosunku do leków stosowanych w trudniejszych przypadkach ostrych białaczek limfoblastycznych może indukować lekooporność. Brakuje natomiast w literaturze danych dotyczących ekspresji BCRP w chłoniakach nieziarniczych.

W przedstawionej pracy stwierdzono ekspresję BCRP we wszystkich badanych typach chłoniaków nieziarniczych na więcej niż 70% badanych przypadków. Wykazano również związek pomiędzy wysoką ekspresją BCRP a niepowodzeniami terapii. Może to

sugerować, iż obecność a przede wszystkim aktywność BCRP jest czynnikiem złego rokowania.

Dla BCRP substratem jest mitoksantron, który ma niewielkie zastosowanie w terapii nieziarniczych chłoniaków u dzieci. W tej sytuacji wydawałoby się, że obecność tej molekuly wobec braku substratu nie może mieć znaczenia klinicznego. Wykazano jednak, że BCRP jest aktywna również wobec takich leków jak antacykliny i metotreksat [45], a więc leków wykorzystywanych w leczeniu. Wydaje się, że znaczenie kliniczne aktywności tej molekuly może polegać nie na bezpośrednim działaniu obniżającym stężenie leku w komórce, ale na poszerzeniu mechanizmów oporności na metotreksat i antracykliny [45].

5.6. Współwystępowanie białek lekooporności i znaczenie kliniczne.

W przedstawionych wynikach badań w większości przypadków chłoniaków nieziarniczych u dzieci komórki chłoniakowe wykazywały obecność więcej niż jednego, a w znacznym odsetku więcej niż 2-ch białek lekooporności co wskazuje na możliwość współdziałania kilku mechanizmów obniżania wewnątrzkomórkowego stężenia leków. Występowanie białek lekooporności w postaciach chłoniaków o dobrej wrażliwości na leczenie (Burkitt/Burkitt like) i gorszej klinicznej odpowiedzi na terapię (typ anaplastyczny) wskazują na złożony mechanizm powstawania lekooporności. Aktywność białek jest tylko częściowo odpowiedzialna za zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia leku a mechanizmy naprawcze komórek, modyfikacje stężeń i aktywności enzymów, podatność na indukcję apoptozy (regulację poprzez biała związane z apoptozą) wpływają również na możliwość powstania komórek opornych, co stanowi zagrożenie wznową procesu rozrostowego. Dobra odpowiedź na leczenie może być również wynikiem stosowania leków nie będących substratami dla badanych białek np. hormonów kory nadnerczy (sterydów). W chłoniakach z dojrzałych limfocytów B i białaczkach z prekursorów limfocytów B sterydy są stosowane w wysokich dawkach a mechanizm ich działania polega na indukcji apoptozy poprzez cytoplazmatyczny receptor [103, 104, 105]. W przypadku chłoniaka z dojrzałych limfocytów B odsetek komórek proliferujących wynosi ponad 95% co w sposób zasadniczy zwiększa efektywność leków hamujących proliferację [14]. Wysoki wskaźnik proliferacji w połączeniu z ekspresją receptorów sterydowych powoduje, że obecność p-gp podobnie jak i innych ABC transporterów na

komórkach tych chłoniaków nie ma wielkiego znaczenia dla efektu chemioterapii. Natomiast w sytuacji znacznego zaawansowania klinicznego chłoniaka, obecności innych czynników utrudniających zastosowanie pełnego schematu leczenia, komplikacji po leczeniu ekspresja białek lekooporności będzie dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko niepowodzenia terapii i zgonu pacjenta.

Ekspresja receptora sterydowego na komórkach białaczkowych z linii limfocyta T jest niższa w porównaniu do komórek białaczkowych z linii limfocyta B co może być związane z gorszą odpowiedzią na sterydy w tych postaciach białaczek zwłaszcza leczonych mniej agresywnymi schematami terapeutycznymi [103]. Ekspresja kilku białek oporności wielolekowej na komórkach chłoniaków o niższym wskaźników proliferacyjnym (np. typ anaplastyczny) może mieć o tyle mniejsze znaczenie, że stosowane leki działają na komórki w stadium pozaspoczynkowym a te mogą, ale nie muszą wykazywać ekspresji białek oporności wielolekowej. W sytuacji pełnej ekspresji tych białek na komórkach podziałowych ryzyko oporności jest znaczne i wpływ aktywności tych białek na efekty końcowe leczenia będzie widoczny. Wydaje się, że taki obraz występuje szczególnie w chłoniakach typu anaplastycznego. W badanym materiale można było zaobserwować komórki podziałowe w typie anaplastycznym chłoniaka nieziarniczego wykazujące ekspresję MRP1, BCRP i LRP, co wskazuje na „ochronę” komórek dzielących się przed działaniem cytotoksycznym stosowanych leków.

Na podstawie badań można sugerować, iż w postaciach chłoniaków anaplastycznych oznaczenie obecności białek lekooporności będzie wskazywało na potencjalną oporność wobec stosowanej terapii.

Wydaje się, więc że istotna rola kliniczna białek lekooporności w przypadku chłoniaków nieziarniczych polega nie tyle na bezpośrednim hamowaniu regresji guza pierwotnego pod wpływem leczenia indukcyjnego, ale na ułatwieniu przeżycia nielicznym komórkom chłoniakowym stanowiących zagrożenie wznową procesu chorobowego. W oparciu o te wyniki wydaje się, że oznaczanie obecności białek lekooporności w trudnych postaciach chłoniaków nieziarniczych (typ anaplastyczny) oraz poszukiwanie choroby resztkowej w okresie pełnej remisji chłoniaka jest uzasadnione i może podobnie jak w ostrych białaczkach pozwolić na wyselekcjonowanie grupy pacjentów o wysokim zagrożeniu wznową.

6. WNIOSKI

1. W ocenie obecności białek lekooporności istotny jest odsetek komórek chłoniaka wykazujących obecność danego białka (ekspresja).
2. W komórkach chłoniaków nieziarniczych stwierdza się występowanie więcej niż jednego białka związanego z mechanizmami lekooporności, co sugeruje możliwość aktywacji różnych mechanizmów oporności wielolekowej w tej samej komórce.
3. W komórkach chłoniaków pochodzących z linii limfocyta T stwierdza się wysoka ekspresję p-gp, LRP i BCRP, natomiast w chłoniakach z linii limfocyta B występują wszystkie badane białka oporności wielolekowej.
4. W chłoniakach o typie prekursorowym i chłoniakach z dojrzałych limfocytów B wysoka ekspresja białek lekooporności jest związana z niepowodzeniem terapii.
5. W postaci chłoniaka anaplastycznego stwierdza się ekspresję wszystkich badanych białek lekooporności i ta wydaje się mieć znaczenie czynnika pogarszającego efekty leczenia.

7. STRESZCZENIE

Chłoniaki (lymphoma) stanowią trzecią pod względem częstości występowania grupę nowotworów wieku dziecięcego, z czego większość stanowią chłoniaki nieziarnicze (NHL). Ze względu na histologię, przebieg kliniczny oraz schemat leczenia, u dzieci wyróżnia się trzy podstawowe grupy chłoniaków nieziarniczych: chłoniaki prekursorowe, chłoniaki z dojrzałych (obwodowych) limfocytów B oraz chłoniaki anaplastyczne. Pomimo postępu w terapii, wciąż nie udaje się uzyskać wyleczeń wszystkich przypadków, szczególnie w grupie chłoniaków anaplastycznych, gdzie długotrwałe przeżycie osiąga jedynie około 60% przypadków.

Niepowodzenie leczenia przeciwnowotworowego wiąże się między innymi z obecnością mechanizmów lekooporności (MDR) w komórkach nowotworowych. Celem badań było określenie obecności białek związanych z MDR takich jak p-gp, MRP1, LRP i BCRP w komórkach trzech typów chłoniaków nieziarniczych występujących w wieku dziecięcym, określenie wzajemnej zależności ich ekspresji, związku pomiędzy ich ekspresją a linią pochodzenia chłoniaka (immunofenotypem) oraz ich znaczenia dla odpowiedzi na leczenie i długotrwałego przeżycia chorych.

Analizę ekspresji białek oporności wielolekowej przeprowadzono za pomocą metod immunohistochemicznych. Ekspresję badanych białek MDR stwierdzano we wszystkich badanych typach NHL. Ekspresję p-gp stwierdzano najczęściej w grupie chłoniaków prekursorowych (90.5% przypadków), ekspresję MRP1 i LRP w grupie chłoniaków anaplastycznych (100% przypadków) zaś ekspresję BCRP w grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B (95.8% przypadków). We wszystkich trzech typach NHL odsetek występowania poszczególnych białek przekraczał 70% badanych przypadków za wyjątkiem MRP1 w grupie chłoniaków prekursorowych gdzie występowanie tego białka stwierdzono jedynie w 38.1% przypadków. Wysoką ekspresję (obecność badanego białka na >75% komórek chłoniaka) stwierdzano w większości przypadków we wszystkich badanych typach NHL, za wyjątkiem MRP1 w grupie chłoniaków prekursorowych gdzie dominowała ekspresja niska (10-40% komórek chłoniaka). We wszystkich badanych grupach stwierdzono współwystępowanie minimum dwóch badanych białek MDR. W grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B oraz chłoniaków anaplastycznych obserwowano najczęściej koekspresję wszystkich 4 badanych białek (45.8% oraz 66.6% przypadków odpowiednio). Istotnie statystycznie korelacje pomiędzy

współwystępowaniem poszczególnych białek wykazano jedynie dla MRP1 i BCRP w grupie chłoniaków anaplastycznych (korelacja dodatnia) oraz dla MRP1 i BCRP w grupie chłoniaków prekursorowych (korelacja ujemna). Analiza związku pomiędzy ekspresją poszczególnych białek a skutecznością terapii wykazała statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją p-gp i LRP a niepowodzeniem terapeutycznym (zgon) w grupie chłoniaków nieziarniczych z dojrzałych limfocytów B oraz pomiędzy ekspresją BCRP a zgonami w grupie chłoniaków prekursorowych. Nie wykazano zależności pomiędzy obecnością MRP1 a przebiegiem klinicznym choroby w żadnej grupie dziecięcych NHL.

Na podstawie tych badań wydaje się, że w przypadku niepowodzenia terapii obecność białek MDR jest dodatkowym niekorzystnym czynnikiem a szczególnie dotyczy to chłoniaków o typie anaplastycznym.

8. ABSTRACT

Lymphomas represent a third group of neoplasms occurring in childhood based on their frequency and prevalence. Most of them are Non-Hodgkin's Lymphomas (NHL). Depending on their histology, course of disease and treatment regimen three main types of NHLs in children are described: precursor-cell lymphomas, mature (peripheral) B-cell lymphomas and anaplastic large cell lymphomas. Despite of aggressive therapy including surgery, chemotherapy the results are still unsatisfactory especially in anaplastic large cells lymphoma (DFS about 60% of patients).

Among different factors the presence and activity of multidrug resistance molecules (MDR) are related to failure of anti-cancer therapy. The purpose of this study was analysis of presence of multi-drug resistance proteins such as p-gp, MRP1, LRP and BCRP and association with lymphoma type, immunophenotype of lymphoma cells and therapy results of in children.

The expression of multidrug resistance proteins in all studied types of childhood NHL was assayed with immunohistochemistry. The p-gp expression was noted in majority of precursor-cell lymphomas cases (90.5%), MRP1 and LRP in anaplastic large cell lymphoma cases (100%) and BCRP in mature B-cells lymphoma cases (95.8%). The MRP1 expression in precursor-cell lymphomas was low and did not exceed 40% of cases. A high expression rate (protein found in >75% of lymphoma cells) was noted in most cases in studied NHL types. The expression of MRP1 in precursor cell lymphomas was low and did not exceed 40% of lymphoma cells. A co-expression of at least two drug resistance proteins was observed in all types of lymphomas. A co-expression of all 4 given proteins was noted in mature B-cells lymphomas and anaplastic large cell lymphomas (45.8% and 66.6% of cases respectively). Statistically significant correlation between the co-expression of MDR proteins was observed for MRP1 and BCRP in anaplastic large cell lymphoma (positive correlation) and for MRP1 and BCRP in precursor cell lymphoma (negative correlation). The association between expression of given MDR proteins and therapy results showed a statistically significant positive correlation between treatment failure (death) in: mature B cell lymphoma and p-gp, LRP and precursor cell lymphoma and

BCRP.

The expression of MDR proteins was associated with therapy failure in precursor and mature B cell type of lymphoma. In anaplastic large cell lymphoma the high expression of all given MDR proteins seems to be associated with poor therapy results.

9. WYKAZ PODSTAWOWYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY:

ABC Transporters (ATP-Binding Cassette Transporters) – transportery zawierające domenę wiążącą ATP

ALAT - Aminotransferaza alaninowa

ALCL (Anaplastic Large Cell Lymphoma) – chłoniak anaplastyczny z dużych komórek

ALK - Anaplastic Lymphoma Kinase

ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) – ostra białaczka limfoblastyczna

ASPAT - Aminotransferaza asparaginianowa

BCRP - Breast Cancer Resistance Protein

DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) – chłoniak rozlany z dużych limfocytów B

EBV (Epsteina-Baar Virus) – wirus Epsteina-Baar

EFS (Event Free Survival) – czas przeżycia wolny od zdarzeń

FITC (Fluorescein Isothiocyanate) - fluoresceina

GSH – glutation

GST – transferaza S-glutationu

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

LRP - Lung Resistance Protein

MRP1 - Multidrug Resistance-Associated Protein 1

MVP - Major Vault Protein

NHL (Non-Hodgkin Lymphoma) – chłoniak nieziarniczy

OB – odczyn Biernackiego

OS (Overall Survival) – całkowite przeżycie

PBS (Phosphate Buffered Saline) – bufor fosforanowy

p-gp (permeability-related glycoprotein) – glikoproteina p

PE (Phycoerythrin) – fikoerytryna

PerCP - peridinin chlorophyll protein

REAL - Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms

TBS (Tris Buffered Saline) - bufor Tris

TdT - terminalna transferaza deoksyrybonukleotydowa

10. SPIS TABEL:

TABELA I.	Ogólna charakterystyka grupy badanej
TABELA II.	Charakterystyka grupy badanej - parametry laboratoryjne
TABELA III.	Charakterystyka grupy badanej - przebieg kliniczny
TABELA IV.	Immunofenotypowa charakterystyka chłoniaków z linii limfocyta T
TABELA V.	Immunofenotypowa charakterystyka chłoniaków z linii limfocyta B
TABELA VI.	Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z limfocytów prekursorowych
TABELA VII.	Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z dojrzałych limfocytów B
TABELA VIII.	Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi anaplastycznymi
TABELA IX.	Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z prekursorowych limfocytów T i B
TABELA X.	Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z dojrzałych limfocytów B
TABELA XI.	Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi anaplastycznymi
TABELA XII.	Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych prekursorowych
TABELA XIII.	Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych z dojrzałych limfocytów B
TABELA XIV.	Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych anaplastycznych
TABELA XV.	Współwystępowanie białek lekooporności w komórkach poszczególnych typów NHL
TABELA XVI.	Współwystępowanie (szczegółowe) białek lekooporności w komórkach poszczególnych typów NHL
TABELA XVII.	Współwystępowanie białek lekooporności w komórkach

poszczególnych typów NHL (pełna ekspresja)

TABELA XVIII. Korelacje r Pearsona między występowaniem białek lekooporności dla poszczególnych typów NHL

TABELA XIX. Ekspresja p-gp a przebieg kliniczny w poszczególnych typach NHL

TABELA XX. Ekspresja MRP1 a przebieg kliniczny w poszczególnych typach NHL

TABELA XXI. Ekspresja LRP a przebieg kliniczny w poszczególnych typach NHL

TABELA XXII. Ekspresja BCRP a przebieg kliniczny w poszczególnych typach NHL

TABELA XXIII. Korelacje r Pearsona między występowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym dla poszczególnych typów NHL

TABELA XXIV. Zależność między współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym w grupie chłoniaków prekursorowych

TABELA XXV. Szczegółowa zależność między współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym w grupie chłoniaków prekursorowych

TABELA XXVI. Zależność między współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym w grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B

TABELA XXVII. Szczegółowa zależność między współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym w grupie chłoniaków z dojrzałych limfocytów B

TABELA XXVIII. Zależność między współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym w grupie chłoniaków anaplastycznych

TABELA XXIX. Szczegółowa zależność między współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym w grupie chłoniaków anaplastycznych

11. SPIS RYCIN:

- Ryc. 1.** Obecność p-gp w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 2.** Ilościowa ocena obecności p-gp w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 3.** Intensywność ekspresji p-gp w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 4.** Obecność p-gp w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 5.** Ilościowa ocena obecności p-gp w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 6.** Intensywność ekspresji p-gp w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 7.** Obecność MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 8.** Ilościowa ocena obecności MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 9.** Intensywność ekspresji MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 10.** Obecność MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 11.** Ilościowa ocena obecności MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 12.** Intensywność ekspresji MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie B- komórkowym
- Ryc. 13.** Obecność LRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 14.** Ilościowa ocena obecności LRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 15.** Intensywność ekspresji LRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 16.** Obecność LRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 17.** Ilościowa ocena obecności LRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym

- Ryc. 18.** Intensywność ekspresji LRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 19.** Obecność BCRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 20.** Ilościowa ocena obecności BCRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 21.** Intensywność ekspresji BCRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym
- Ryc. 22.** Obecność BCRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 23.** Ilościowa ocena obecności BCRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 24.** Intensywność ekspresji BCRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym
- Ryc. 25.** Występowanie białek oporności wielolekowej w zależności od immunofenotypu chłoniaka (NHL–T, NHL–B)
- Ryc. 26.** Obecność p-gp w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 27.** Ilościowa ocena obecności p-gp w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 28.** Intensywność ekspresji p-gp w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 29.** Obecność MRP1 w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 30.** Ilościowa ocena obecności MRP1 w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 31.** Intensywność ekspresji MRP1 w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 32.** Obecność LRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 33.** Ilościowa ocena obecności LRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 34.** Intensywność ekspresji LRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 35.** Obecność BCRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 36.** Ilościowa ocena BCRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 37.** Intensywność ekspresji BCRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka
- Ryc. 38.** Występowanie białek oporności wielolekowej w zależności od typu klinicznego chłoniaka

12. SPIS FOTOGRAFII:

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – p-gp (1)

Fot. 1. p-gp: kontrola pozytywna, nerka: ekspresja p-gp w kanalikach nerkowych

Fot. 2. p-gp: kontrola negatywna, nerka: brak ekspresji p-gp w kłębuszkach nerkowych

Fot. 3. p-gp: intensywność ekspresji +, NHL-B, pacjent nr 42

Fot. 4. p-gp: intensywność ekspresji ++, NHL-B, pacjent nr 33

Fot. 5. p-gp: intensywność ekspresji +++, NHL-B, pacjent nr 37

Fot. 6. p-gp: intensywność ekspresji +++, DLBCL, pacjent nr 25

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – p-gp (2)

Fot. 7. p-gp: brak ekspresji –, precursor NHL-T, pacjent nr 15

Fot. 8. p-gp: intensywność ekspresji +, precursor NHL-T, pacjent nr 8

Fot. 9. p-gp: intensywność ekspresji ++, mature NHL-T, pacjent nr 3

Fot. 10. p-gp: intensywność ekspresji ++, precursor NHL-T, pacjent nr 1

Fot. 11. p-gp: intensywność ekspresji +, ALCL, pacjent nr 46

Fot. 12. p-gp: intensywność ekspresji +, ALCL, pacjent nr 51

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – MRP1(1)

Fot. 13. MRP1: kontrola pozytywna, nerka: ekspresja MRP1 w kanalikach nerkowych

Fot. 14. MRP1: kontrola negatywna, nerka: brak ekspresji MRP1 w kłębuszku nerkowym

Fot. 15. MRP1: intensywność ekspresji +, precursor NHL-B, pacjent nr 44

Fot. 16. MRP1: intensywność ekspresji ++, DLBCL, pacjent nr 35

Fot. 17. MRP1: intensywność ekspresji +++, NHL-B, pacjent nr 27

Fot. 18. MRP1: brak ekspresji -, precursor NHL-T, pacjent nr 1

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – MRP1(2)

- Fot. 19.** MRP1: intensywność ekspresji +, precursor NHL-T, pacjent nr 8
- Fot. 20.** MRP1: intensywność ekspresji ++, precursor NHL-T, pacjent nr 7
- Fot. 21.** MRP1: intensywność ekspresji +, ALCL, pacjent nr 50
- Fot. 22.** MRP1: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 46
- Fot. 23.** MRP1: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 51
- Fot. 24.** MRP1: intensywność ekspresji +++, ALCL, pacjent nr 53

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – LRP (1)

- Fot. 25.** LRP: kontrola pozytywna, nerka : ekspresja LRP w kanalikach nerkowych
- Fot. 26.** LRP: kontrola negatywna, nerka: brak ekspresji LRP w kłębuszku nerkowym
- Fot. 27.** LRP: intensywność ekspresji +, NHL-B, pacjent nr 24
- Fot. 28.** LRP: intensywność ekspresji ++, NHL-B, pacjent nr 37
- Fot. 29.** LRP: intensywność ekspresji ++, NHL-B, pacjent nr 39
- Fot. 30.** LRP: intensywność ekspresji +++, NHL-B, pacjent nr 29

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – LRP (2)

- Fot. 31.** LRP: intensywność ekspresji +, precursor NHL-T, pacjent nr 5
- Fot. 32.** LRP: intensywność ekspresji ++, precursor NHL-T, pacjent nr 17
- Fot. 33.** LRP: intensywność ekspresji +++, precursor NHL-T, pacjent nr 1
- Fot. 34.** LRP: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 50
- Fot. 35.** LRP: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 54
- Fot. 36.** LRP: intensywność ekspresji +++, ALCL, pacjent nr 51

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – BCRP(1)

- Fot. 37.** BCRP: kontrola pozytywna, Łożysko: ekspresja BCRP w komórkach syncytiotrofoblastu
- Fot. 38.** BCRP: kontrola negatywna, Łożysko: brak ekspresji BCRP w komórkach cytotrofoblastu
- Fot. 39.** BCRP: intensywność ekspresji +, NHL-B, pacjent nr 28
- Fot. 40.** BCRP: intensywność ekspresji ++, NHL-B, pacjent nr 21
- Fot. 41.** BCRP: intensywność ekspresji +++, NHL-B, pacjent nr 37
- Fot. 42.** BCRP: intensywność ekspresji +, prekursor NHL-T, pacjent nr 14

Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych u dzieci – BCRP(2)

Fot. 43. BCRP: intensywność ekspresji + , prekursor NHL-T, pacjent nr 1

Fot. 44. BCRP: intensywność ekspresji ++, prekursor NHL-T, pacjent nr 17

Fot. 45. BCRP: intensywność ekspresji +, ALCL, pacjent nr 50

Fot. 46. BCRP: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 47

Fot. 47. BCRP: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 54

Fot. 48. BCRP: intensywność ekspresji ++, ALCL, pacjent nr 46

13. LITERATURA:

1. Sandlund JT, Downing JR, Crist WM.: *Non-Hodgkin's lymphoma in childhood*. N Engl J Med. 1996; 334: 1238-1248
2. Perkins SL.: *Work-up and diagnosis of pediatric non-Hodgkin's lymphomas*. Pediatr Dev Pathol. 2000; 3: 374-390
3. Shukla NN, Trippett TM.: *Non-Hodgkin's lymphoma in children and adolescents*. Curr Oncol Rep. 2006; 8: 387-394
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD.: [The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November, 1997.](#) Hematol J. 2000; 1:53-66.
5. Stachura J, Domagała W.: *Patologia znaczy słowo o chorobie* tom II, rozdział 15. Polska Akademia Umiejętności, 2005
6. Gross TG, Termuhlen AM.: *Pediatric non-Hodgkin's lymphoma*. Curr Oncol Rep. 2007; 9: 459-465
7. Reiter A.: *Diagnosis and treatment of childhood non-Hodgkin is lymphoma*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007; 2007: 285-296.
8. Shad A, Magrath I.: *Non-Hodgkin's lymphoma*. Pediatr Clin North Am. 1997; 44: 863-890
9. Ferry JA.: *Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis*. Oncologist. 2006; 11: 375-83
10. Cairo MS, Raetz E, Lim MS, Davenport V, Perkins SL.: *Childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma: new insights in biology and critical challenges for the future*. Pediatr Blood Cancer. 2005; 45: 753-769.
11. Burkhardt B, Zimmermann M, Oschlies I, Niggli F, Mann G, Parwaresch R, Riehm H, Schrappe M, Reiter A; BFM Group.: *The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence*. Br J Haematol. 2005; 131: 39-49
12. Murphy SB.: [Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults](#). Semin Oncol. 1980;

7: 332-339

13. Attarbaschi A, Dworzak M, Steiner M, Urban C, Fink FM, Reiter A, Gadner H, Mann G: [Outcome of children with primary resistant or relapsed non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell leukemia after intensive first-line treatment: a population-based analysis of the Austrian Cooperative Study Group](#). *Pediatr Blood Cancer*. 2005; 44: 70-76
14. Patte C.: *Treatment of mature B-ALL and high grade B-NHL in children*. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003; 15: 695-711
15. Lehnert M.: *Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem*. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 912-920
16. Giaccone G, Pinedo HM.: *Drug resistance* . *Oncologist* 1996; 1: 82-87
17. Stavrovskaya AA.: *Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells* *Biochemistry (Mosc)*. 2000; 65: 95-106
18. Gottesman MM.: *Mechanisms of cancer drug resistance*. *Annu Rev Med*. 2002; 53: 615-627
19. Longley DB, Johnston PG.: *Molecular mechanisms of drug resistance*. *J Pathol*. 2005; 205: 275-292
20. Perwaiz Iqbal M.: *Mechanisms of drug resistance in cancer cells*. *Pak J Med Sci* 2003; 19: 118-127
21. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP.: *Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells* *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73: 592-604.
22. Sharom FJ.: [ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance](#). *Pharmacogenomics*. 2008; 9: 105-127
23. O'Brien ML, Tew KD: *Glutathione and related enzymes in multidrug resistance*. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 967-978
24. Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Bruening AJ, Veigl ML, Sedwick WD, Boothman DA: [A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage](#). *Oncogene* 2003 20: 7376-7388
25. Gerson SL.: [Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer](#). *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2388-2399
26. Kaufmann SH, Vaux DL: [Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance](#). *Oncogene* 2003; 22: 7414-7430
27. Locher KP. *Structure and mechanism of ABC transporters*. *Curr Opin Struct Biol*. 2004; 14: 426-431

28. Pérez-Tomás R.: *Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment*. Curr Med Chem. 2006; 13: 1859-1876
29. Lum BL, Gosland MP.: *MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors*. Hematol Oncol Clin North Am. 1995; 9: 319-336
30. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE.: *From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance*. Cell Mol Life Sci. 2001; 58: 931-959
31. Köck K, Grube M, Jedlitschky G, Oevermann L, Siegmund W, Ritter CA, Kroemer HK.: *Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy*. Clin Pharmacokinet. 2007; 46: 449-470
32. Sonneveld P.: *Multidrug resistance in haematological malignancies*. J Intern Med. 2000; 247: 521-534
33. Marie JP.: *Drug resistance in hematologic malignancies*. Curr Opin Oncol. 2001; 13: 463-469
34. Pituch-Noworolska A, Gawlicka M, Balwierz W.: *The expression of multidrug resistance (MDR) molecule in acute leukemia and lymphoma*. Pol J Pathol. 1995; 46: 77-82
35. Lautier D, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP.: *Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene*. Biochem Pharmacol. 1996; 52: 967-977
36. Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belinsky MG.: *MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents*. J Bioenerg Biomembr. 2001; 33: 493-501
37. Leonard GD, Fojo T, Bates SE: *The role of ABC transporters in clinical practice*. Oncologist. 2003; 8: 411-424
38. Ross DD.: *Novel mechanisms of drug resistance in leukemia*. Leukemia. 2000; 14: 467-473
39. Abbaszadegan MR, Futscher BW, Klimecki WT, List A, Dalton WS.: *Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells*. Cancer Res. 1994; 54: 4676-4679
40. Kruh GD, Belinsky MG.: *The MRP family of drug efflux pumps*. Oncogene. 2003; 22: 7537-7552
41. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J.: *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst. 2000; 92: 1295-1302
42. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE. *The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the*

- new ABC half-transporter, MXR (ABCG2).* J Cell Sci. 2000; 113: 2011-2021
43. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH.: *Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues.* Cancer Res. 2001; 61: 3458-3464
 44. Ejendal KF, Hrycyna CA.: *Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2.* Curr Protein Pept Sci. 2002; 3: 503-511
 45. Doyle LA, Ross DD.: *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2).* Oncogene. 2003; 22: 7340-7358
 46. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Schroeijs AB, van der Valk P, Scheper RJ.: *Major vault protein LRP-related multidrug resistance.* Eur J Cancer. 1996; 32A: 979-984
 47. Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA.: [Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance?](#) Oncogene. 2003; 22: 7458-7467
 48. van Zon A, Mossink MH, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA.: *The vault complex.* Cell Mol Life Sci. 2003; 60: 1828-1837
 49. Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, Itoyama S.: *Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP.* Cancer Lett. 1997 ; 112: 23-31
 50. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ.: *Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors.* Am J Pathol. 1996; 148: 877-887
 51. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HS, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Weinstein R.: [Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations.](#) Cancer Res. 1996; 56: 3010-3020
 52. Den Boer ML, Zwaan CM, Pieters R, Kazemier KM, Rottier MM, Flens MJ, Scheper RJ, Veerman AJ.: [Optimal immunocytochemical and flow cytometric detection of P-gp, MRP and LRP in childhood acute lymphoblastic leukemia.](#) Leukemia. 1997; 11: 1078-1085
 53. Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg AC, Wijnholds J, van Helvoort A, de Jong MC, Hooijberg JH, Mol CA, van der Linden M, de Vree JM, van der Valk P, Elferink RP, Borst P, Scheper RJ.: *Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies.* Cancer Res. 2000; 60: 5269-5277

54. Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germà-Lluch JR, Izquierdo MA.: *Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material.* J Pathol. 2002; 198: 213-219
55. Schroeijers AB, Scheffer GL, Reurs AW, Pijnenborg AC, Abbondanza C, Wiemer EA, Scheper RJ.: *Detection of the Mr 110,000 lung resistance-related protein LRP/MVP with monoclonal antibodies.* J Histochem Cytochem. 2001; 49: 1379-1385
56. Mechetner E.: [Detection of the MDRI P-glycoprotein expression and function.](#) Methods Mol Biol. 2007; 378: 175-193
57. Hirose M, Hosoi E, Hamano S, Jalili A.: *Multidrug resistance in hematological malignancy.* J Med Invest. 2003; 50: 126-135
58. Chaudhary PM, Roninson IB.: [Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells.](#) Cell. 1991; 66: 85-94.
59. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB.: *Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes.* Blood. 1992; 80: 2735-2739.
60. Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gattlinger C, Huber H, Andreeff M.: *Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype.* Blood. 1992; 80: 2729-2734
61. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS.: *P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers.* Blood. 1994; 83: 2451-2458
62. Ludescher C, Pall G, Irschick EU, Gastl G.: *Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets.* Br J Haematol. 1998; 101: 722-727
63. Styczyński J, Haus O.: *Cytogenetyka i oporność in vitro na cytostatyki w ostrych białaczkach u dzieci i dorosłych.* Postepy Hig Med Dosw (Online). 2006; 60: 527-537.
64. Efferth T, Gillet JP, Sauerbrey A, Zintl F, Bertholet V, de Longueville F, Remacle J, Steinbach D: [Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia.](#) Mol Cancer Ther. 2006; 5:1986-1994
65. Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, Kamps WA, de Vries EG, Vellenga E: [Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia.](#) Clin Cancer Res. 2005; 11: 8661-8668
66. Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippé J.: *Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* Eur J Cancer. 2006; 42: 295-309
67. Styczynski J, Wysocki M, Debski R, Czyzewski K, Kolodziej B, Rafinska B, Kubicka

- M, Koltan S, Koltan A, Pogorzala M, Kurylak A, Olszewska-Slonina D, Balwierz W, Juraszewska E, Wieczorek M, Olejnik I, Krawczuk-Rybak M, Kuzmich M, Kowalczyk J, Stefaniak J, Badowska W, Sonta-Jakimczyk D, Szczepanski T, Matysiak M, Malinowska I, Stanczak E, Wachowiak J, Konatkowska B, Gil L, Balcerska A, Maciejka-Kapuscinska L: [Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia](#). Cancer Res Clin Oncol.2007; 133: 875-893
68. Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, Lee KH, Seo JJ, Moon HN, Ghim T: [Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 \(MDR1\), multidrug resistance-related protein \(MRP\) and lung resistance protein \(LRP\) mRNA expression in acute leukemia](#). J Korean Med Sci. 2006 ; 21: 253-258
 69. van der Pol MA, Broxterman HJ, Pater JM, Feller N, van der Maas M, Weijers GW, Scheffer GL, Allen JD, Scheper RJ, van Loevezijn A, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ: [Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease in acute myeloid leukemia](#). Haematologica. 2003; 88:134-147
 70. Volm M, Zintl F., Sauerbrey A: *Resistance-related proteins in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia*. Int J Oncol 1996; 8: 331-335
 71. Dhooze C, De Moerloose B, Laureys G, Kint J, Ferster A, De Bacquer D, Philippe J, Benoit Y: [P-glycoprotein is an independent prognostic factor predicting relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of a 6-year prospective study](#). Br J Haematol. 1999; 105: 676-683
 72. [Kang YK, Zhan Z, Regis J, Alvarez M, Robey R, Meadows B, Dickstein B, Lee JS, Otsuki T, Stetler-Stevenson M](#): *Expression of mdr-1 in refractory lymphoma: quantitation by polymerase chain reaction and validation of the assay*. Blood. 1995; 86:1515-1524
 73. Filipits M, Jaeger U, Simonitsch I, Chizzali-Bonfadin C, Heinzl H, Pirker R.: *Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large B-cell lymphomas*. Clin Cancer Res. 2000; 6: 3417-3423
 74. Ohsawa M, Ikura Y, Fukushima H, Shirai N, Sugama Y, Suekane T, Hirayama M, Hino M, Ueda M.: *Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma*. Oncology. 2005; 68: 422-431
 75. Andreadis C, Gimotty PA, Wahl P, Hammond R, Houldsworth J, Schuster SJ, Rebbeck TR: *Members of the glutathione and ABC-transporter families are associated with clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma*. Blood. 2007; 109: 3409-3416
 76. Saglam A, Hayran M, Uner AH: [Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins in mature T/NK-cell lymphomas](#). APMIS. 2008; 116: 791-800
 77. Stachura J: *Immunohistochemia*. Polskie Towarzystwo Patologów Oddział w

Krakowie, 1991

78. Litwin JA: *Podstawy technik mikroskopowych*. Collegium Medium UJ, 1995
79. Kofler R, Schmidt S, Kofler A, Ausserlechner MJ: [Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia](#). J Endocrinol. 2003; 178: 19-27
80. Juszczyński P, Robak T, Krykowski E, Warzocha K: *Czynniki rokownicze chłoniaków nieziarniczych*. Onkol Pol. 1999; 2: 97-108
81. Mizuno Y, Hara T, Nagata M, Tawa A, Tsuruo T, Ueda K: [Detection of multidrug-resistant protein, P-glycoprotein in childhood leukaemia and lymphoma](#). Eur J Pediatr. 1991; 150: 416-428
82. Sauerbrey A, Zintl F, Volm M: [P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in childhood acute lymphoblastic leukaemia](#). Br J Cancer. 1994; 70:1144-1149
83. Volm M, Zintl F, Edler L, Sauerbrey A: [Prognostic value of protein kinase C, proto-oncogene products and resistance-related proteins in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia](#). Med Pediatr Oncol. 1997; 28: 117-126
84. Kanerva J, Tiirikainen M, Mäkipernaa A, Riikonen P, Möttönen M, Salmi TT, Krusius T, Saarinen-Pihkala UM: [Multiple drug resistance mediated by P-glycoprotein is not a major factor in a slow response to therapy in childhood ALL](#). Pediatr Hematol Oncol. 1998; 15: 11-21
85. De Moerloose B, Swerts K, Benoit Y, Laureys G, Loeys T, Philippé J, Dhooge C: [The combined analysis of P-glycoprotein expression and activity predicts outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia](#). Pediatr Hematol Oncol. 2003; 20: 381-391
86. Kanerva J, Tiirikainen MI, Mäkipernaa A, Riikonen P, Möttönen M, Salmi TT, Krusius T, Saarinen-Pihkala UM: [Initial P-glycoprotein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: no evidence of prognostic impact in follow-up](#). Pediatr Hematol Oncol. 2001; 18: 27-36
87. Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, Schrappe M, Büchner T, Schoch C, Haferlach T, Harbott J, Ratei R, Dörken B, Ludwig WD: [Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia](#). Haematologica. 2000; 85: 711-21
88. Casale F, D'Angelo V, Addeo R, Caraglia M, Crisci S, Rondelli R, Di Tullio MT, Indolfi P.: [P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia](#). Oncol Rep. 2004; 12: 1201-1207
89. Plasschaert SL, Vellenga E, de Bont ES, van der Kolk DM, Veerman AJ, Sluiter WJ, Daenen SM, de Vries EG, Kamps WA: [High functional P-glycoprotein activity is more often present in T-cell acute lymphoblastic leukaemic cells in adults than in children](#). Leuk Lymphoma. 2003; 44: 85-95

90. Olson DP, Taylor BJ, La M, Sather H, Reaman GH, Ivy SP.: *The prognostic significance of P-glycoprotein, multidrug resistance-related protein 1 and lung resistance protein in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of 295 newly diagnosed patients by the Children's Oncology Group.* Leuk Lymphoma. 2005; 46: 681-691
91. Dhooze C, De Moerloose B, De Potter C, Laureys G, Benoit Y, Leroy J: *Expression of the Multidrug Transporter, P-glycoprotein, in childhood leukemia: a prospective clinical study.* Internat. J. Pediatr. Hemat. Oncol., 1994, 1: 311-314
92. Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V: [Expression of *mdr1*, *mrp*, *topoisomerase II alpha/beta*, and *cyclin A* in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias.](#) Br J Haematol. 1995; 89: 356-363
93. den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, Rottier MM, Zwaan CM, Kaspers GJ, Janka-Schaub G, Henze G, Creutzig U, Scheper RJ, Veerman AJ: [Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia.](#) Blood. 1998; 91: 2092-2098
94. Tafuri A, Sommaggio A, Burba L, Albergoni MP, Petrucci MT, Mascolo MG, Testi AM, Basso G: [Prognostic value of rhodamine-efflux and MDR-1/P-170 expression in childhood acute leukemia.](#) Leuk Res. 1995; 19: 927-931
95. Brophy NA, Marie JP, Rojas VA, Warnke RA, McFall PJ, Smith SD, Sikic BI: [*Mdr1* gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemias and lymphomas: a critical evaluation by four techniques.](#) Leukemia. 1994; 8: 327-335
96. Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, Kvaløy S, Akerman M, Cavallin-Ståhl E; Nordic Lymphoma Group study: [Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study.](#) Ann Hematol. 2004; 83: 414-419
97. Sauerbrey A, Voigt A, Wittig S, Häfer R, Zintl F: [Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein \(MRP1\) and the lung resistance protein \(LRP\) in de novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.](#) Leuk Lymphoma. 2002; 43: 875-879
98. Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG.: *Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Sao Paulo Med J. 2004; 122: 166-71
99. Ogretmen B, Barredo JC, Safa AR: [Increased expression of lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein messenger RNA in childhood acute lymphoblastic leukemia.](#) J Pediatr Hematol Oncol. 2000; 22: 45-49
100. [Volm M, Stammer G, Zintl F, Koomägi R, Sauerbrey A:](#) *Expression of lung resistance-related protein (LRP) in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic*

- leukemia*. Anticancer Drugs. 1997; 8: 662-665
101. Sauerbrey A, Sell W, Steinbach D, Voigt A, Zintl F: [Expression of the BCRP gene \(ABCG2/MXR/ABCP\) in childhood acute lymphoblastic leukaemia](#). Br J Haematol. 2002; 118: 147-150
 102. Plasschaert SL, van der Kolk DM, de Bont ES, Kamps WA, Morisaki K, Bates SE, Scheffer GL, Scheper RJ, Vellenga E, de Vries EG.: *The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia*. Clin Cancer Res. 2003; 9: 5171-5177
 103. Homo-Delarche F: [Glucocorticoid receptors and steroid sensitivity in normal and neoplastic human lymphoid tissues: a review](#). Cancer Res. 1984; 44: 431-437
 104. Lauten M, Cario G, Asgedom G, Welte K, Schrappe M: [Protein expression of the glucocorticoid receptor in childhood acute lymphoblastic leukemia](#). Haematologica. 2003; 88: 1253-1258
 105. Kofler R: [The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells](#). Histochem Cell Biol. 2000; 114: 1-7

14. ANEKS:

1. TABELE
2. RYCINY
3. FOTOGRAFIE

TABELA NR I								
Ogólna charakterystyka grupy badanej								
Cecha	Razem (n=54)		prekursor NHL (n=21)		B-NHL (n=24)		anaplastic NHL (n=9)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Wiek:								
<5 lat	13	24.1	7	33.3	5	20.8	1	11.1
5-12 lat	26	48.1	8	38.1	12	50.0	6	66.7
>12 lat	15	27.7	6	28.6	7	29.2	2	22.2
Płeć:								
dziewczynki	14	26.0	7	33.3	2	8.3	5	55.6
chłopcy	40	74.0	14	66.7	22	91.7	4	44.4
Lokalizacja guza:								
kl. piersiowa	18	33.3	14	66.7	0	0	4	44.4
j. brzuszna	24	44.4	3	14.3	18	75.0	3	33.3
inne	12	22.2	4	19.0	6	25.0	2	22.2
Stopień kliniczny:								
I	0	0	0	0	0	0	0	0
II	4	7.4	1	4.8	2	8.3	1	11.1
III	35	64.8	12	57.1	17	70.9	6	66.7
IV	15	27.7	8	38.1	5	20.8	2	22.2
Objawy ogólne:								
obecne	15	27.7	5	23.8	5	20.8	5	55.6
nieobecne	39	72.3	16	76.2	19	79.2	4	44.4

ELA NR II								
Charakterystyka grupy badanej - parametry laboratoryjne								
Cecha	Razem		precursor NHL (n=21)		B-NHL (n=24)		anaplastic NHL (n=9)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
OB:								
podwyższone	19	67.8	6	28.6	6	25.0	7	77.8
prawidłowe	9	32.1	3	14.3	6	25.0	0	0
brak danych	26	0.0	12	57.1	12	50.0	2	22.2
Morf. krwi obwodowej:								
prawidłowa	47	87.0	19	90.5	20	83.3	8	88.9
niedokrwistość	6	11.1	2	9.5	3	12.5	1	11.1
leukopenia	0	0	0	0	0	0	0	0
małopłytkowość	1	1.9	0	0	1	4.2	0	0
leukocytoza	0	0	0	0	0	0	0	0
Biochemia:								
LDH:								
podwyższone	30	83.3	11	52.4	16	66.7	3	33.3
prawidłowe	6	16.6	2	9.5	3	12.5	1	11.1
brak danych	18	0	8	38.1	5	20.8	5	55.6
próby wątrobowe:								
podwyższone	14	27.4	4	19.0	7	29.1	3	33.3
prawidłowe	37	72.5	15	71.5	17	70.9	5	55.6
brak danych	3	0	2	9.5	0	0	1	11.1
kwasy moczowe:								
podwyższone	14	33.3	4	19.0	9	37.5	1	11.1
prawidłowe	28	66.7	11	52.4	10	41.7	7	77.8
brak danych	6	0	6	28.6	5	20.8	1	11.1

TABELA NR III								
Charakterystyka grupy badanej - przebieg kliniczny								
Cecha	Razem (n=54)		precursor NHL (n=21)		B-NHL (n=24)		anaplastic NHL (n=9)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
I remisja								
uzyskana	47	87.0	20	95.2	21	87.5	6	66.7
nieuzyskana	7	13.0	1	4.8	3	12.5	3	33.3
Wznowa								
tak	11	23.4	4	20.0	4	19.0	3	50.0
nie	33	70.2	15	75.0	16	76.2	2	33.3
brak danych	3	6.4	1	5.0	1	4.8	1	16.7
Zgon								
tak	17	31.5	4	19.0	8	33.3	5	55.6
nie	34	63.0	16	76.6	15	62.5	3	33.3
brak danych	3	5.5	1	4.8	1	4.2	1	11.1
Niepowodzenie terapii								
tak	20	37.0	6	28.6	8	33.3	6	66.7
nie	31	57.4	14	66.7	15	62.5	2	22.2
brak danych	3	5.6	1	4.7	1	4.2	1	11.1

TABELA NR IV

Immunofenotypowa charakterystyka chłoniaków z linii limfocyta T

Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie histopatologiczne	CD2	CD3	CD4	CD8	CD5	CD7	CD10	HLA-DR	Typ
01	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	-	-	+	0	-	-	przedgrasicy
02	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	+	+	+	+	+	-	-	grasicy (późny)
03	węzeł chłonny pachwinowy	mature T-cell lymphoma	+	+	-	+	+	+	0	-	dojrzały
04	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	+	+	+	+	+	+	-	grasicy (późny)
05	węzeł chłonny pachwinowy	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	-	-	+	+	-	+ ⁽¹⁾	przedgrasicy
06	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+ ⁽¹⁾	-	+	+	+	+	-	-	grasicy (wczesny)
07	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	-	-	+	+	+ ⁽¹⁾	+ ⁽¹⁾	przedgrasicy
08	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	+ ⁽¹⁾	+	+	+	+ ⁽¹⁾	-	grasicy (wczesny)
09	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	-	-	+	+	-	-	przedgrasicy
10	śledziona	precursor T lymphoblastic lymphoma (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	nieustalony
11	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	+ ⁽¹⁾	-	-	+	+	+ ⁽¹⁾	-	P przedgrasicy

TABELA NR IV											
Immunofenotypowa charakterystyka chłoniaków z linii limfocyta T											
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie histopatologiczne	CD2	CD3	CD4	CD8	CD5	CD7	CD10	HLA-DR	Typ
12	węzeł chłonny szyjny	mature T-cell lymphoma (2)	+	+	+	+	+	+	-	-	dojrzały
13	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	+(1)	+	+	+	0	-	-	grasiczy (wczesny)
14	węzeł chłonny pachowy	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	-	-	+	+	-	-	przedgrasiczy
15	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	0	+	+	+	+	0	-	-	grasiczy (późny)
16	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	0	-	-	-	+	0	0	0	przedgrasiczy
17	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	+(1)	+	+	+	-	-	grasiczy (wczesny)
18	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	niew ustalony
Legenda: (+) - ekspresja >20% komórek badanej populacji (-) - brak ekspresji lub ekspresja <20% komórek badanej populacji (0) - oznaczenia nie wykonano (1) - ekspresja częściowa - 20-50% komórek badanej populacji (2) - prawidłowe proporcje CD4:CD8, brak ekspresji T alfa/beta (3) - fenotyp ustalony na podstawie badania immunohistochemicznego											

TABELA NR V												
Immunofenotypowa charakterystyka chłoniaków z linii limfocyta B												
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie histopatologiczne	CD19	CD20	CD22	CD10	slg	kappa	lambda	HLA-DR	inne	Typ
19	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	-	-	+	+	-	+	-	dojrzały
20	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+(1)	+	-	+	+	-	dojrzały
21	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	dojrzały ⁽⁵⁾
22	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	0	+	+	+	-	+	+	+(2)	dojrzały
23	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	+	0	+	+	+	+	-	-	-	dojrzały
24	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	+	0	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
25	guz okolicy rżenia	DLBCL	+	0	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
26	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	-	+	+	+(3)	dojrzały
27	guz jamy brzusznej	NHL-B (z obwodowych limf. B)	+	+	+	+	+	-	-	+	-	dojrzały
28	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	0	+	+	+	+	+	-	dojrzały
29	guz jamy brzusznej	NHL-B (z obwodowych limf. B)	+	+	+	+	+	-	-	+	-	dojrzały
30	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
31	guz ślinianki	NHL-B (z obwodowych limf. B)	+	+	+	-	+	-	+	+	+(4)	dojrzały
32	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	dojrzały ⁽⁵⁾
33	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+(1)	+	+	-	+(1)	-	dojrzały
34	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	dojrzały
35	węzeł chłonny szyjny	DLBCL	+(1)	+(1)	+	+(1)	+	0	0	+	-	dojrzały

TABELA NR V												
Immunofenotypowa charakterystyka chłoniaków z linii limfocyty B												
Nr pacjenta	Material	Rozpoznanie histopatologiczne	CD19	CD20	CD22	CD10	slg	kappa	lambda	HLA-DR	inne	Typ
36	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
37	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	+	+	0	+	+	-	+	+	-	dojrzały
38	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
39	węzeł chłonny pachwinowy	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	dojrzały
40	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
41	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	dojrzały
42	guz nosogardzieli	NHL-B (Burkitt)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	dojrzały
43	węzeł chłonny szyjny	precursor B lymphoblastic lymphoma	+	0	+	+	-	-	-	+	(1)	prekursorowy
44	węzeł chłonny szyjny	precursor B lymphoblastic lymphoma	+	+	0	+	-	-	-	+	-	prekursorowy
45	guz nerki	precursor B lymphoblastic lymphoma	+	-	+	+	-	-	-	+	-	prekursorowy
Legenda: (+) - ekspresja >20% komórek badanej populacji (-) - brak ekspresji (ekspresja <20% komórek badanej populacji) (0) - oznaczenia nie wykonano (1) - częściowa ekspresja (20-50% komórek) (2) - pełna ekspresja CD4 i CD7 (3) - częściowa (20-50% komórek) ekspresja CD5 (4) - pełna ekspresja CD7 i CD16+56 (5) - stopień dojrzałości ustalony na podstawie badania immunohistochemicznego												

TABELA NR VI

Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z limfocytów prekursorowych

Nr pacjenta	Rozpoznanie	Wiek (lata)	Płeć (M/K)	główna lokalizacja zmiany (j.brz./śródpierście/obw.w.chł.)	st.klin. w momencie rozp.	zajęcie szpiku (tak/nie)	objawy ogólne (tak/nie)	OB (praw. / podw.)	morfologia (praw. / niepraw.)	LDH (praw. / podw.)	kw. mocz. (praw./ podw.)	pr. wątr. (praw. / niepraw.)
01	precursor T lymphoblastic lymphoma	10	M	obw. w. chł.	II	nie	nie	0	praw.	0	0	praw.
02	precursor T lymphoblastic lymphoma	4	M	śródpierście	III	nie	tak	podw.	praw.	0	praw.	praw.
03	mature T-cell lymphoma	14	M	śródpierście	III	nie	nie	0	praw.	0	podw.	podw.
04	precursor T lymphoblastic lymphoma	5	M	śródpierście	III	nie	nie	praw.	praw.	praw.	praw.	praw.
05	precursor T lymphoblastic lymphoma	9	M	j. brzuszna	IV	tak	nie	praw.	praw.	praw.	praw.	praw.
06	precursor T lymphoblastic lymphoma	12	M	śródpierście	III	nie	nie	0	praw.	podw.	podw.	praw.
07	precursor T lymphoblastic lymphoma	2,5	M	śródpierście	III	nie	nie	0	praw.	0	0	praw.
08	precursor T lymphoblastic lymphoma	7	K	śródpierście	IV	nie	nie	0	praw.	0	praw.	praw.
09	precursor T lymphoblastic lymphoma	12	M	śródpierście	IV	tak	nie	0	praw.	podw.	praw.	praw.
10	precursor T lymphoblastic lymphoma	9	M	j. brzuszna	III	nie	tak	podw.	niepraw.	podw.	praw.	praw.
11	precursor T lymphoblastic lymphoma	2	K	śródpierście	IV	tak	nie	0	praw.	0	0	podw.
12	mature T-cell lymphoma	5,5	M	śródpierście	IV	tak	nie	podw.	praw.	podw.	0	praw.
13	precursor T lymphoblastic lymphoma	1	M	śródpierście	III	nie	nie	0	praw.	0	0	praw.

TABELA NR VI

Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z limfocytów prekursorowych

Nr pacjenta	Rozpoznanie	Wiek (lata)	Płeć (M/K)	główna lokalizacja zmiany (j.brz./śródpiersie/obw.w.chł.)	st.klin. w momencie rozp.	zajęcie szpiku (tak/nie)	objawy ogólne (tak/nie)	OB (praw. / podw.)	morfologia (praw. / niepraw.)	LDH (praw. / podw.)	kw. moc. (praw. / podw.)	pr. wiatr. (praw. / niepraw.)
14	precursor T lymphoblastic lymphoma	18	M	obw. w. chł.	IV	tak	tak	podw.	praw.	podw.	praw.	podw.
15	precursor T lymphoblastic lymphoma	5,5	K	śródpiersie	III	nie	nie	0	praw.	podw.	podw.	praw.
16	precursor T lymphoblastic lymphoma	3,5	M	śródpiersie	III	nie	nie	0	praw.	podw.	praw.	0
17	precursor T lymphoblastic lymphoma	3	M	śródpiersie	III	nie	nie	0	praw.	0	0	praw.
18	precursor T lymphoblastic lymphoma	11	M	śródpiersie	III	nie	nie	0	praw.	podw.	praw.	praw.
43	precursor B lymphoblastic lymphoma	6	K	obw. w. chł.	IV	tak	tak	praw.	praw.	0	praw.	praw.
44	precursor B lymphoblastic lymphoma	16	K	obw. w. chł.	III	nie	tak	podw.	praw.	podw.	0	0
45	precursor B lymphoblastic lymphoma	15,5	K	j. brzuszna	IV	tak	nie	podw.	niepraw.	podw.	podw.	podw.

Legenda:

0 - oznaczenia nie wykonano

praw. - wartości prawidłowe

niepraw. - wartości poza granicami normy

podw. - wartości powyżej górnej granicy normy

TABELA NR VII

Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z dojrzałych limfocytów B

Nr pacjenta	Rozpoznanie	Wiek (lata)	Płeć	główna lokalizacja zmiany (j.brz./śródpierście / inne)	st.klin. w momencie rozp.	zajęcie szpiku (tak/nie)	objawy klin. (tak/nie)	OB (praw. / podw.)	morfologia (praw. / niepraw.)	LDH (praw. / podw.)	kw. moc. (praw./ podw.)	pr. wiatr. (praw. / niepraw.)
19	NHL-B (Burkitt)	6	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	praw.	0	0	praw.
20	NHL-B (Burkitt)	2	M	j. brzuszna	III	nie	nie	praw.	praw.	0	podw.	praw.
21	NHL-B (Burkitt)	14	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	0	0	0	praw.
22	NHL-B (Burkitt)	15	M	j. brzuszna	III	nie	tak	0	praw.	podw.	podw.	praw.
23	NHL-B (Burkitt)	6	M	obw. w. chl.	III	nie	nie	0	praw.	0	0	praw.
24	NHL-B (Burkitt)	13	M	obw. w. chl.	II	nie	nie	praw.	praw.	praw.	0	praw.
25	DLBCL	12,5	M	guz okol. rdzenia	IV	tak	tak	podw.	praw.	0	podw.	podw.
26	NHL-B (Burkitt)	6,5	K	j. brzuszna	III	nie	nie	podw.	niepraw.	podw.	0	praw.
27	NHL-B (z obwodow. limf. B)	8,5	M	j. brzuszna	III	nie	nie	podw.	praw.	podw.	podw.	praw.
28	NHL-B (Burkitt)	3	M	j. brzuszna	III	nie	nie	podw.	0	praw.	praw.	praw.
29	NHL-B (z obwodow. limf. B)	4	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	0	podw.	praw.	praw.
30	NHL-B (Burkitt)	15	M	j. brzuszna	III	nie	tak	0	praw.	podw.	podw.	praw.
31	NHL-B (z obwodow. limf. B)	7	M	j. brzuszna	III	nie	nie	praw.	praw.	podw.	praw.	praw.

TABELA NR VII

Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z dojrzałymi limfocytów B

Nr pacjenta	Rozpoznanie	Wiek (lata)	Płeć	główna lokalizacja zmiany (j.brz./śródpiersie / inne)	st.klin. w momencie rozp.	zajęcie szpiku (tak/nie)	objawy klin. (tak/nie)	OB (praw. / podw.)	morfologia (praw. / niepraw.)	LDH (praw. / podw.)	kw. moc. (praw. / podw.)	pr. wątr. (praw. / niepraw.)
32	NHL-B (Burkitt)	2,5	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	praw.	podw.	praw.	podw.
33	NHL-B (Burkitt)	5,5	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	niepraw.	podw.	praw.	praw.
34	NHL-B (Burkitt)	10	M	obw. w. chl.	IV	tak	nie	podw.	niepraw.	podw.	praw.	podw.
35	DLBCL	17	M	obw. w. chl.	IV	nie	nie	0	praw.	podw.	podw.	podw.
36	NHL-B (Burkitt)	9,5	M	j. brzuszna	III	nie	tak	praw.	praw.	podw.	praw.	podw.
37	NHL-B (Burkitt)	17,5	M	obw. w. chl.	II	nie	nie	praw.	praw.	praw.	praw.	praw.
38	NHL-B (Burkitt)	6	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	praw.	podw.	podw.	praw.
39	NHL-B (Burkitt)	8	M	j. brzuszna	IV	nie	tak	0	praw.	podw.	podw.	praw.
40	NHL-B (Burkitt)	7,5	M	j. brzuszna	III	nie	nie	podw.	praw.	podw.	praw.	podw.
41	NHL-B (Burkitt)	9	M	j. brzuszna	III	nie	nie	0	0	podw.	praw.	podw.
42	NHL-B (Burkitt)	4	K	j. brzuszna	IV	nie	nie	praw.	praw.	podw.	podw.	praw.

Legenda:

0 - oznaczenia nie wykonano

praw. - wartości prawidłowe

niepraw. - wartości poza granicami normy

podw. - wartości powyżej górnej granicy normy

TABELA NR VIII

Charakterystyka histologiczno-kliniczna pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi anaplastycznymi

Nr pacjenta	Rozpoznanie	Wiek (lata)	Płeć	główna lokalizacja zmiany (j.brz./kl.piers./inne)	st.klin. w momencie rozp.	zajęcie szpiku (tak/nie)	objawy klin. (tak/nie)	OB (praw. / podw.)	morfologia (praw. / niepraw.)	LDH (praw. / podw.)	kw. moc. (praw./ podw.)	pr. wiatr. (praw. / niepraw.)
46	Anaplastic Large Cell Lymphoma	2	M	kl. piers	III	nie	nie	0	niepraw.	0	praw.	podw.
47	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	15	K	j. brzuszna	III	nie	tak	podw.	praw.	0	praw.	praw.
48	Anaplastic Large Cell Lymphoma	11	M	j. brzuszna	III	nie	nie	podw.	praw.	0	0	0
49	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	6	K	kl. piers	IV	tak	nie	podw.	praw.	praw.	praw.	praw.
50	Anaplastic Large Cell Lymphoma B-cell	9	K	kl. piers	III	nie	nie	podw.	praw.	0	podw.	podw.
51	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	13	M	obw. w. chl.	III	nie	tak	podw.	praw.	podw.	praw.	podw.
52	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	9	M	obw. w. chl.	II	nie	tak	podw.	praw.	podw.	praw.	praw.
53	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	10	M	j. brzuszna	III	nie	tak	podw.	praw.	0	praw.	praw.
54	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	5	K	kl. piers	IV	tak	tak	0	praw.	podw.	praw.	praw.

Legenda:

0 - oznaczenia nie wykonano

praw. - wartości prawidłowe

niepraw. - wartości poza granicami normy

podw. - wartości powyżej górnej granicy normy

TABELA NR IX											
Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z prekursorowych limfocytów T i B											
Nr pacjenta	Rozpoznanie	schemat leczenia	remisja	czas do stwierdzenia I remisji (tyg.)	wznowa	czas od remisji do wystąpienia wznowy (tyg.)	ilość wznów	zgon	czas od diagnozy do zgonu (tyg.)	całkowity czas obserwacji (tyg. od rozp. leczenia)	komentarz
01	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL-86	tak	6 tyg.	tak	107 tyg.	1	tak	123 tyg.	-	
02	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL-90	tak	4 tyg.	tak	115 tyg.	1	nie	-	>312 tyg.	
03	mature T-cell lymphoma	BFM-nonB-NHL	nie	-	-	-	-	tak	b.d.	-	
04	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	2 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
05	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	9 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
06	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	5 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
07	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL-93	tak	18 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
08	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL-90	tak	7 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
09	precursor T lymphoblastic lymphoma	PGP-nonB-NHL-93	tak	5 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
10	precursor T lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	0	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	guz śledzony, usunięty w całości - czas do stwierdzenia remisji nie do ustalenia

TABELA NR IX

Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z prekursorowych limfocytów T i B

Nr pacjenta	Rozpoznanie	schemat leczenia	remisja	czas do stwierdzenia I remisji (tyg.)	wznowa	czas od remisji do wystąpienia wznowy (tyg.)	ilość wznów	zgon	czas od diagnozy do zgonu (tyg.)	całkowity czas obserwacji (tyg. od rozp. leczenia)	komentarz
11	precursor T lymphoblastic lymphoma	PGPALL-95	tak	5 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
12	mature T-cell lymphoma	PGP-NB-NHL-93	tak	21 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
13	precursor T lymphoblastic lymphoma	PGP-NB-NHL-93	tak	14 tyg.	tak	88 tyg.	3	tak	150 tyg.	-	
14	precursor T lymphoblastic lymphoma	ALLIC-2002	tak	6 tyg.	nie	-	-	tak	30 tyg.	-	
15	precursor T lymphoblastic lymphoma	EURO-LB-2002	tak	14 tyg.	nie	-	-	nie	-	156 tyg.	
16	precursor T lymphoblastic lymphoma	EURO-LB-2002	tak	5 tyg.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	32 tyg.	brak danych dotyczących wznowy i dalszego przebiegu choroby
17	precursor T lymphoblastic lymphoma	EURO-LB-2002	tak	14 tyg.	tak	104 tyg.	1	nie	-	130 tyg.	
18	precursor T lymphoblastic lymphoma	EURO-LB-2002	tak	21 tyg.	nie	-	-	nie	-	130 tyg.	
43	precursor B lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	5 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
44	precursor B lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	7 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
45	precursor B lymphoblastic lymphoma	BFM-nonB-NHL	tak	21 tyg.	nie	-	-	nie	-	76 tyg.	

Legenda:
b.d. - brak danych

TABELA NR X

Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z dojrzałych limfocytów B

Nr pacjenta	Rozpoznanie	schemat leczenia	remisja	czas do stwierdzenia I remisji (tyg.)	wznowa	czas od remisji do wystąpienia wznowy (tyg.)	ilość wznów	zgon	czas od diagnozy do zgonu (tyg.)	całkowity czas obserwacji (tyg.)	komentarz
19	NHL-B (Burkitt)	LBM-89	tak	10 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
20	NHL-B (Burkitt)	LBM-89	tak	4 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
21	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	nie	-	-	-	-	tak	6 tyg.	-	
22	NHL-B (Burkitt)	PGP B-NHL 93	tak	4 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
23	NHL-B Burkitt)	PGP B-NHL 93	tak	13 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
24	NHL-B (Burkitt)	B-NHL-BFM-90	tak	9 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
25	DLBCL	LMB-89	tak	12 tyg.	nie	-	-	tak	32 tyg.	-	
26	NHL-B (Burkitt)	LMB-93	tak	19 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
27	NHL-B (z obwodow. limf. B)	LMB-89	tak	2 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
28	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	12 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
29	NHL-B (z obwodow. limf. B)	LMB-89	tak	6 tyg.	tak	29 tyg.	3	tak	74 tyg.	-	
30	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	nie	-	-	-	-	tak	23 tyg.	-	
31	NHL-B (z obwodow. limf. B)	LMB-89	tak	15 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	

TABELA NR X

Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi z dojrzałych limfocytów B

Nr pacjenta	Rozpoznanie	schemat leczenia	remisja	czas do stwierdzenia I remisji (tyg.)	wznowa	czas od remisji do wystąpienia wznowy (tyg.)	ilość wznów	zgon	czas od diagnozy do zgonu (tyg.)	całkowity czas obserwacji (tyg.)	komentarz
32	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	13 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
33	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	5 tyg.	tak	24 tyg.	1	tak	34 tyg.	-	
34	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	9 tyg.	nie	-	-	nie	-	208 tyg.	
35	DLBCL	B-NHL-BFM-90	nie	-	-	-	-	tak	20 tyg.	-	
36	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	10 tyg.	nie	-	-	nie	-	208 tyg.	
37	NHL-B (Burkitt)	PGP B-NHL 93	tak	15 tyg.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	26 tyg.	brak danych dotyczących wznowy i dalszego przebiegu choroby
38	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	14 tyg.	tak	16 tyg.	2	tak	61 tyg.	-	
39	NHL-B (Burkitt)	PGP B-NHL 93	tak	18 tyg.	nie	-	-	nie	-	144 tyg.	
40	NHL-B (Burkitt)	LMB-89	tak	11 tyg.	tak	25 tyg.	2	tak	b.d.	64 tyg.	
41	NHL-B (Burkitt)	B-NHL-BFM-04	tak	18 tyg.	nie	-	-	nie	-	88 tyg.	
42	NHL-B (Burkitt)	B-NHL-BFM-04	tak	26 tyg.	nie	-	-	nie	-	88 tyg.	
Legenda: b.d. - brak danych											

TABELA NR XI

Charakterystyka przebiegu klinicznego choroby u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi anaplastycznymi

Nr pacjenta	Rozpoznanie	schemat leczenia	remisja	czas do stwierdzenia I remisji (tyg.)	wznowa	czas od remisji do wystąpienia wznowy (tyg.)	ilość wznów	zgon	czas od diagnozy do zgonu (tyg.)	całkowity czas obserwacji (tyg. od rozp. leczenia)	komentarz
46	Anaplastic Large Cell Lymphoma	BFM-LCAL	tak	6 tyg.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	27 tyg.	brak danych dotyczących wznowy i dalszego przebiegu choroby
47	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	BFM-LCAL	nie	-	-	-	-	tak	3 tyg.	-	
48	Anaplastic Large Cell Lymphoma	BFM-LCAL	tak	4 tyg.	nie	-	-	nie	-	>260 tyg.	
49	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	BFM-LCAL	tak	23 tyg.	tak	9 tyg.	1	tak	37 tyg.	-	
50	Anaplastic Large Cell Lymphoma B-cell	BFM-LCAL	nie	-	-	-	-	tak	13 tyg.	-	
51	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	BFM-LCAL	tak	9 tyg.	tak	19 tyg.	2	nie	-	>260 tyg.	
52	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	BFM-ALCL	tak	9 tyg.	tak	18 tyg.	2	tak	67 tyg.	vv	
53	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	LCAL-99	nie	-	-	-	-	tak	21 tyg.	-	
54	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	LCAL-99	tak	21 tyg.	nie	-	-	nie	-	125 tyg.	
Legenda: b.d. - brak danych											

TABELA NR XII										
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych prekursorowych										
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie	Ilość				Intensywność			
			p-gp	MRP1	LRP	BCRP	p-gp	MRP1	LRP	BCRP
1	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	++	-	+++	+++	++	-	+++	+
2	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	+++	+	++	-	++	+
3	węzeł chłonny pachwinowy	mature T-cell lymphoma	+++	-	+++	+++	++	-	++	++
4	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	+	+++	++	++	+	+++	+
5	węzeł chłonny pachwinowy	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	+++	-	++	-	+	-
6	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	++	-	+++	+++	++	-	++	+
7	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	+++	++	-	++	++	+	-
8	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	++	+	+	-	+	+	+	-
9	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	+++	+++	-	++	++	++	-
10	śledziona	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	++	+++	+	-	+	++
11	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	++	+	++	-	+	+
12	węzeł chłonny szyjny	mature T-cell lymphoma	+++	-	++	+++	+	-	+	+

TABELA NR XII										
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych prekursorowych										
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie	Ilość				Intensywność			
			p-gp	MRP1	LRP	BCRP	p-gp	MRP1	LRP	BCRP
13	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	+	++	+++	+	+	+	++
14	węzeł chłonny pachowy	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	+++	+++	++	-	+	+
15	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	-	-	++	++	-	-	+	+
16	guz śródpiersia	precursor T lymphoblastic lymphoma	+	-	+++	+++	+	-	+	+
17	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	+++	+++	++	-	++	++
18	węzeł chłonny szyjny	precursor T lymphoblastic lymphoma	+++	-	-	+++	++	-	-	+
43	węzeł chłonny szyjny	precursor B lymphoblastic lymphoma	-	+	++	-	-	+	+	-
44	węzeł chłonny szyjny	precursor B lymphoblastic lymphoma	++	++	+++	-	+	+	+	-
45	guz nerki	precursor B lymphoblastic lymphoma	+++	+++	++	+++	+	++	+	++
			Legenda (Ilość): (-) - ekspresja ujemna (<10% komórek) (+) - ekspresja niska (10-40 % komórek) (++) - ekspresja średnia (41-75% komórek) (+++) - ekspresja wysoka (>75% komórek)				Legenda (intensywność): (-) - brak ekspresji (+) - intensywność słaba (++) - intensywność silna (+++) - intensywność bardzo silna			

TABELA NR XIII										
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych z dojrzałych limfocytów B (NHL-B)										
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie	Ilość				Intensywność			
			p-gp	MRP1	LRP	BCRP	p-gp	MRP1	LRP	BCRP
19	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	-	+++	+++	+++	-	++	+	++
20	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	++	+++	+	+++	+	+++	+	++
21	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++
22	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	-	++	++	++	-	+
23	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	-	+++	-	+++	-	++	-	++
24	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	-	++	+++	+++	-	++	+	++
25	guz okolicy rżenia	DLBCL	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+
26	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	++	+++	+++	++	+	+	++
27	guz jamy brzusznej	NHL-B (z obwod. limf. B)	-	+++	-	+++	-	+++	-	++
28	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	-	++	++	++	-	+
29	guz jamy brzusznej	NHL-B (z obwod. limf.B)	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
30	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	-
31	guz ślinianki	NHL-B (z obwod. limf. B)	++	-	+	+	+	-	+	+

TABELA NR XIII										
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych z dojrzałych limfocytów B (NHL-B)										
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie	Ilość				Intensywność			
			p-gp	MRP1	LRP	BCRP	p-gp	MRP1	LRP	BC
32	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	-	+++	-	+++	-	+	-	++
33	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	++	+++	++	++	+	++
34	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	+	+	-	+++	+	+	-	++
35	węzeł chłonny szyjny	DLBCL	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+
36	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	-	+++	+++	+++	v	+++	+	++
37	węzeł chłonny szyjny	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++
38	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
39	węzeł chłonny pachwinowy	NHL-B (Burkitt)	+++	+++	++	+++	++	+++	++	++
40	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	-	++	++	+++	-	+	++	++
41	guz jamy brzusznej	NHL-B (Burkitt)	+	++	-	+++	+	+	-	++
42	guz okolicy nosogardzieli	NHL-B (Burkitt)	++	+++	++	+++	+	+	++	++
			Legenda (ilość): (-) - ekspresja ujemna (<10% komórek) (+) - ekspresja niska (10-40 % komórek) (++) - ekspresja średnia (41-75% komórek) (+++) - ekspresja wysoka (>75% komórek)				Legenda (intensywność): (-) - brak ekspresji (+) - intensywność słaba (++) - intensywność silna (+++) - intensywność bardzo silna			

TABELA NR XIV										
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych anaplastycznych										
Nr pacjenta	Materiał	Rozpoznanie	Ilość				Intensywność			
			p-gp	MRP1	LRP	BCRP	p-gp	MRP1	LRP	BC
46	węzeł chłonny szyjny	Anaplastic Large Cell Lymphoma	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++
47	guz j. brzusznej	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	++
48	guz j. brzusznej	Anaplastic Large Cell Lymphoma	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++
49	węzeł chłonny szyjny	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	+	+	+++	-	+	++	++	-
50	węzeł chłonny pachwinowy	Anaplastic Large Cell Lymphoma B-cell	-	++	+++	++	-	+	++	+
51	węzeł chłonny pachwinowy	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+
52	migdalek	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	-	+++	+++	+++	-	++	++	+
53	węzeł chłonny szyjny	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	++
54	węzeł chłonny szyjny	Anaplastic Large Cell Lymphoma T-cell	+++	+++	+++	+++	+	++	++	++
			Legenda (Ilość): (-) - ekspresja ujemna (<10% komórek) (+) - ekspresja niska (10-40 % komórek) (++) - ekspresja średnia (41-75% komórek) (+++) - ekspresja wysoka (>75% komórek)				Legenda (intensywność): (-) - brak ekspresji (+) - intensywność słaba (++) - intensywność silna (+++) - intensywność bardzo silna			

TABELA NR XV									
Współwystępowanie białek lekooporności w komórkach poszczególnych typów NHL									
Białka		precursor NHL		B-NHL		anaplastic NHL		całość	
		n=21	%	n=24	%	n=9	%	n=54	%
1	brak białek	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
2	1 białko	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
3	2 białka	4	19,0	3	12,5	0	0,0	7	13,0
4	3 białka	14	66,7	10	41,7	3	33,3	27	50,0
5	4 białka	3	14,3	11	45,8	6	66,7	20	37,0
razem		21/21	100,0	24/24	100,0	9/9	100,0	54/54	100,0

TABELA NR XVI									
Współwystępowanie białek lekooporności w komórkach poszczególnych typów NHL									
Białka		precursor NHL		B-NHL		anaplastic NHL		całość	
		n=21	%	n=24	%	n=9	%	n=54	%
1	pgp+MRP	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
2	pgp+LRP	1	4,8	0	0,0	0	0,0	1	1,8
3	pgp+BCRP	1	4,8	0	0,0	0	0,0	1	1,8
4	MRP+LRP	1	4,8	0	0,0	0	0,0	1	1,8
5	MRP+BCRP	0	0,0	3	12,5	0	0,0	3	5,6
6	LRP+BCRP	1	4,8	0	0,0	0	0,0	1	1,8
7	pgp+MRP+LRP	4	19,0	1	4,2	1	11,1	6	11,1
8	pgp+MRP+BCRP	0	0,0	4	16,6	0	0,0	4	7,4
9	pgp+LRP+BCRP	10	47,6	1	4,2	0	0,0	11	20,4
10	MRP+LRP+BCRP	0	0,0	4	16,6	2	22,2	6	11,1
11	pgp+MRP+LRP+BCRP	3	14,2	11	45,8	6	66,7	20	37,0
razem		21/21	100,0	24/24	100,0	9/9	100,0	54/54	100,0

TABELA NR XVII									
Współwystępowanie białek lekooporności w komórkach poszczególnych typów NHL (pełna ekspresja)									
Białka		precursor NHL		B-NHL		anaplastic NHL		całość	
		n=21	%	n=24	%	n=9	%	n=54	%
1	brak	3	14,3	1	4,2	0	0,0	4	7,4
2	1 białko +++	2	9,5	3	12,5	2	22,1	7	13,0
3	2 białka +++	11	52,4	8	33,3	0	0,0	19	35,2
4	3 białka +++	5	23,8	7	21,2	2	22,2	14	25,9
5	4 białka +++	0	0,0	5	20,8	5	55,5	10	18,5
razem		21/21	100,0	24/24	100,0	9/9	100,0	54/54	100,0

TABELA NR XVIII									
-----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Korelacje r Pearsona między występowaniem białek lekooporności dla poszczególnych typów NHL				
Typ_r		MRP1	LRP	BCRP
precursor	p-gp	,119	,036	,162
	MRP1		-,040	-,465*
	LRP			,007
NHL-B	p-gp	,190	,301	-,266
	MRP1		,207	,254
	LRP			,056
ALCL	p-gp	,562	-	,300
	MRP1		-	,791*
	LRP			-
* : p < 0,05 (-) - obliczenia niemożliwe				

TABELA NR XIX																
Ekspresja p-gp a przebieg kliniczny																
p-gp	precursor NHL (n=20)				NHL-B (n=23)				ALCL (n=8)				całość (n=51)			
	p-gp +		p-gp -		p-gp +		p-gp -		p-gp +		p-gp -		p-gp +		p-gp -	
	n=18	%	n=2	%	n=16	%	n=7	%	n=6	%	n=2	%	n=40	%	n=11	%
remisja	17	94.4	2	100	13	81.2	7	100	4	66.6	1	50	34	85.0	10	90.9
brak remisji	1	5.6	0	0	3	18.7	0	0	2	33.3	1	50	6	15.0	1	9.1
wznowa	4	22.2	0	0	3	18.7	1	14.3	2	33.3	1	50	9	22.5	2	18.2
zgon	4	22.2	0	0	7	43.7	1	14.3	3	50.0	2	100	14	35.0	3	27.3
niepowodzenie terapii	6	33.3	0	0	7	43.7	1	14.3	4	66.6	2	100	17	42.5	3	27.3
W tabeli nie uwzględniono 3 przypadków w których uzyskano remisję, natomiast nie była możliwa dalsza obserwacja pacjenta ("lost to follow-up")																

TABELA NR XX																
Ekspresja MRP1 a przebieg kliniczny																
MRP1	precursor NHL (n=20)				NHL-B (n=23)				ALCL (n=8)				całość (n=51)			
	MRP1 +		MRP1 -		MRP1 +		MRP1 -		MRP1 +		MRP1 -		MRP1 +		MRP1 -	
	n=8	%	n=12	%	n=22	%	n=1	%	n=8	%	n=0	%	n=38	%	n=13	%
remisja	8	100	11	91.7	19	86.4	1	100	5	62.5	0	0	32	84.2	12	92.3
brak remisji	0	0	1	8.3	3	13.6	0	0	3	37.5	0	0	6	15.8	1	7.7
wznowa	1	12.5	3	25.0	4	18.2	0	0	3	37.5	0	0	8	21.0	3	23.1
zgon	1	12.5	3	25.0	8	36.4	0	0	5	62.5	0	0	14	36.8	3	23.1
niepowodzenie terapii	1	12.5	5	41.7	8	36.4	0	0	6	75.0	0	0	15	39.5	5	38.5
W tabeli nie uwzględniono 3 przypadków w których uzyskano remisję, natomiast nie była możliwa dalsza obserwacja pacjenta ("lost to follow-up")																

TABELA NR XXI																
Ekspresja LRP a przebieg kliniczny																
LRP	Precursor NHL (n=20)				NHL-B (n=23)				ALCL (n=8)				całość (n=51)			
	LRP +		LRP -		LRP +		LRP -		LRP +		LRP -		LRP +		LRP -	
	n=19	%	n=1	%	n=16	%	n=7	%	n=8	%	n=0	%	n=43	%	n=8	%
remisja	18	94.7	1	100	13	81.2	7	100	5	62.5	0	0	36	83.7	8	100
brak remisji	1	5.3	0	0	3	18.8	0	0	3	37.5	0	0	7	16.3	0	0
wznowa	4	21.0	0	0	4	25.0	0	0	3	37.5	0	0	11	23.2	0	0
zgon	4	21.0	0	0	8	50.0	0	0	5	62.5	0	0	17	39.5	0	0
niepowodzenie terapii	6	31.6	0	0	8	50.0	0	0	6	75.0	0	0	20	46.5	0	0
W tabeli nie uwzględniono 3 przypadków w których uzyskano remisję, natomiast nie była możliwa dalsza obserwacja pacjenta ("lost to follow-up")																

TABELA NR XXII																
Ekspresja BCRP a przebieg kliniczny																
BCRP	Precursor NHL (n=20)				NHL-B (n=23)				ALCL (n=8)				całość (n=51)			
	BCRP +		BCRP -		BCRP +		BCRP -		BCRP +		BCRP -		BCRP +		BCRP -	
	n=14	%	n=6	%	n=22	%	n=1	%	n=7	%	n=1	%	n=43	%	n=8	%
remisja	13	92.8	6	100	20	90.9	0	0	4	57.1	1	100	37	86.0	7	87.5
brak remisji	1	7.2	0	0	2	9.1	1	100	3	42.8	0	0	6	14.0	1	12.5
wznowa	4	28.6	0	0	4	18.2	0	0	2	28.6	1	100	10	23.2	1	12.5
zgon	4	28.6	0	0	7	31.8	1	100	4	57.1	1	100	15	34.9	2	25.0
niepowodzenie terapii	6	42.8	0	0	7	31.8	1	100	5	71.4	1	100	18	41.7	2	25.0
W tabeli nie uwzględniono 3 przypadków w których uzyskano remisję, natomiast nie była możliwa dalsza obserwacja pacjenta ("lost to follow-up")																

TABELA NR XXIII					
Korelacje r Pearsona między występowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym dla poszczególnych typów NHL					
Typ_r		p-gp	MRP1	LRP	BCRP
precur.	remisja	-,134	,149	-,176	-,194
	czas do remisji (tyg.)	,233	,188	-,576**	,325
	remisja wydłużona (> 6 tyg.)	,141	,201	-,480*	-,029
	wznowa	,152	-,252	,281	,296
	zgon	,136	-,229	,252	,452*
NHL-B	remisja	-,336	-,188	-,373	,364
	czas do remisji (tyg.)	,150	-,159	,160	,011
	remisja wydłużona (> 6 tyg.)	-,226	-,303	,165	,011
	wznowa	,246	,124	,370	,196
	zgon	,467*	,254	,571**	-,069
ALCL	remisja	,061	,000	-	-,224
	czas do remisji (tyg.)	-,245	-,674	-	-,508
	remisja wydłużona (> 6 tyg.)	-,486	-,316	-	-,486
	wznowa	-,645	-,408	-	-,645
	zgon	-,586	-,417	-	-,059
* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ (-) - obliczenia niemożliwe. Niektóre korelacje nie mogły być obliczone, z uwagi na to, że wszyscy badani mieli taki sam wynik (ekspresja LRP w grupie ALCL)					

TABELA NR XXIV							
Zależność pomiędzy współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym							
Białka		ilość przypad.	precursor NHL (n=20)				
			remisja	brak remisji	wznowa	zgon	niepowodzenie
1	brak białek	0	0	0	0	0	0
2	1 białko	0	0	0	0	0	0
3	2 białka	4	4	0	0	0	0
4	3 białka	13	12	1	3	3	5
5	4 białka	3	3	0	1	1	1
razem		20	19	1	4	4	6

TABELA NR XXV							
Szczegółowa zależność pomiędzy współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym							
Białka		ilość przypad.	precursor NHL (n=20)				
			remisja	brak remisji	wznowa	zgon	niepowodzenie
1	pgp+MRP	0					
2	pgp+LRP	1	1	0	0	0	0
3	pgp+BCRP	1	1	0	0	0	0
4	MRP+LRP	1	1	0	0	0	0
5	MRP+BCRP	1	1	0	0	0	0
6	LRP+BCRP	0					
7	pgp+MRP+LRP	4	4	0	0	0	0
8	pgp+MRP+BCRP	0					
9	pgp+LRP+BCRP	9	8	1	3	3	5
10	MRP+LRP+BCRP	0					
11	pgp+MRP+LRP+BCRP	3	3	0	1	1	1
razem		20	19	1	4	4	6

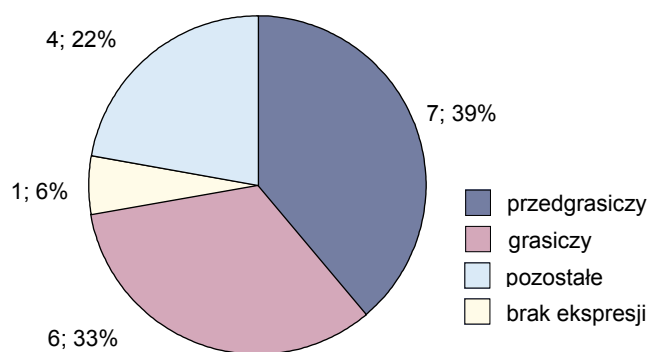
TABELA NR XXVI							
Zależność pomiędzy współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym							
Białka		ilość przypad.	B-NHL (n=23)				
			remisja	brak remisji	wznowa	zgon	niepowo- dzenie
1	brak białek	0					
2	1 białko	0					
3	2 białka	3	3	0	0	0	0
4	3 białka	10	9	1	1	2	2
5	4 białka	10	8	2	3	6	6
razem		23	20	3	4	8	8

TABELA NR XXVII							
Szczegółowa zależność pomiędzy współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym							
Białka		ilość przypad.	B-NHL (n=23)				
			remisja	brak remisji	wznowa	zgon	niepowo- dzenie
1	pgp+MRP	0					
2	pgp+LRP	0					
3	pgp+BCRP	0					
4	MRP+LRP	0					
5	MRP+BCRP	3	3	0	0	0	0
6	LRP+BCRP	0					
7	pgp+MRP+LRP	1	0	1	0	1	1
8	pgp+MRP+BCRP	4	4	0	0	0	0
9	pgp+LRP+BCRP	1	1	0	0	0	0
10	MRP+LRP+BCRP	4	4	0	1	1	1
11	p _P gp+MRP+LRP+BCR	10	8	2	3	6	6
razem		23	20	3	4	8	8

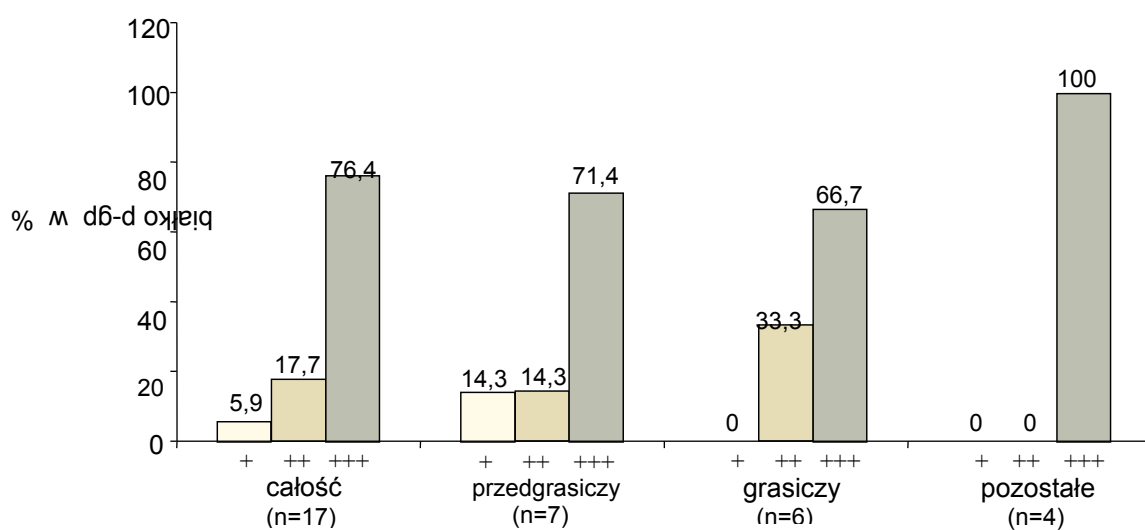
TABELA NR XXVIII

Zależność pomiędzy współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym							
Białka		Ilość przypad.	ALCL (n=8)				
			remisja	brak remisji	wznowa	zgon	niepowodzenie
1	brak białek	0					
2	1 białko	0					
3	2 białka	0					
4	3 białka	3	2	1	2	3	3
5	4 białka	5	3	2	1	2	3
razem		8	5	3	3	5	6

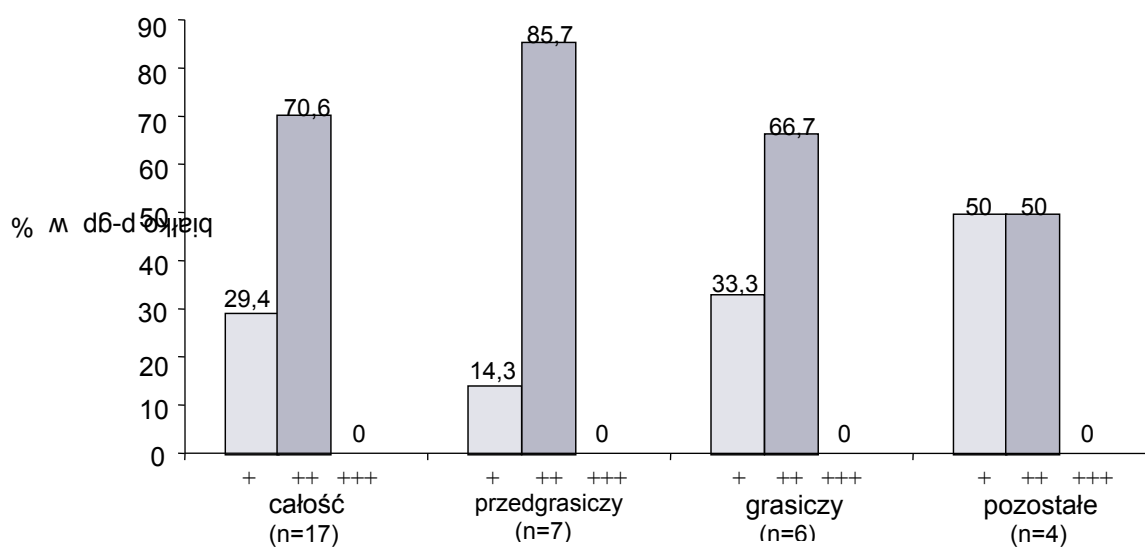
TABELA NR XXIX							
Szczegółowa zależność pomiędzy współwystępowaniem białek lekooporności a przebiegiem klinicznym							
Białka		Ilość przypad.	ALCL (n=8)				
			remisja	brak remisji	wznowa	zgon	niepowodzenie
1	pgp+MRP	0					
2	pgp+LRP	0					
3	pgp+BCRP	0					
4	MRP+LRP	0					
5	MRP+BCRP	3					
6	LRP+BCRP	0					
7	pgp+MRP+LRP	1	1	0	1	1	1
8	pgp+MRP+BCRP	0					
9	pgp+LRP+BCRP	0					
10	MRP+LRP+BCRP	2	1	1	1	2	2
11	p _P gp+MRP+LRP+BCR	5	3	2	1	2	3
razem		9	5	3	3	5	6



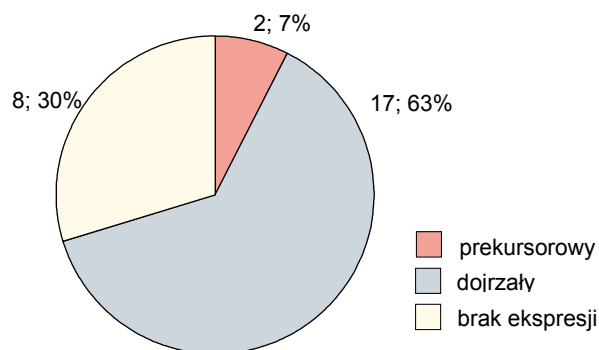
RYC. 1. Obecność p-gp w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



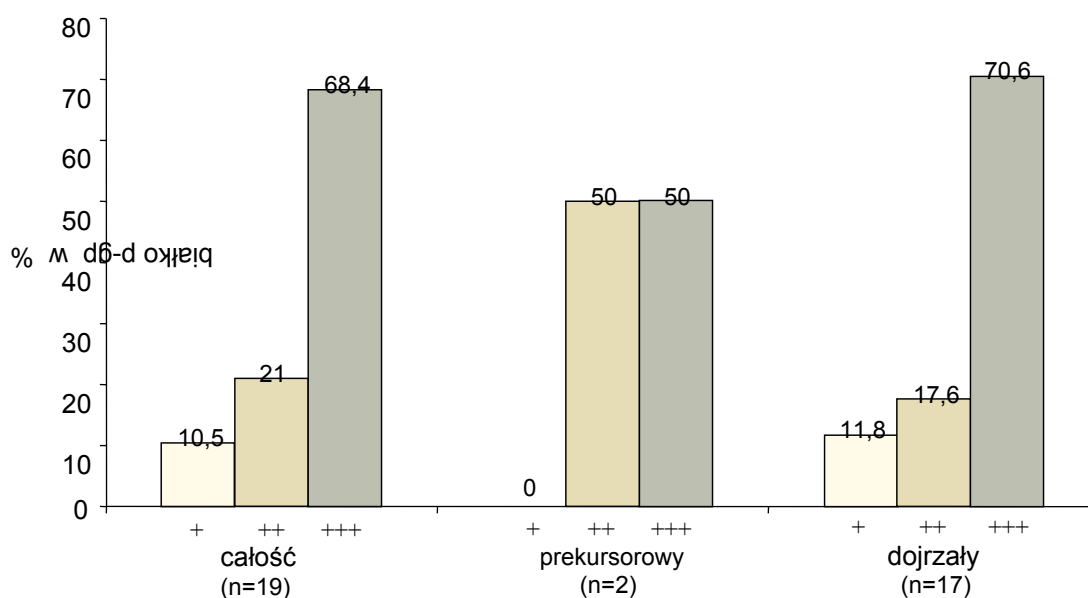
RYC. 2. Ilościowa ocena obecności p-gp w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



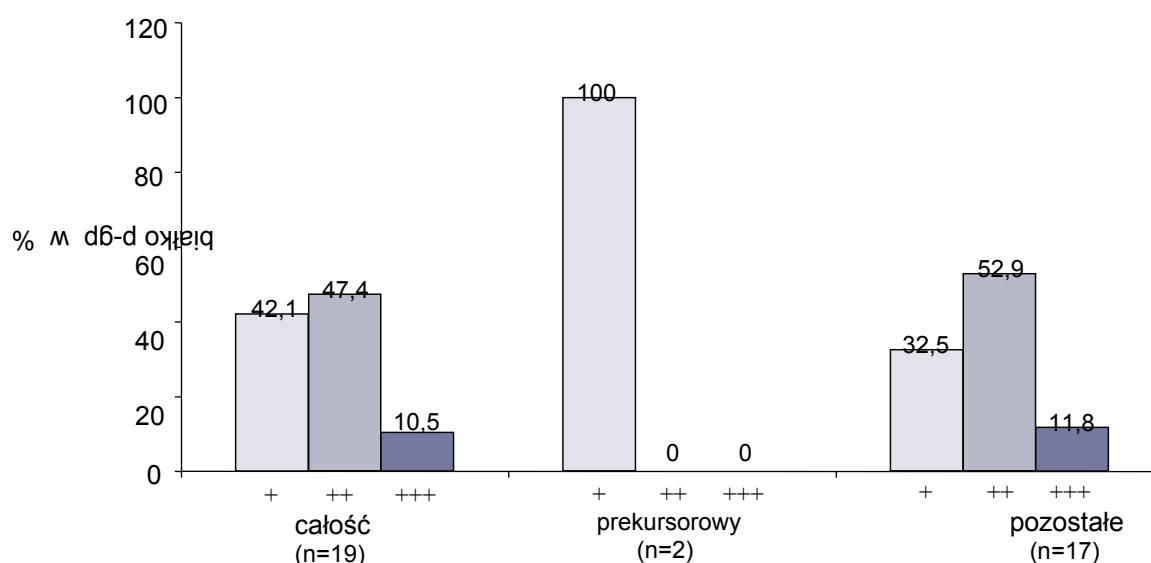
RYC. 3. Intensywność ekspresji p-gp w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



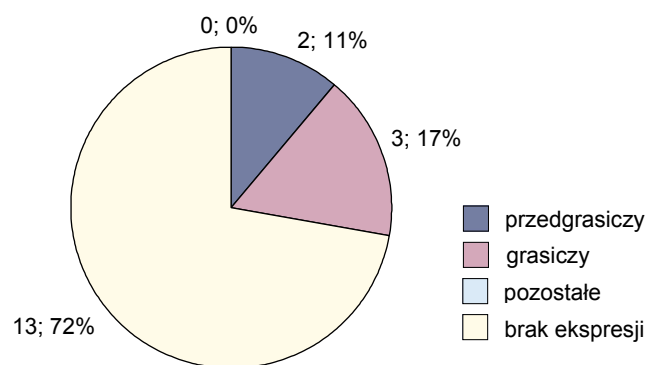
RYC. 4. Obecność p-gp w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



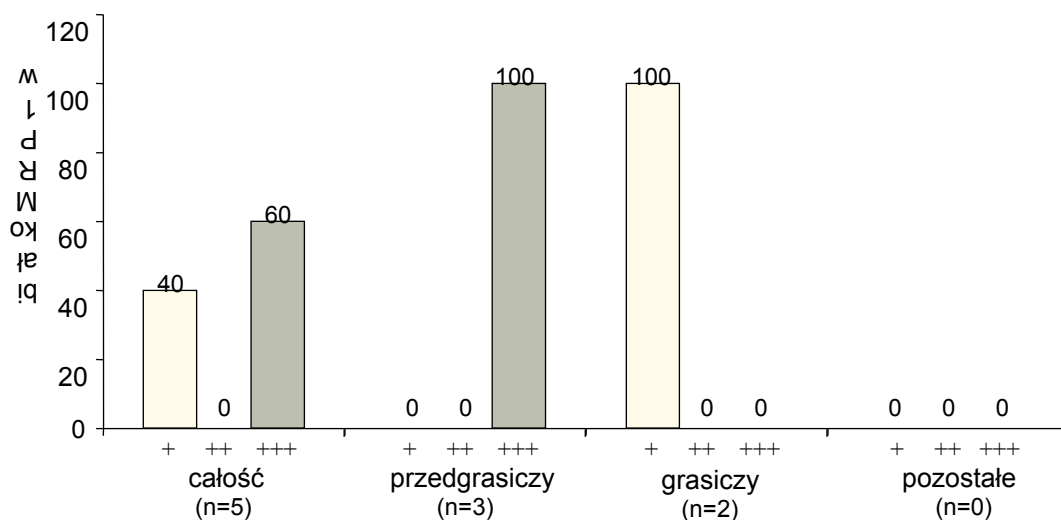
RYC. 5. Ilościowa ocena obecności p-gp w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



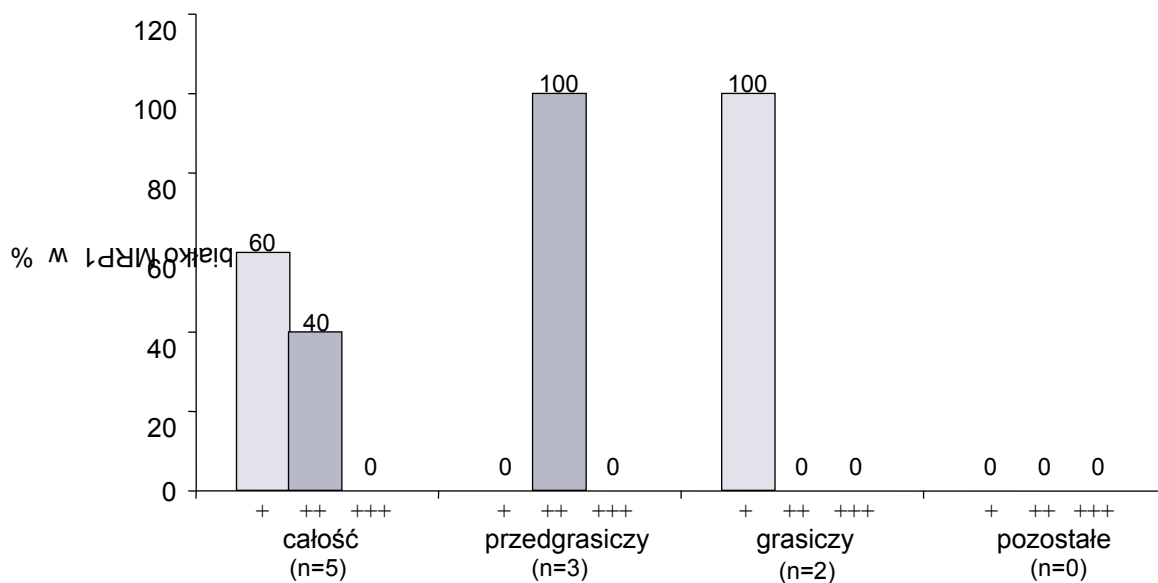
RYC. 6. Intensywność ekspresji p-gp w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



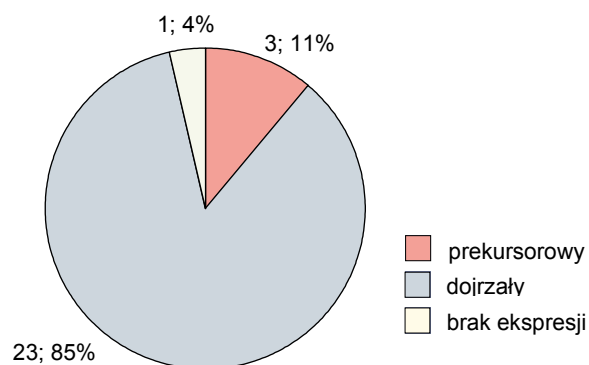
RYC. 7. Obecność MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



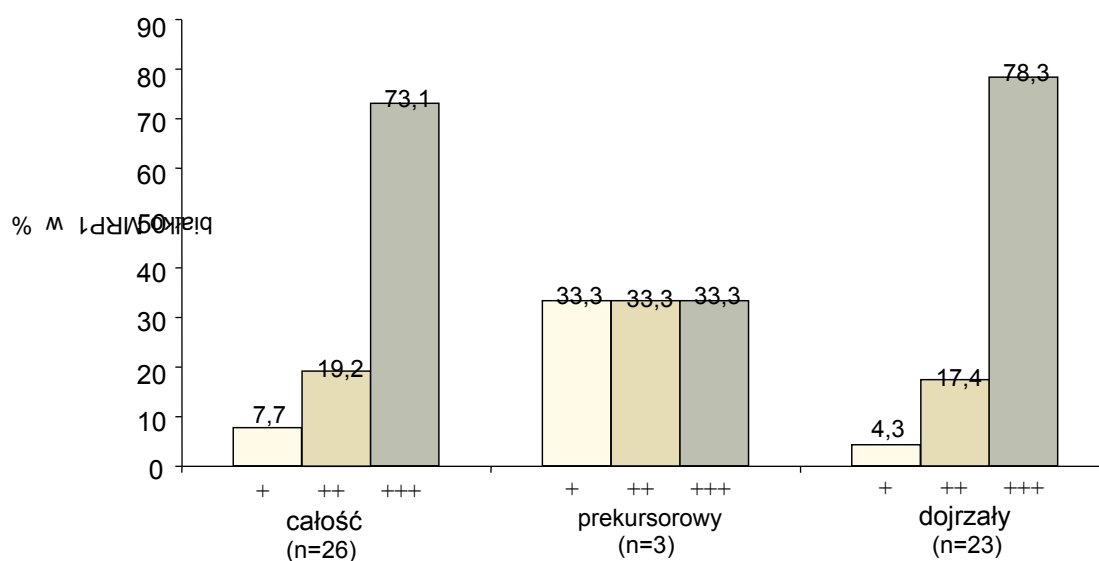
RYC. 8. Ilościowa ocena obecności MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



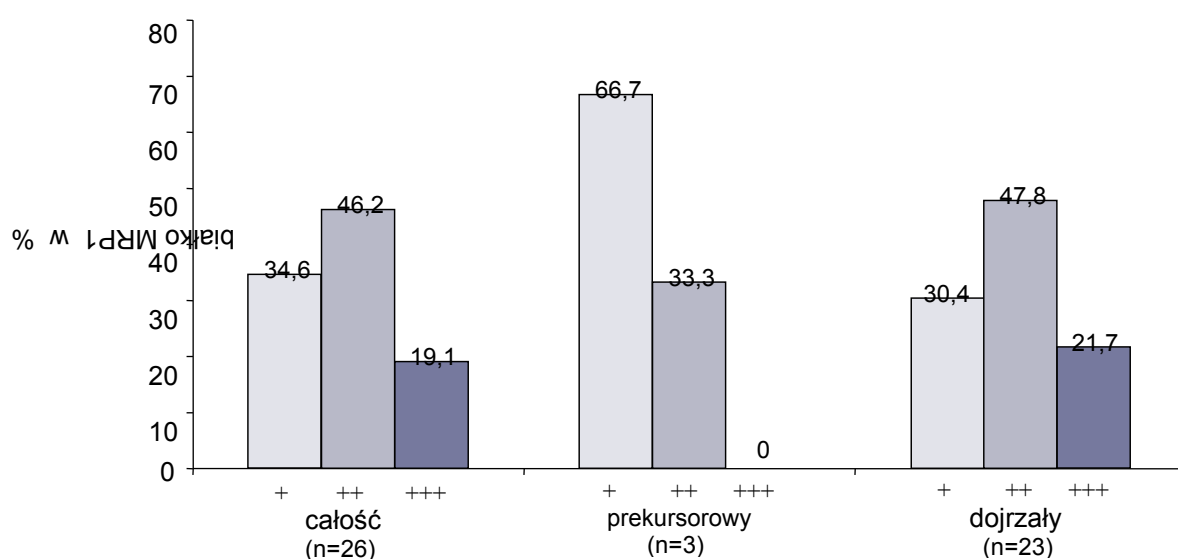
RYC. 9. Intensywność ekspresji MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



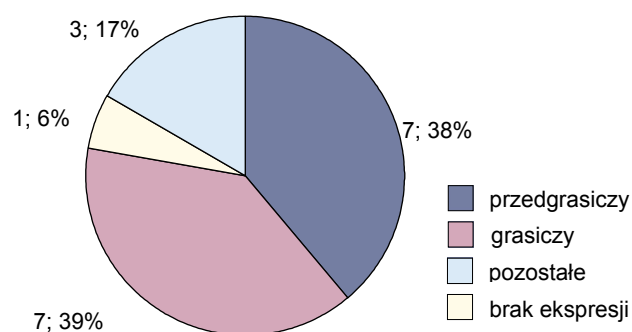
RYC. 10. Obecność MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



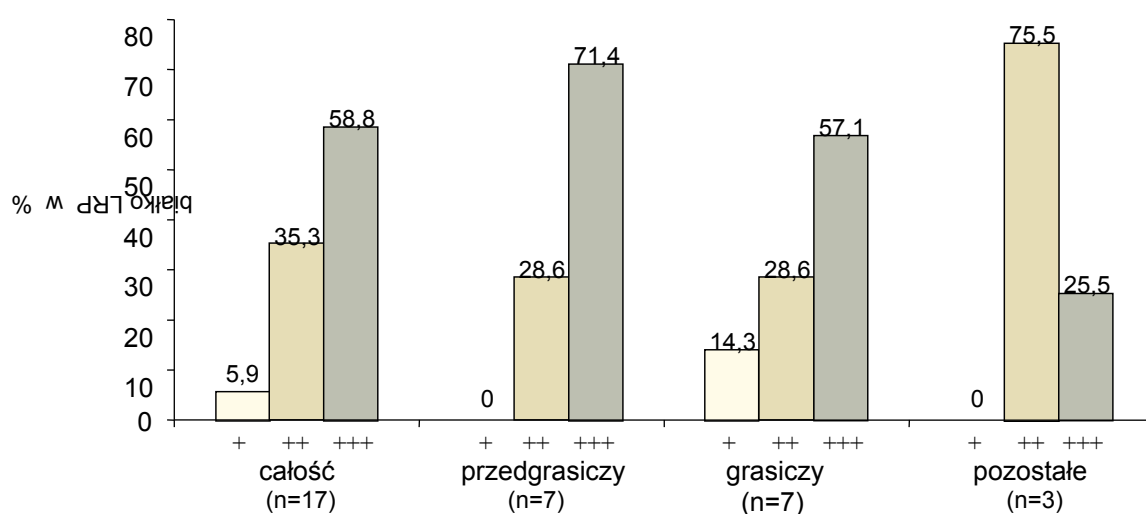
Ryc. 11. Ilościowa ocena obecności MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



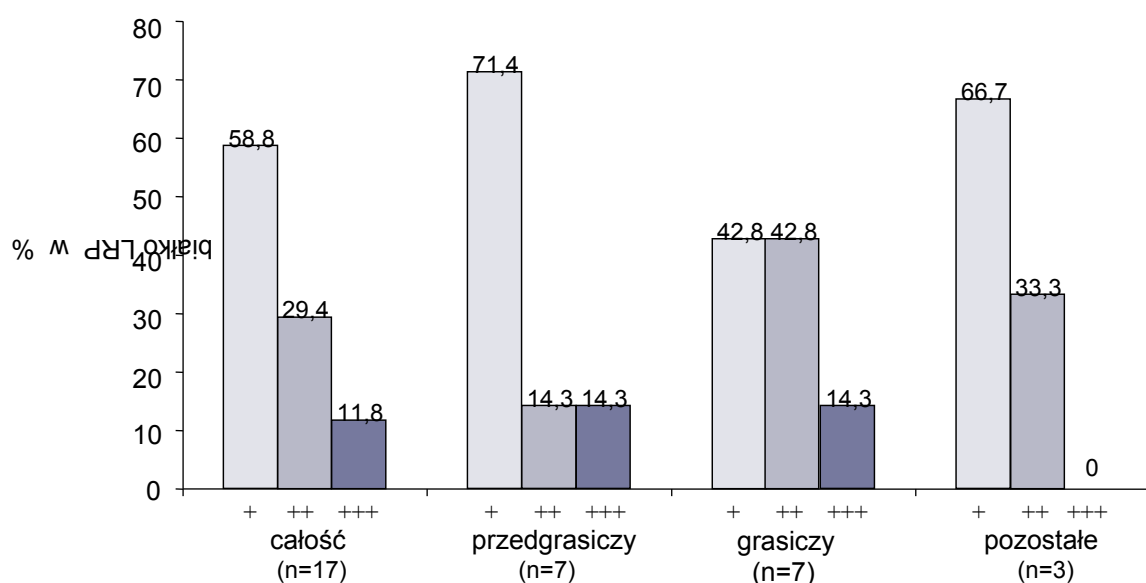
Ryc. 12. Intensywność ekspresji MRP1 w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



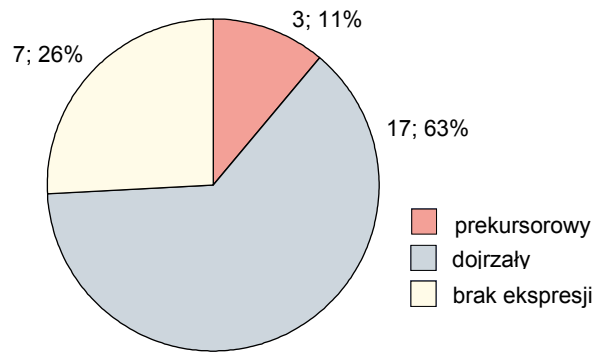
Ryc. 13. Obecność LRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



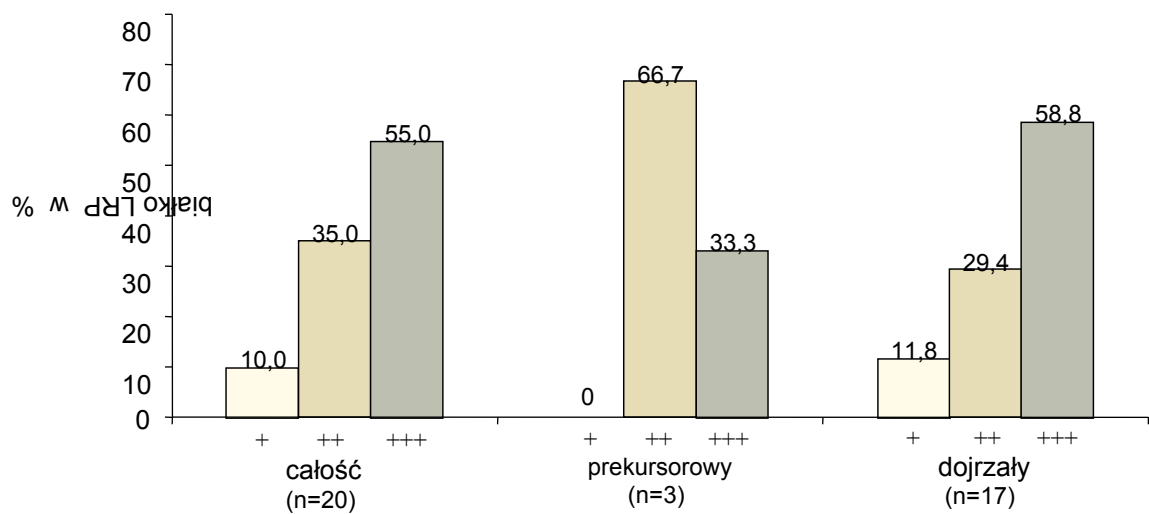
Ryc. 14. Ilościowa ocena obecności LRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



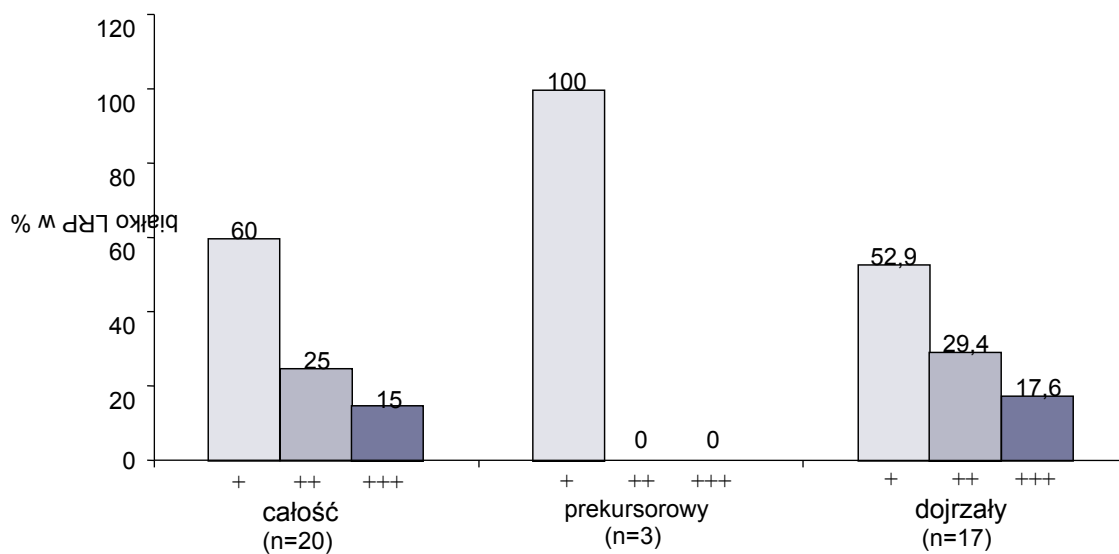
Ryc. 15. Intensywność ekspresji LRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



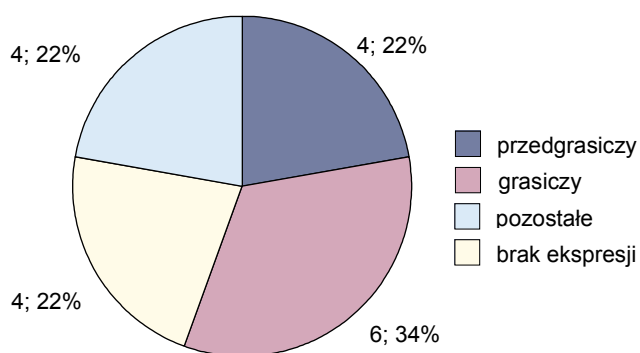
Ryc. 16. Obecność LRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



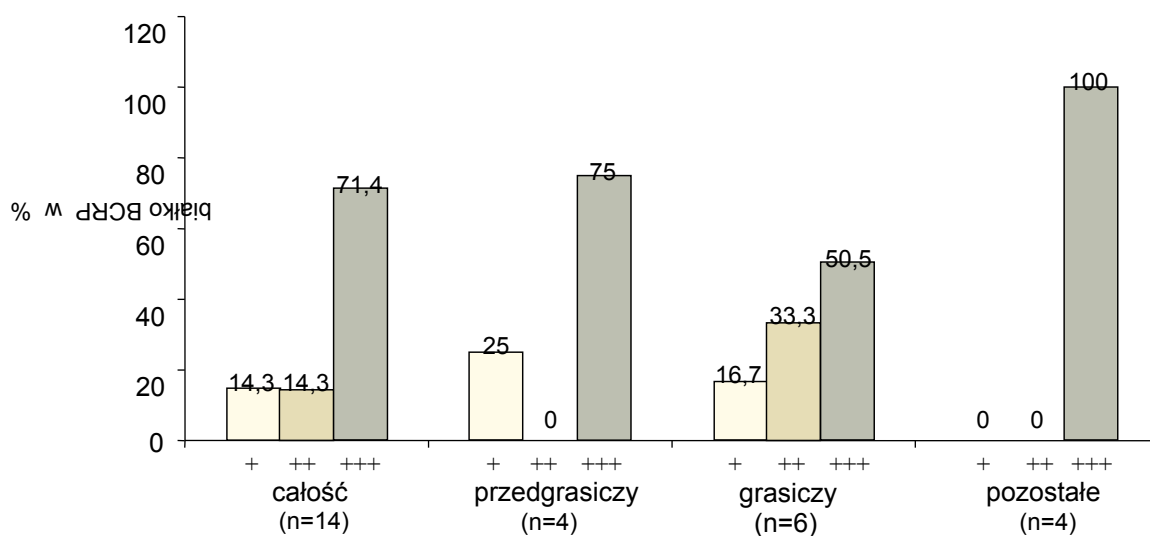
Ryc. 17. Ilościowa ocena obecności LRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



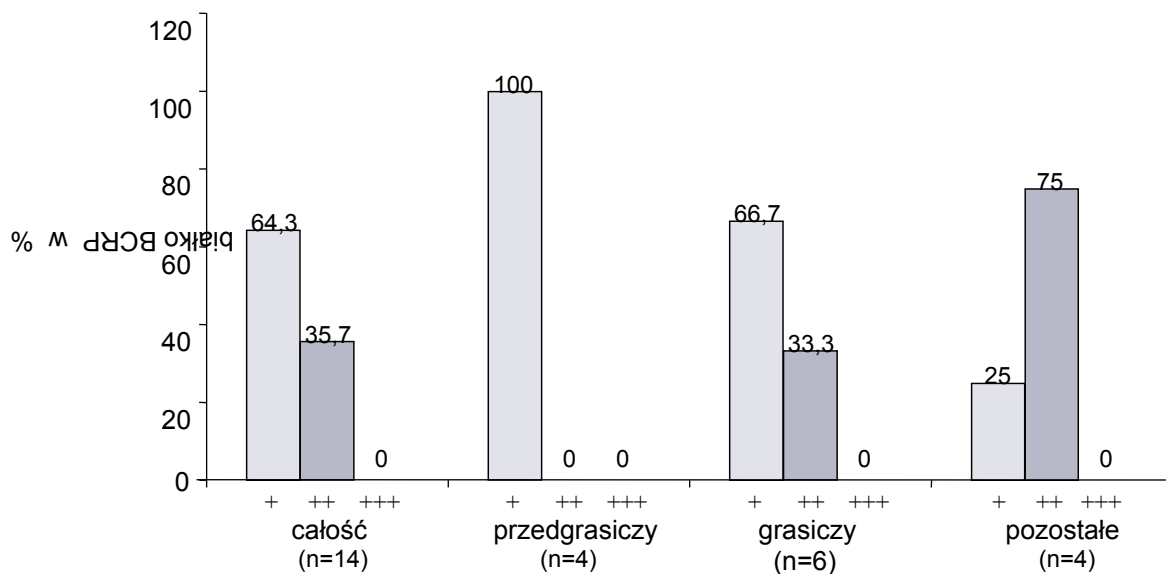
Ryc. 18. Intensywność ekspresji LRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



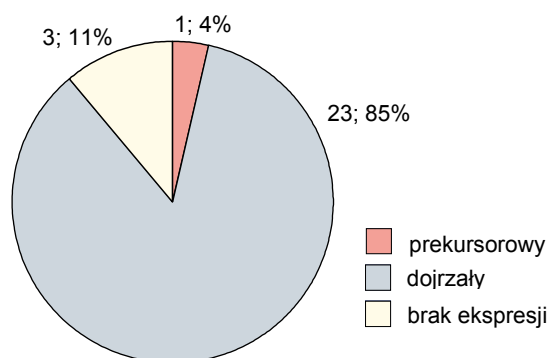
Ryc. 19. Obecność BCRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



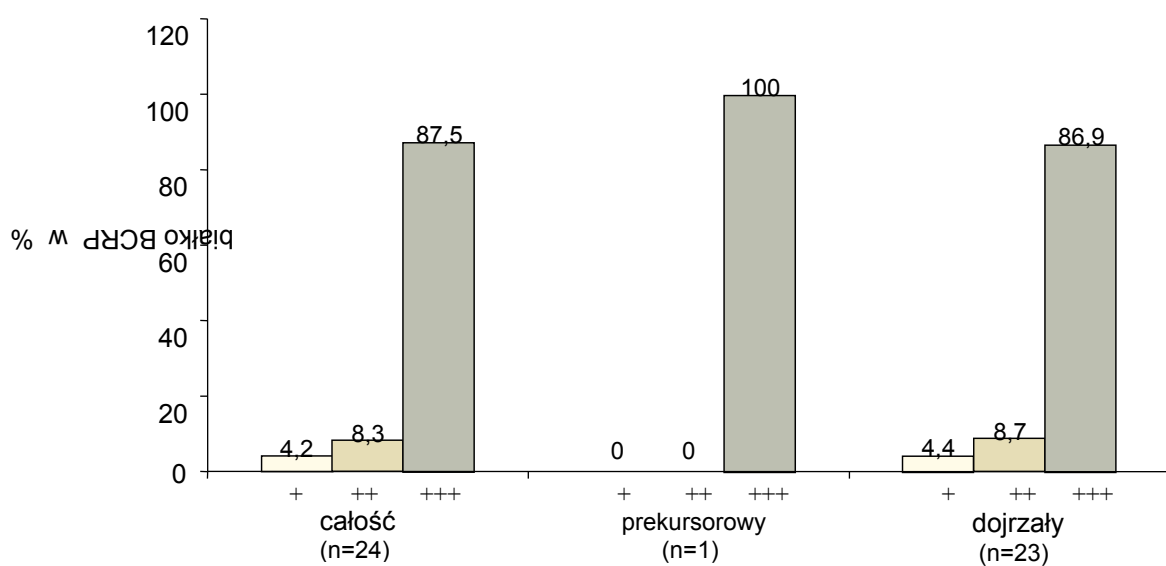
Ryc. 20. Ilościowa ocena obecności BCRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



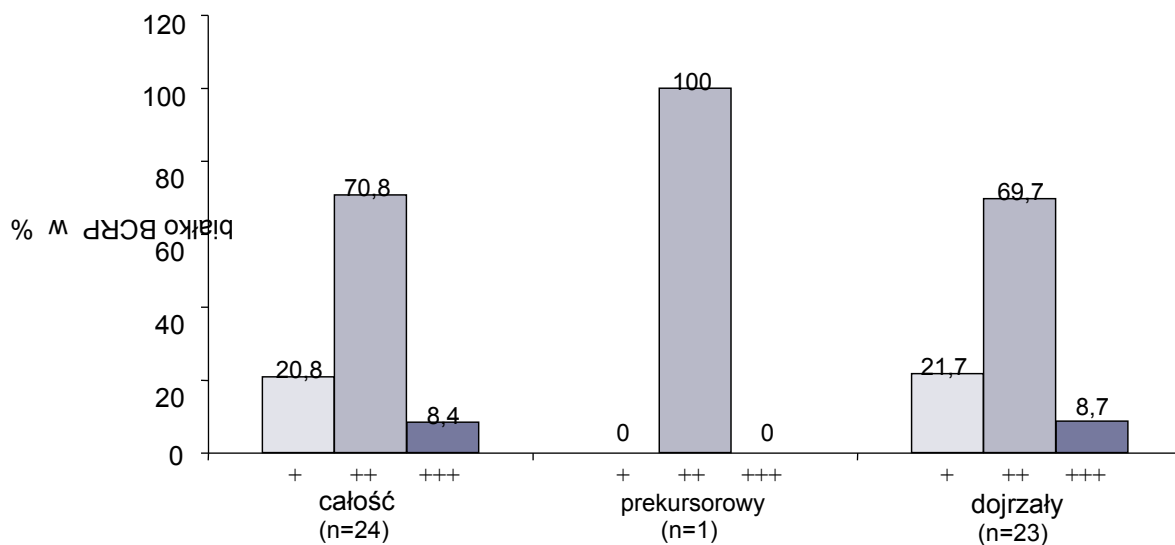
Ryc. 21. Intensywność ekspresji BCRP w chłoniakach o immunofenotypie T-komórkowym



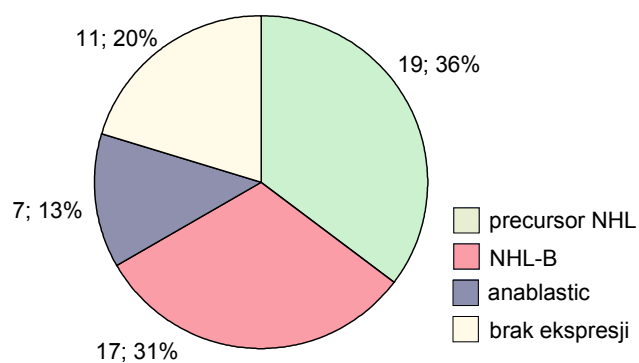
Ryc. 22. Obecność BCRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



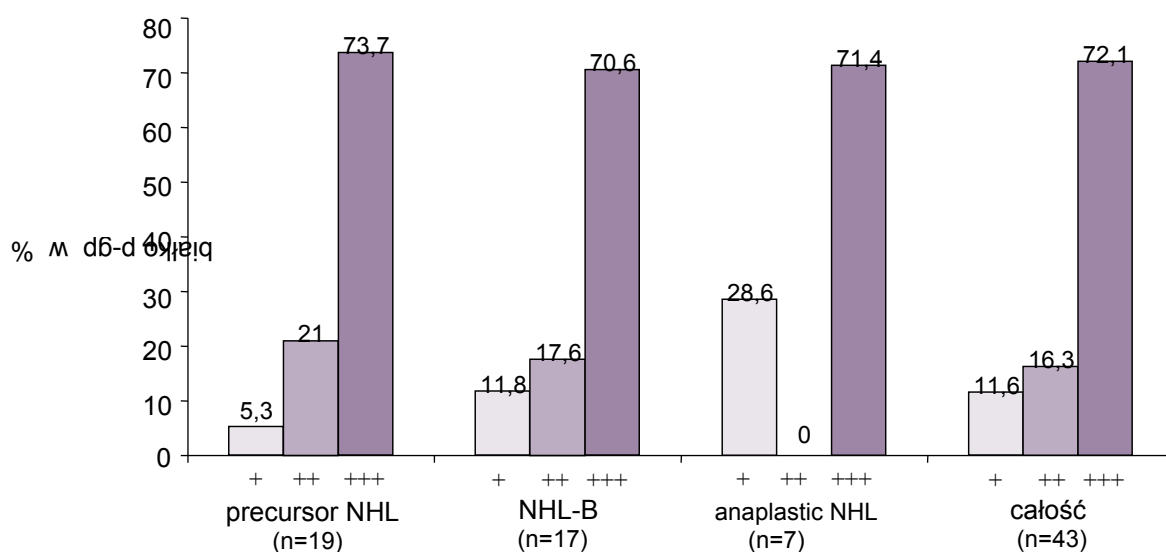
Ryc. 23. Ilościowa ocena obecności BCRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



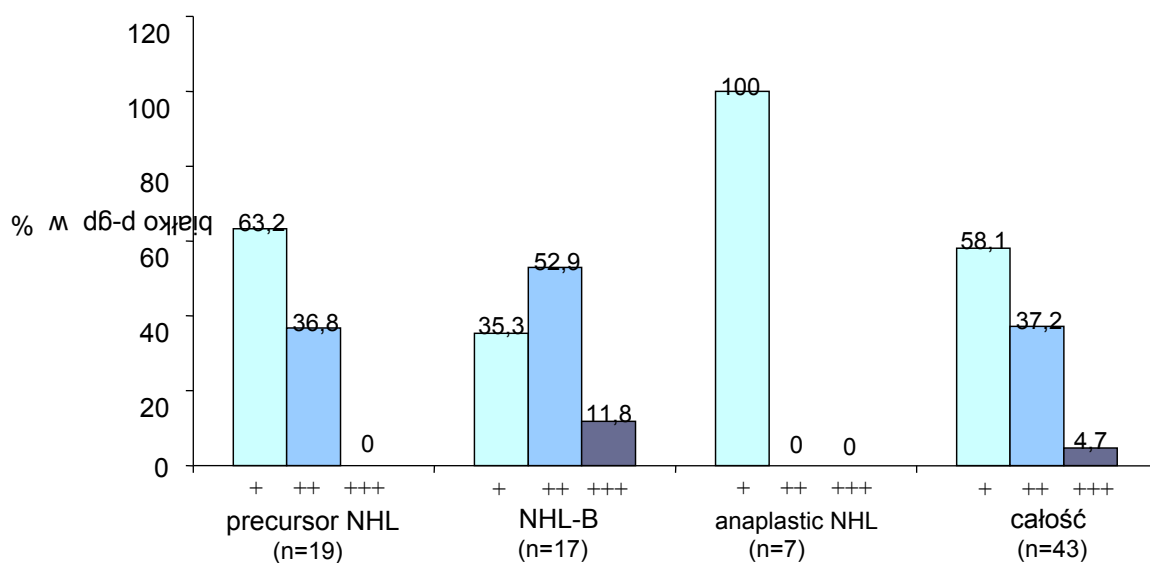
Ryc. 24. Intensywność ekspresji BCRP w chłoniakach o immunofenotypie B-komórkowym



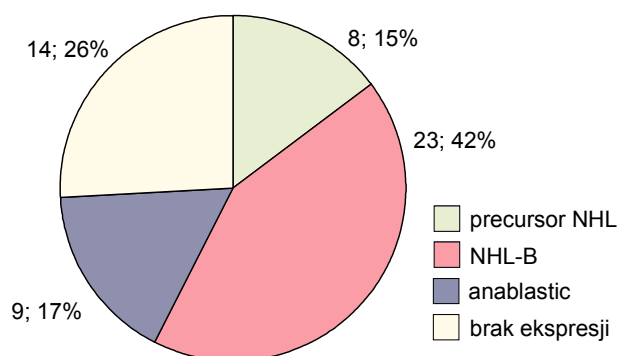
Ryc. 26. Obecność p-gp w zależności od typu klinicznego chłoniaka



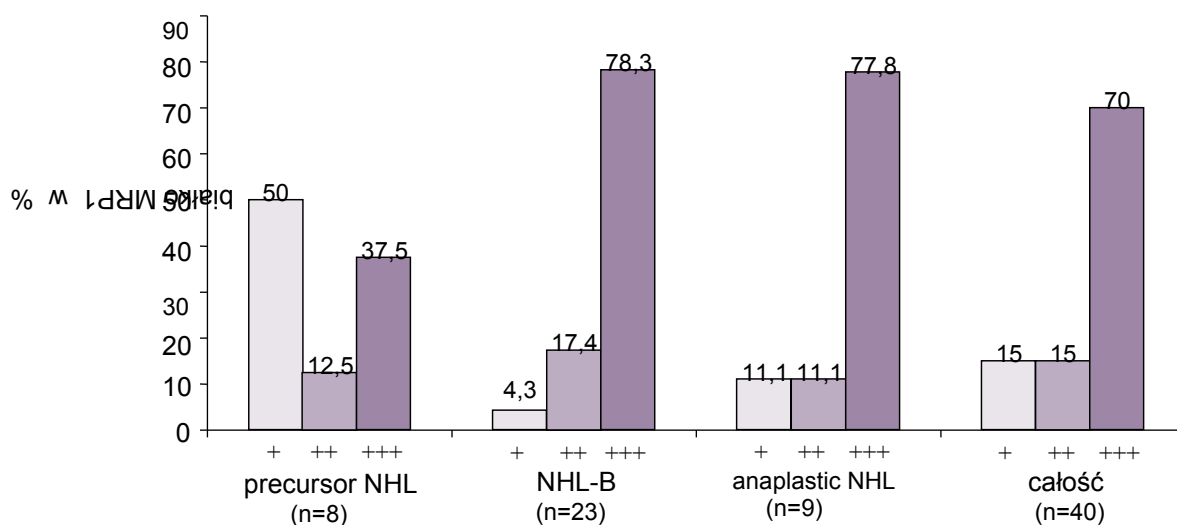
Ryc. 27. Ilościowa ocena obecności p-gp w zależności od typu klinicznego chłoniaka



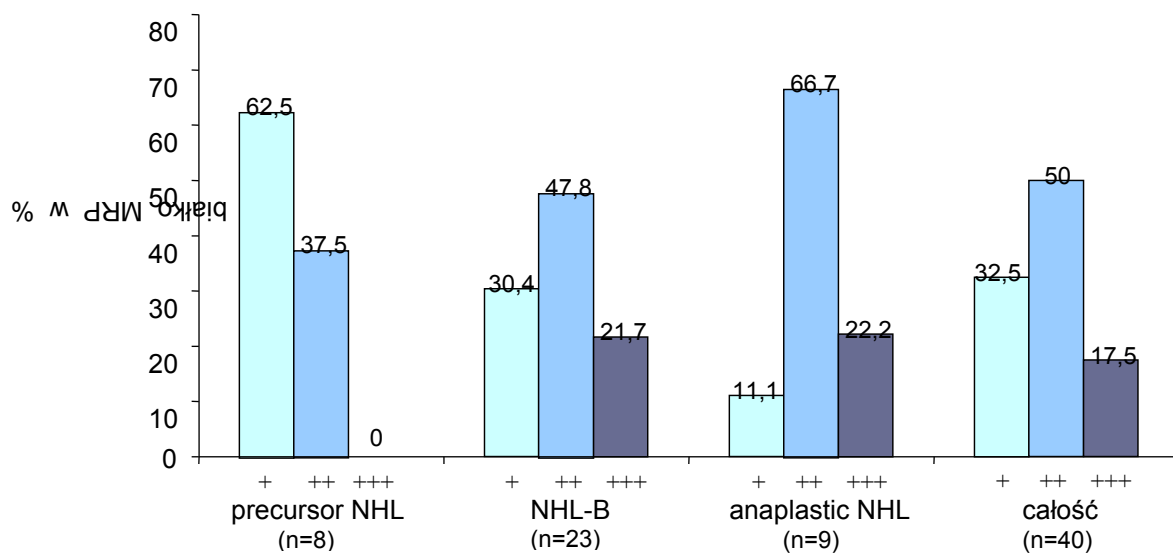
Ryc. 28. Intensywność ekspresji p-gp w zależności od typu klinicznego chłoniaka



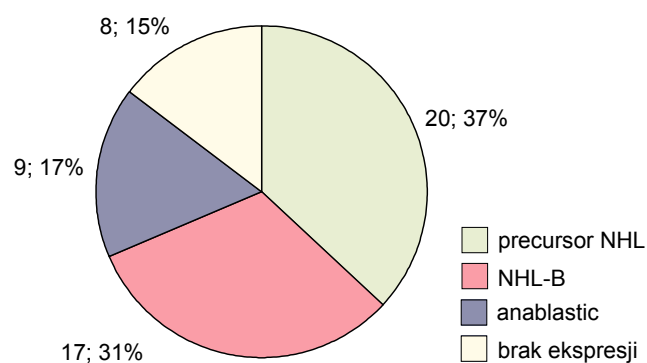
Ryc. 29. Obecność MRP1 w zależności od typu klinicznego chłoniaka



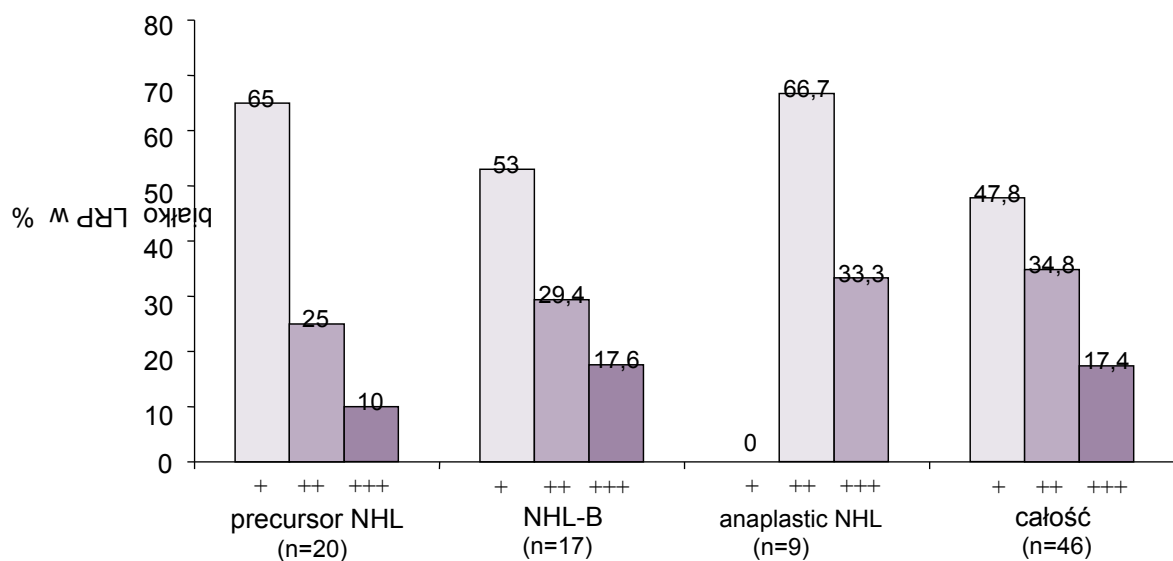
Ryc. 30. Ilościowa ocena obecności MRP1 w zależności od typu klinicznego chłoniaka



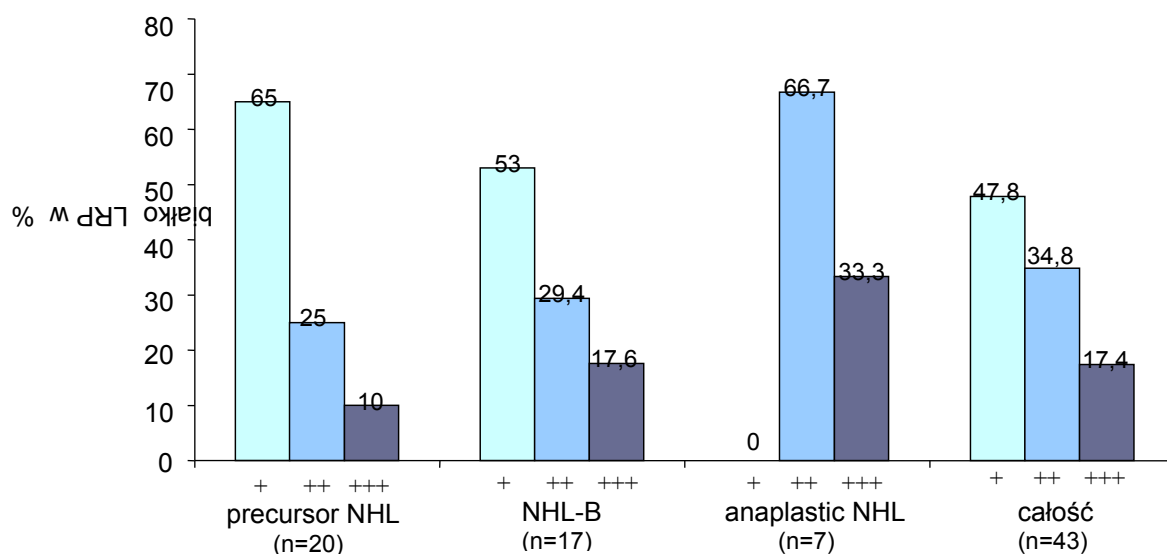
Ryc. 31. Intensywność ekspresji MRP1 w zależności od typu klinicznego chłoniaka



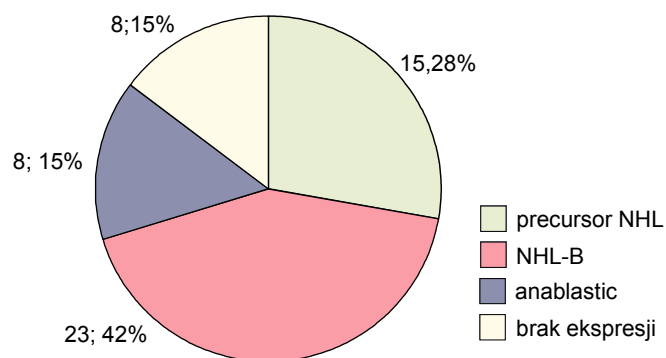
Ryc. 32. Obecność LRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka



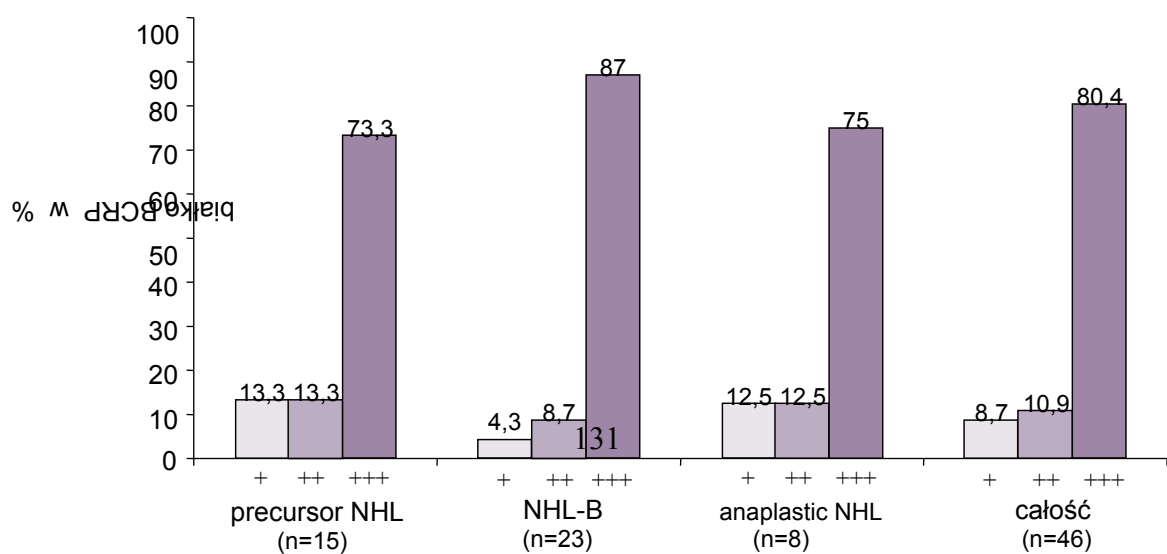
Ryc. 33. Ilościowa ocena obecności LRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka

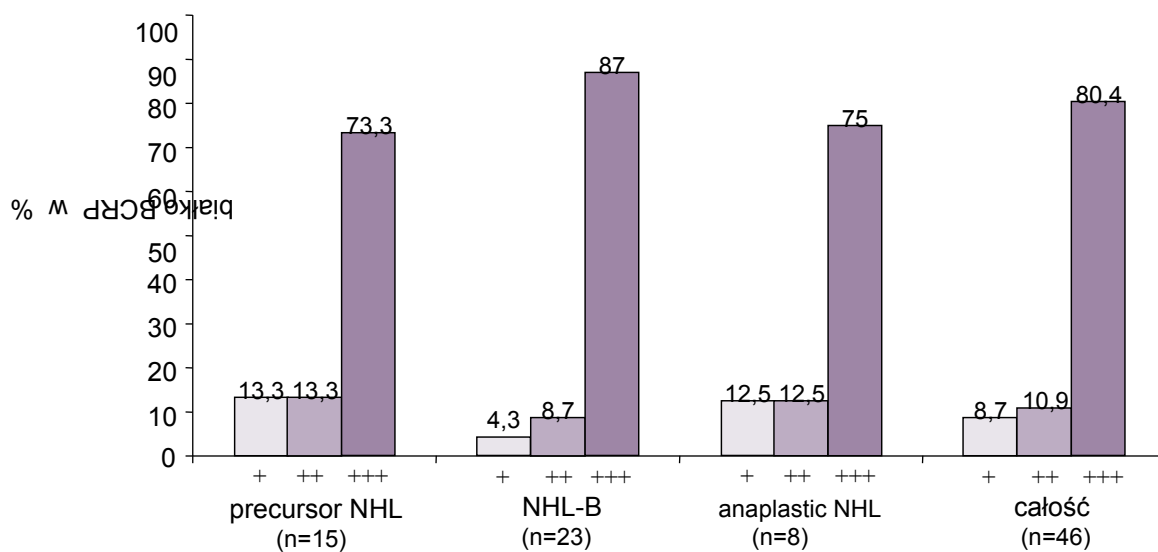


Ryc. 34. Intensywność ekspresji LRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka

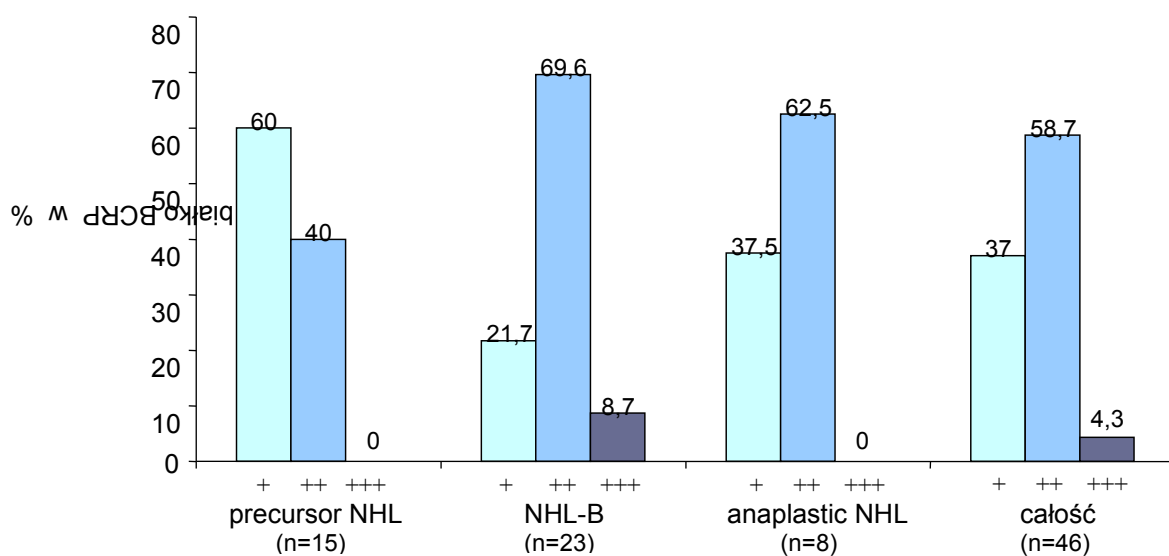


Ryc. 35. Obecność BCRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka

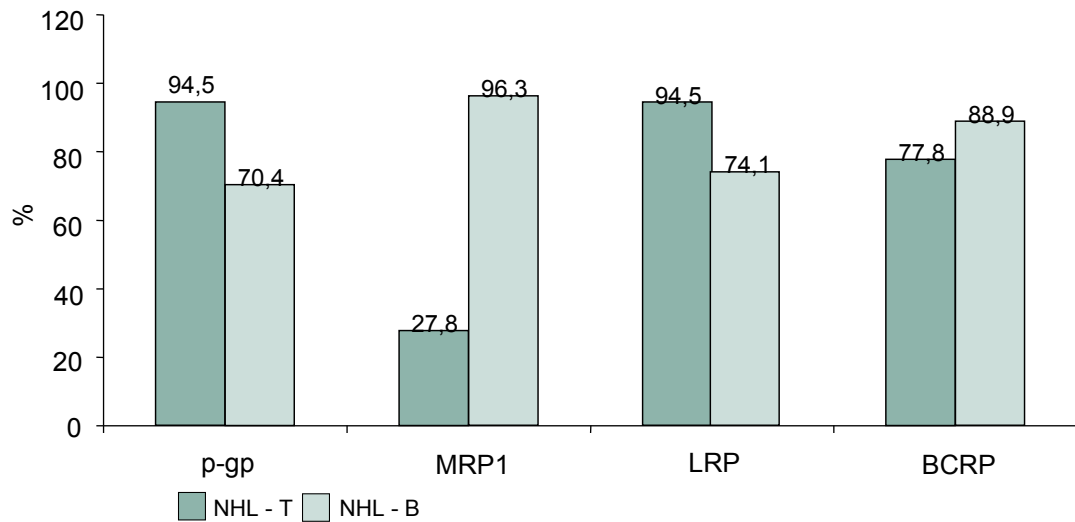




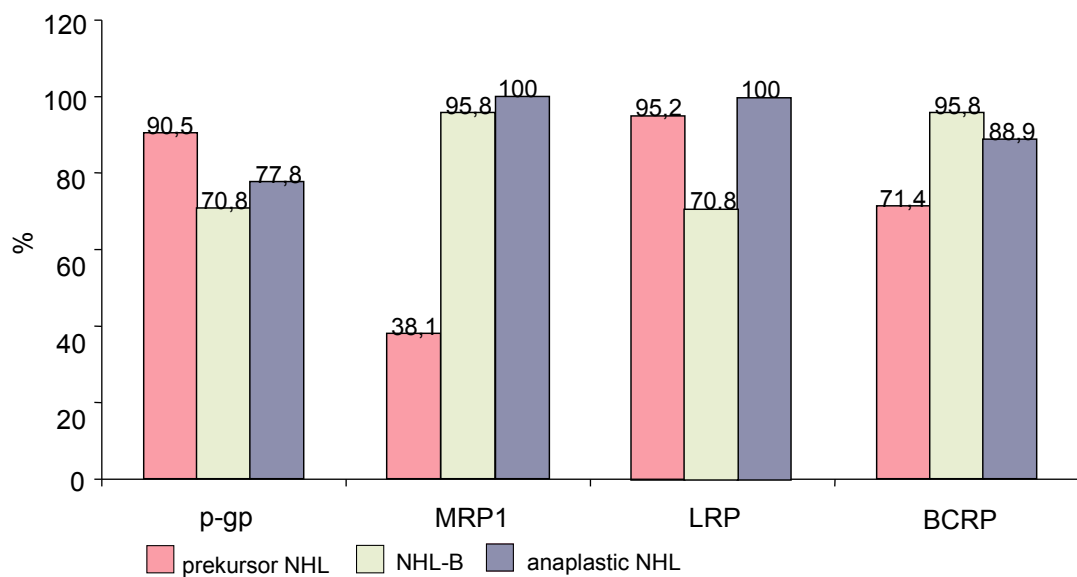
Ryc. 36. Ilościowa ocena BCRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka



Ryc. 37. Intensywność ekspresji BCRP w zależności od typu klinicznego chłoniaka

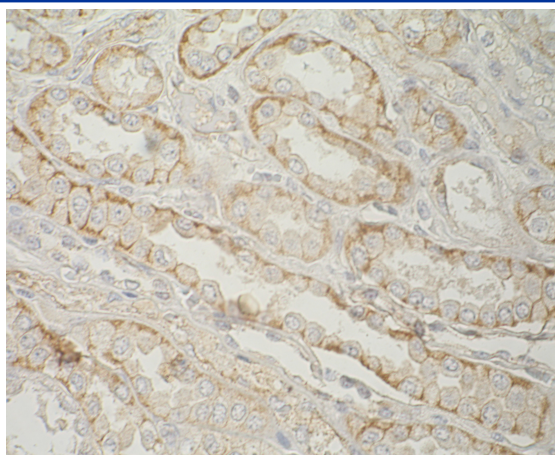


Ryc. 25. Występowanie białek oporności wielolekowej w zależności od immunofenotypu chłoniaka (NHL–T, NHL–B)

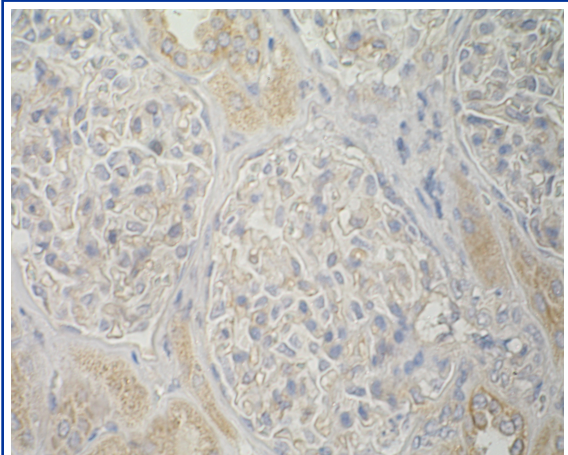


Ryc. 38. Występowanie białek oporności wielolekowej w zależności od typu klinicznego chłoniaka

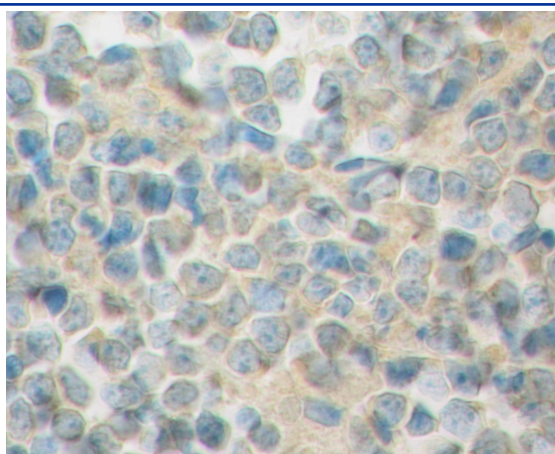
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – p-gp (1)



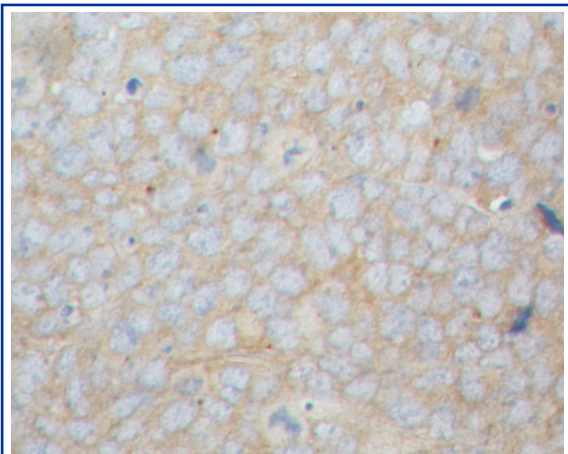
Fot. 1. p-gp: kontrola pozytywna
nerka: ekspresja p-gp
w kanalikach nerkowych



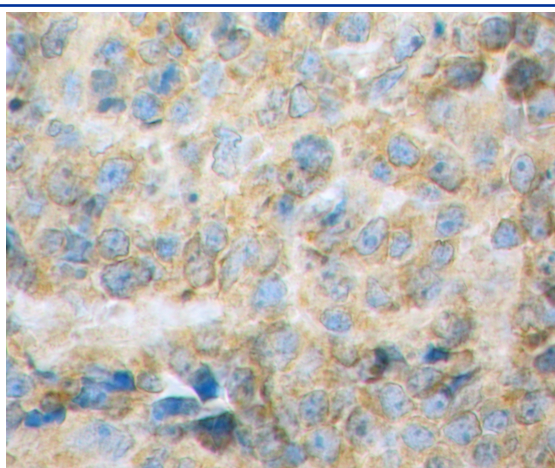
Fot. 2. p-gp: kontrola negatywna
nerka: brak ekspresji p-gp
w kłębuszkach nerkowych



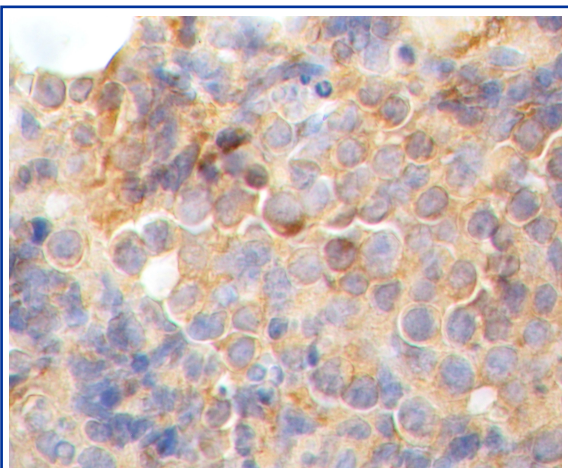
Fot. 3. białko p-gp:
intensywność ekspresji +
NHL-B, pacjent nr 42



Fot. 4. białko p-gp:
intensywność ekspresji ++
NHL-B, pacjent nr 33

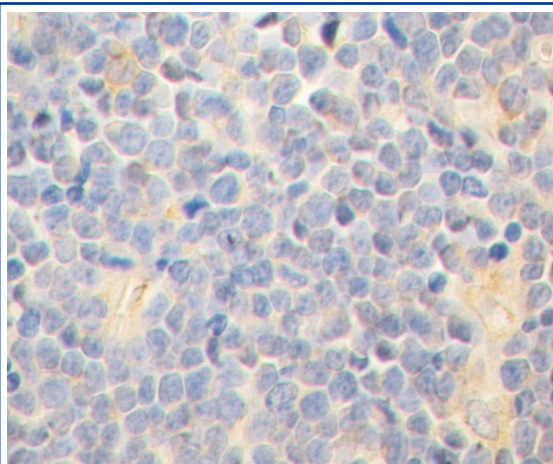


Fot. 5. białko p-gp:
intensywność ekspresji +++
NHL-B, pacjent nr 37

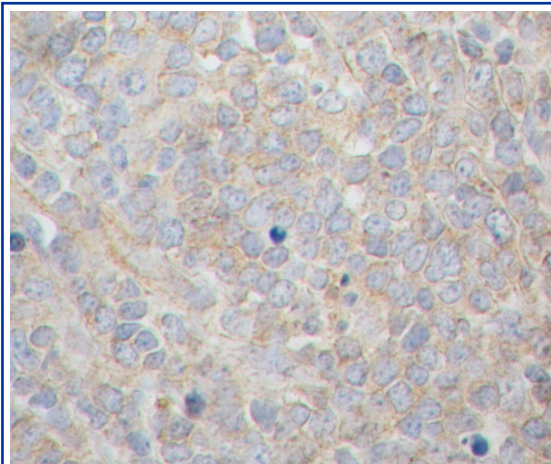


Fot. 6. białko p-gp:
intensywność ekspresji +++
NHL-B, pacjent nr 25

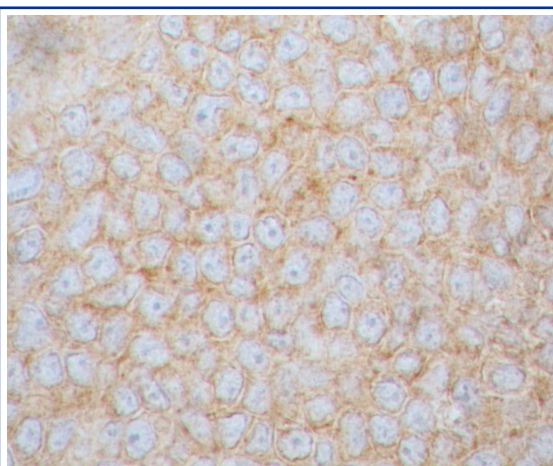
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych u dzieci – p-gp (2)



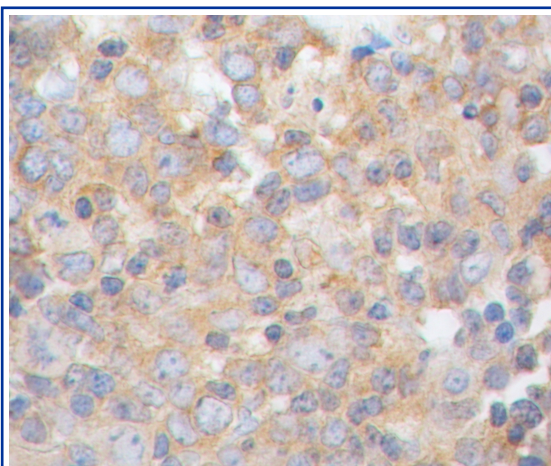
Fot. 7. białko p-gp:
brak ekspresji –
precursor NHL-T, pacjent nr 15



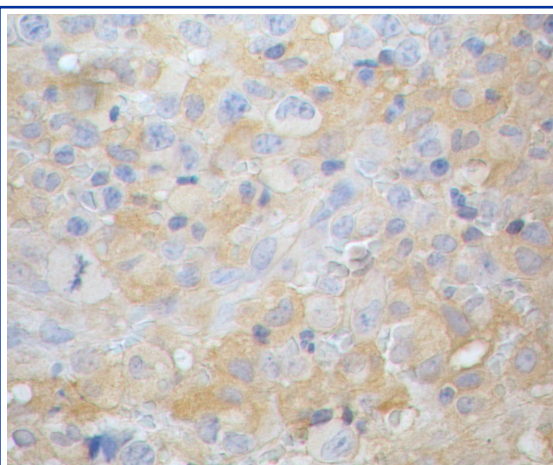
Fot. 8. białko p-gp:
intensywność ekspresji +
precursor NHL-T, pacjent nr 8



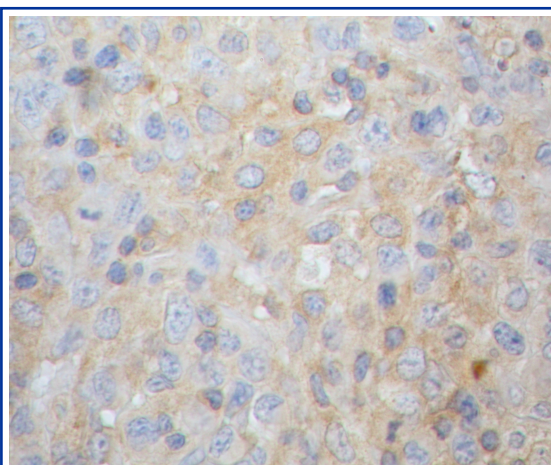
Fot. 9. białko p-gp:
intensywność ekspresji ++
mature NHL-T, pacjent nr 3



Fot. 10. białko p-gp:
intensywność ekspresji ++
precursor NHL-T, pacjent nr 1

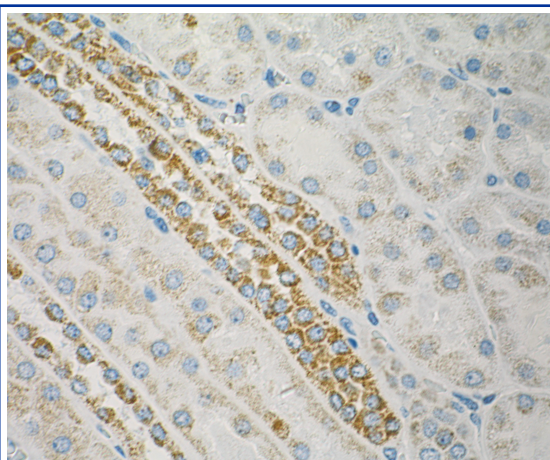


Fot. 11. białko p-gp:
intensywność ekspresji +
ALCL, pacjent nr 46

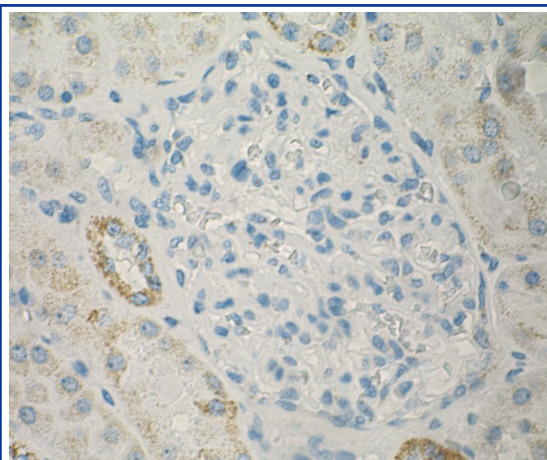


Fot. 12. białko p-gp:
intensywność ekspresji +
ALCL, pacjent nr 51

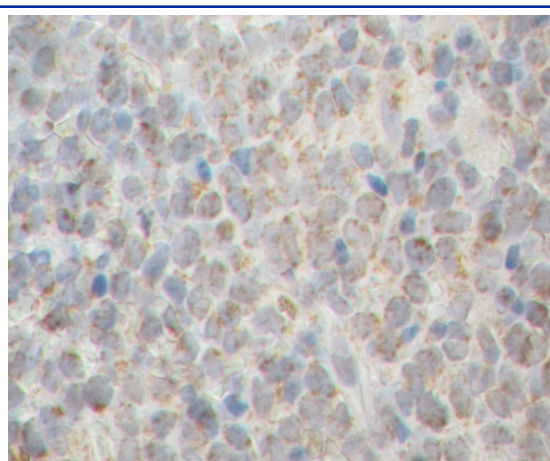
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach
nieziarniczych u dzieci – MRP1(1)



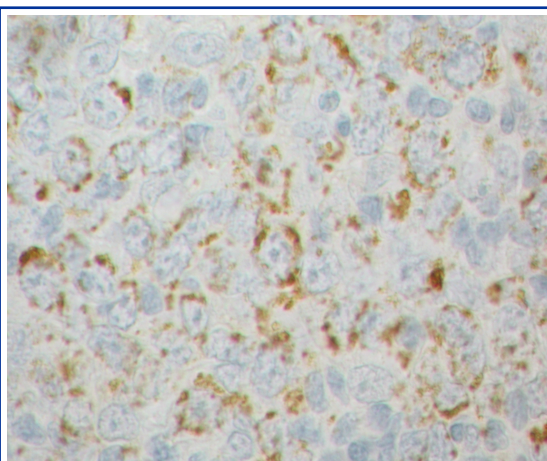
Fot. 13. MRP1: kontrola pozytywna
nerka: ekspresja MRP1
w kanalikach nerkowych



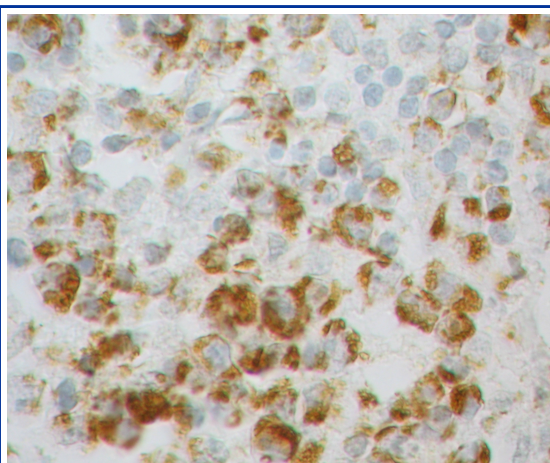
Fot. 14. MRP1: kontrola negatywna
nerka: brak ekspresji MRP1
w kłębuszku nerkowym



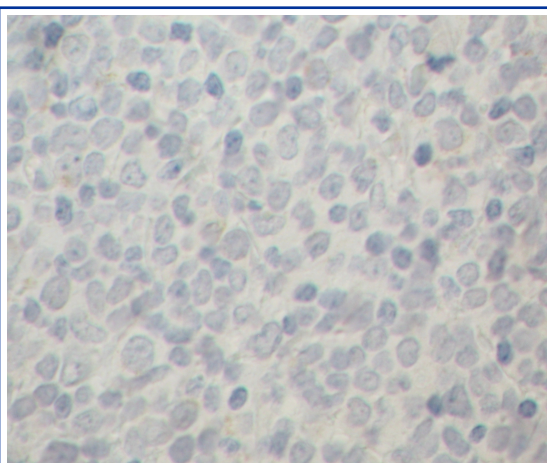
Fot. 15. białko MRP1:
intensywność ekspresji +



Fot. 16. białko MRP1:
intensywność ekspresji ++

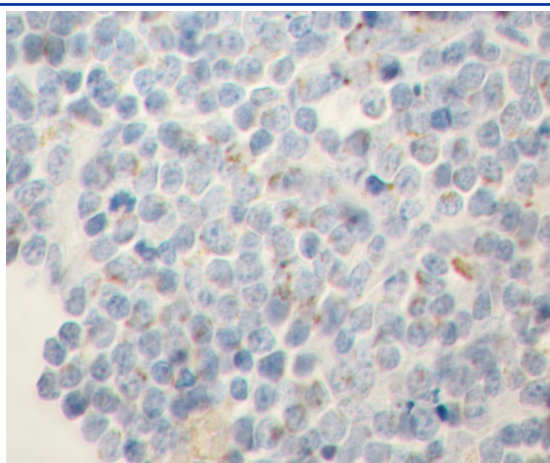


Fot. 17. białko MRP1:
intensywność ekspresji +++

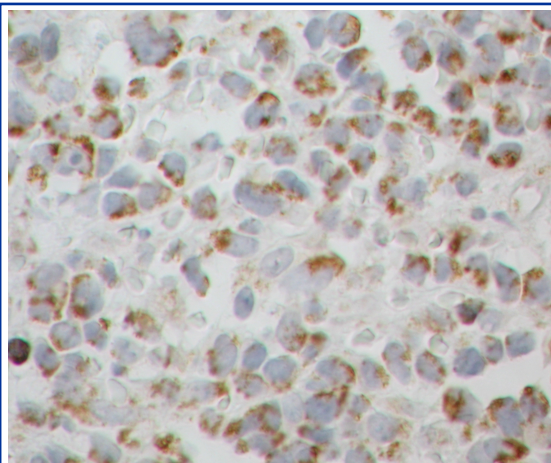


Fot. 18. białko MRP1:
brak ekspresji –
precursor NHL-T, pacjent nr 1

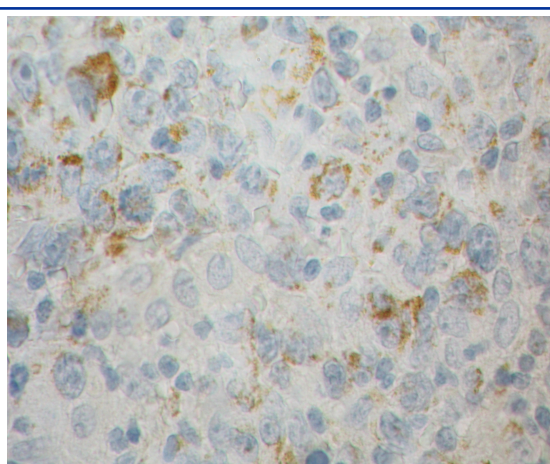
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach
nieziarniczych u dzieci – MRP1(2)



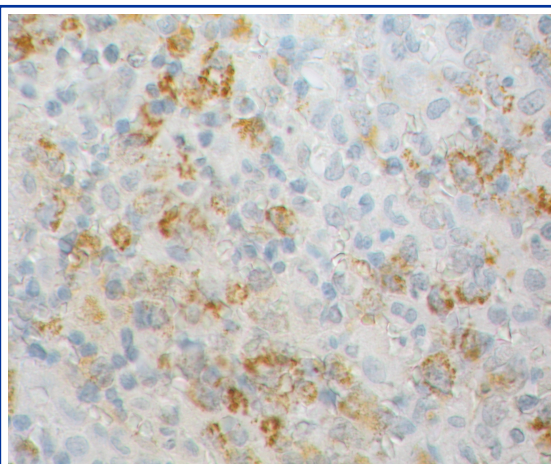
Fot. 19. białko MRP1:
intensywność ekspresji +
precursor NHL-T, pacjent nr 8



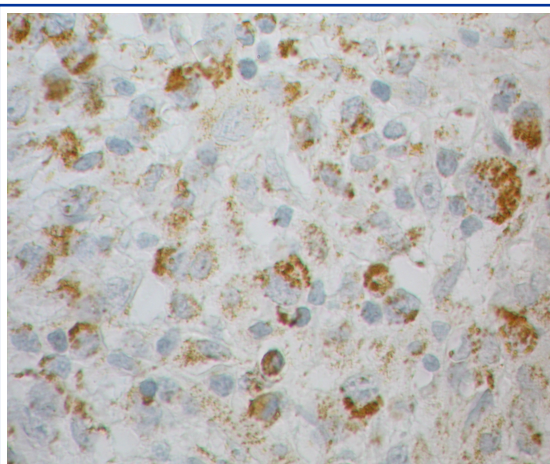
Fot. 20. białko MRP1:
intensywność ekspresji ++
precursor NHL-T, pacjent nr



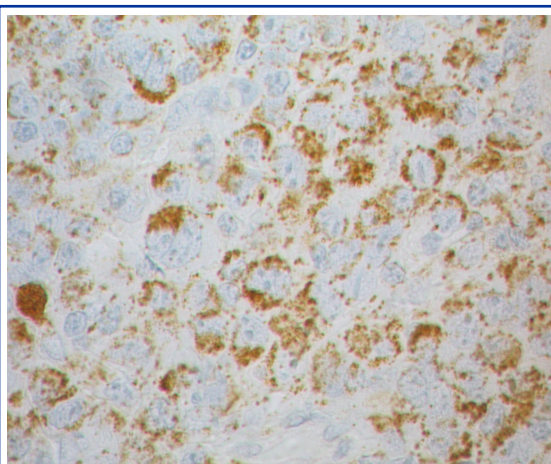
Fot. 21. białko MRP1:
intensywność ekspresji +
ALCL, pacjent nr 50



Fot. 22. białko MRP1:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 46

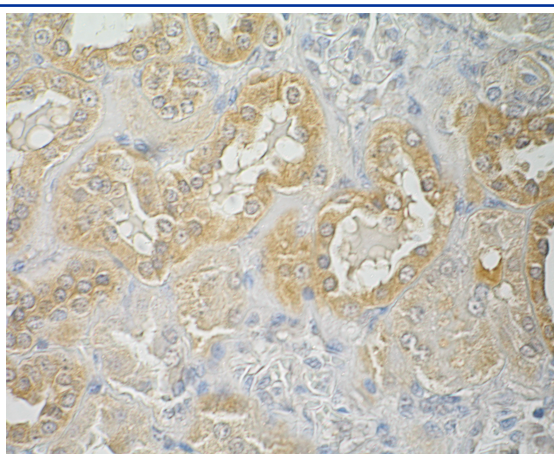


Fot. 23. białko MRP1:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 51

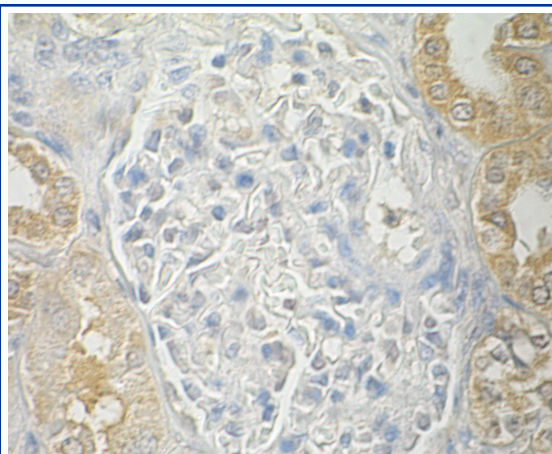


Fot. 24. białko MRP1:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 53

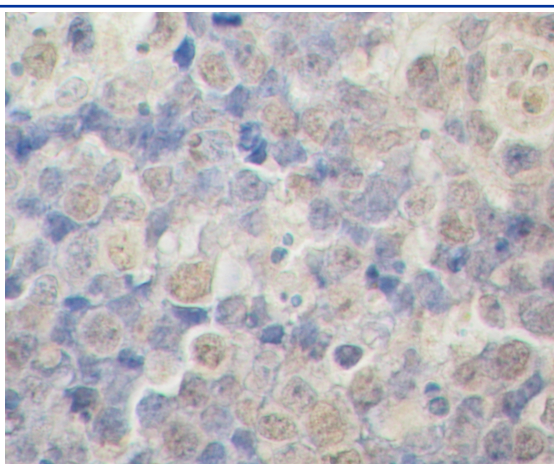
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych u dzieci – LRP (1)



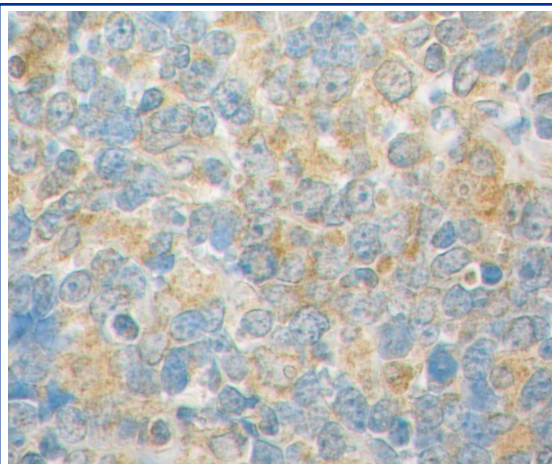
Fot. 25. LRP: kontrola pozytywna
nerka: ekspresja LRP
w kanalikach nerkowych



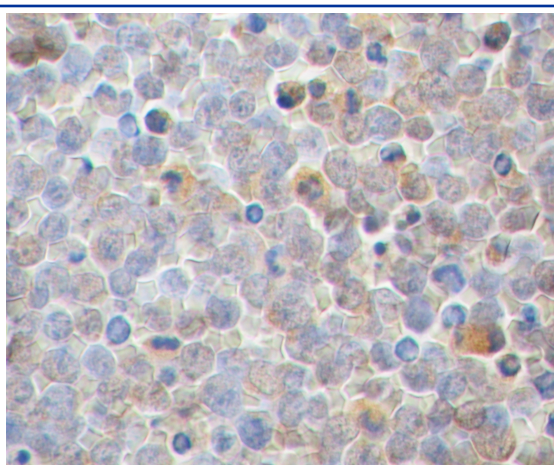
Fot. 26. LRP: kontrola negatywna
nerka: brak ekspresji
w kłębuszku nerkowym



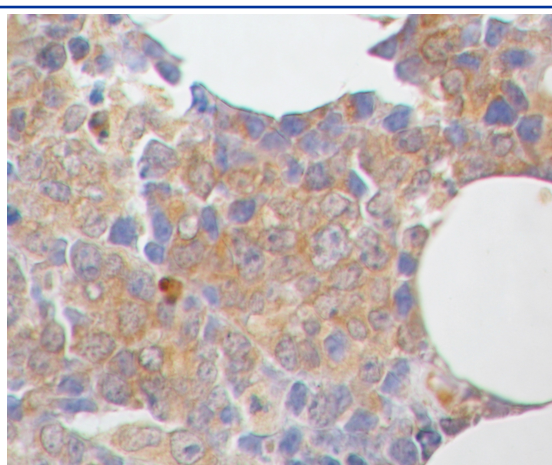
Fot. 27. białko LRP:
intensywność ekspresji +
NHL-B, pacjent nr 24



Fot. 28. białko LRP:
intensywność ekspresji ++
NHL-B, pacjent nr 37

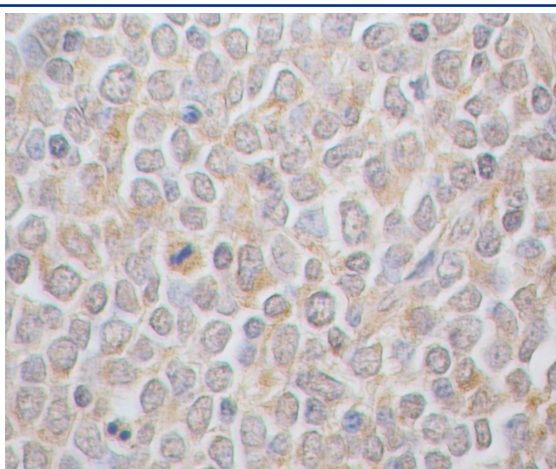


Fot. 29. białko LRP:
intensywność ekspresji ++
NHL-B, pacjent nr 39

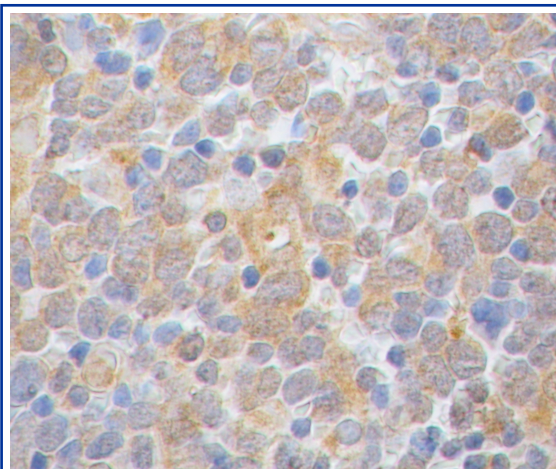


Fot. 30. białko LRP:
intensywność ekspresji +++
NHL-B, pacjent nr 29

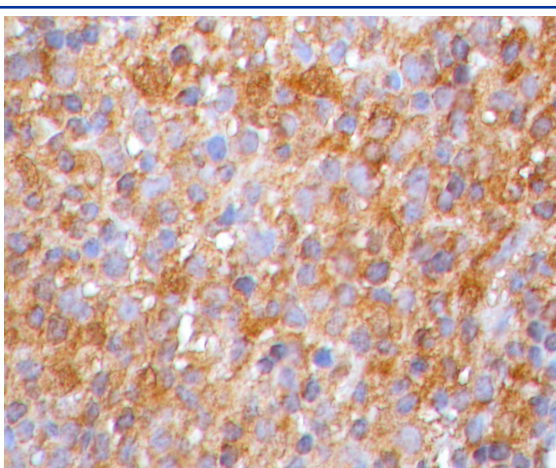
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych u dzieci – LRP (2)



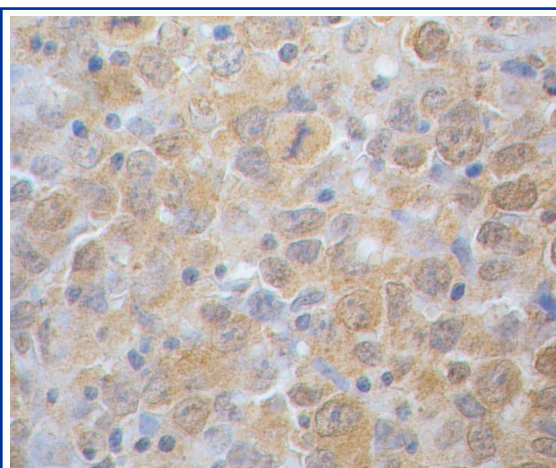
Fot. 31. białko LRP:
intensywność ekspresji +
precursor NHL-T, pacjent nr 5



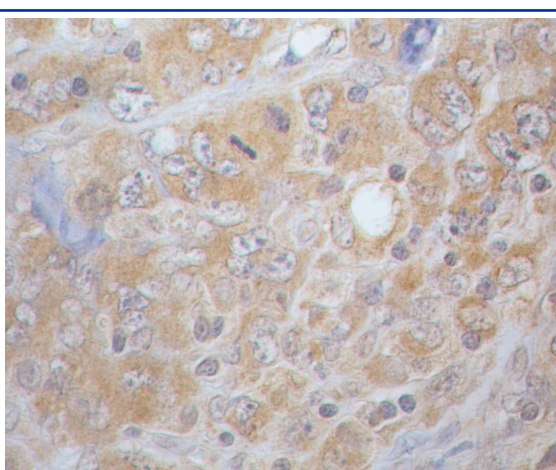
Fot. 32. białko LRP:
intensywność ekspresji ++



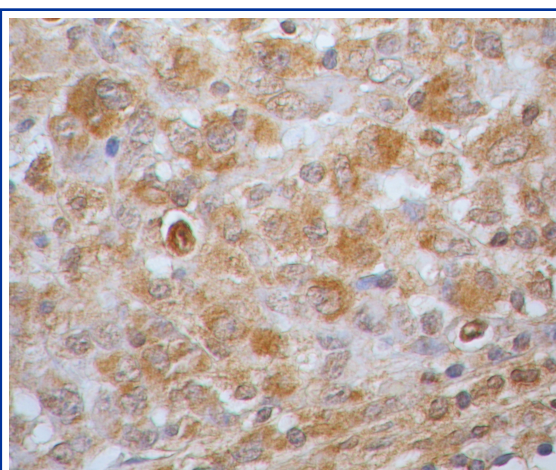
Fot. 33. białko LRP:
intensywność ekspresji +++
precursor NHL-T, pacjent nr 1



Fot. 34. białko LRP:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 50

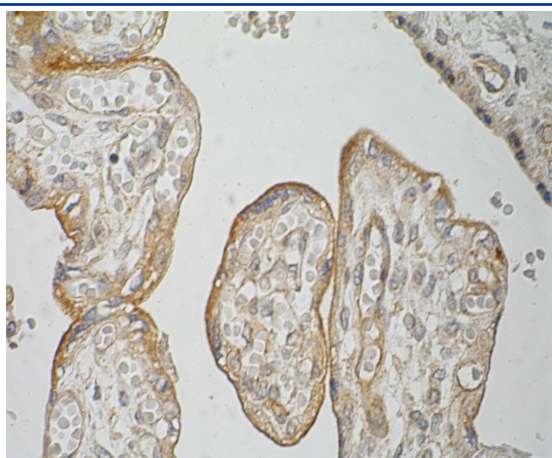


Fot. 35. białko LRP:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 54

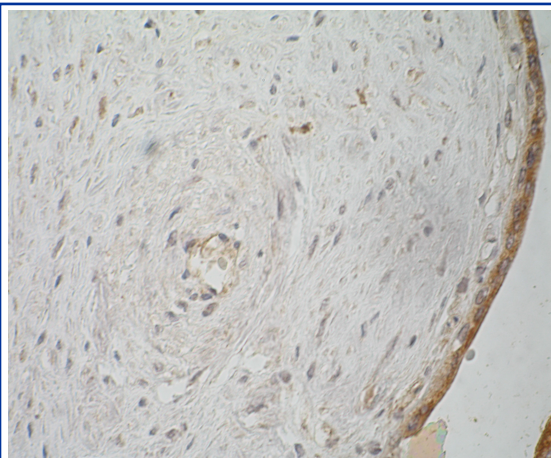


Fot. 36. białko LRP:
intensywność ekspresji +++
ALCL, pacjent nr 51

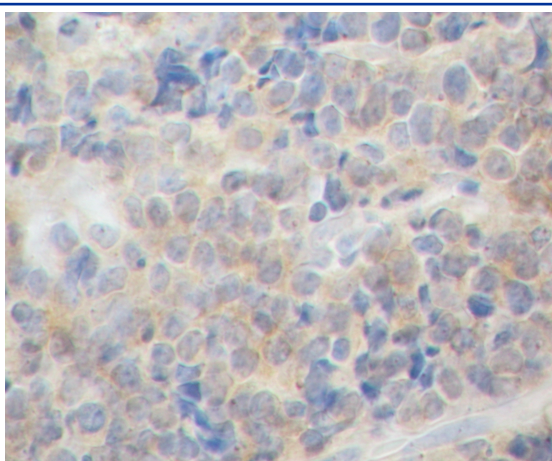
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarniczych u dzieci – BCRP(1)



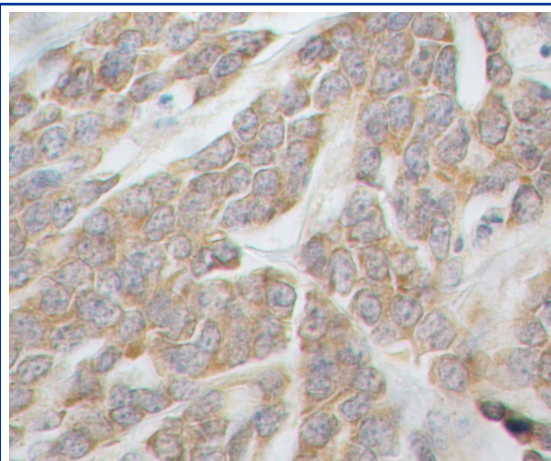
Fot. 37. BCRP: kontrola pozytywna
łożysko: ekspresja BCRP
w komórkach syncytiotrofoblastu



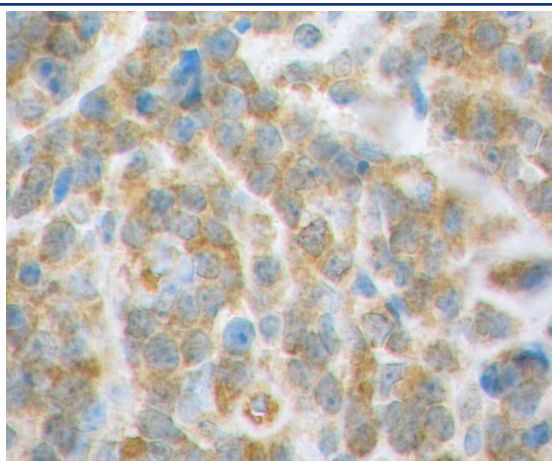
Fot. 38. BCRP: kontrola negatywna
łożysko: brak ekspresji



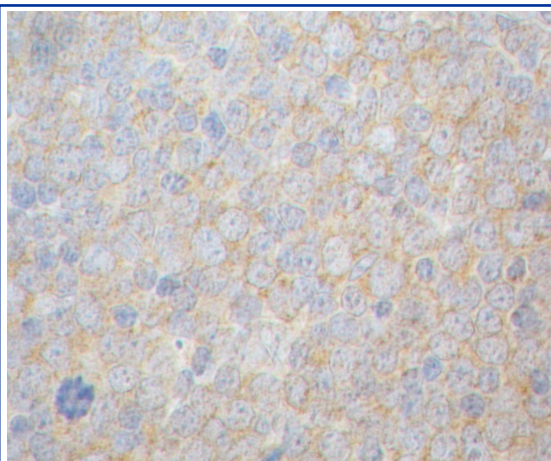
Fot. 39. białko BCRP:
intensywność ekspresji +
NHL-B, pacjent nr 28



Fot. 40. białko BCRP:
intensywność ekspresji ++
NHL-B, pacjent nr 21

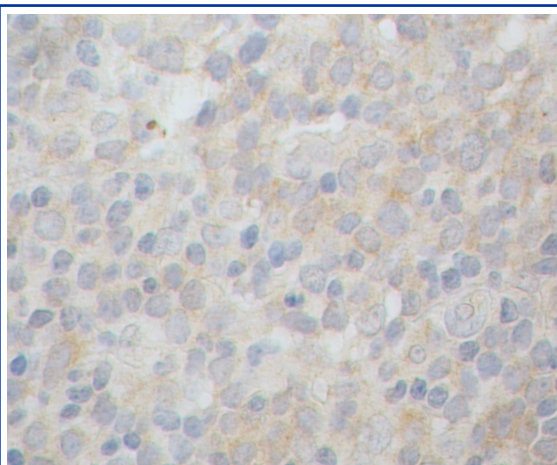


Fot. 41. białko BCRP:
intensywność ekspresji +++
NHL-B, pacjent nr 37

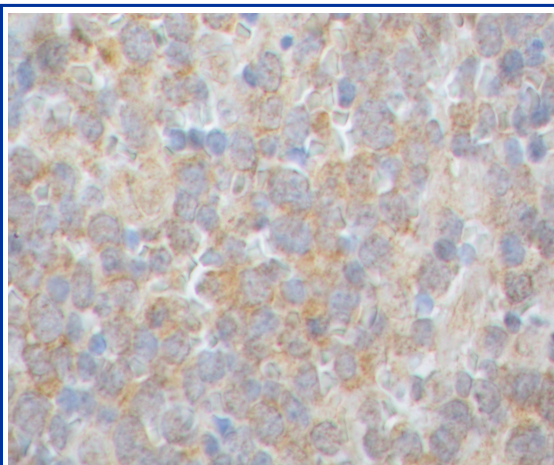


Fot. 42. białko BCRP:
intensywność ekspresji +
prekursor NHL-T, pacjent nr 14

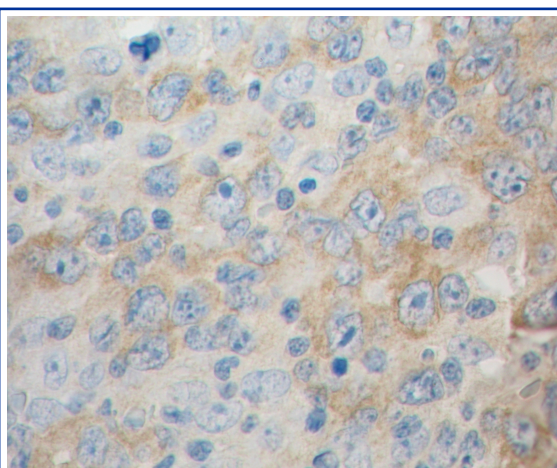
Ekspresja białek oporności wielolekowej w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci – BCRP(2)



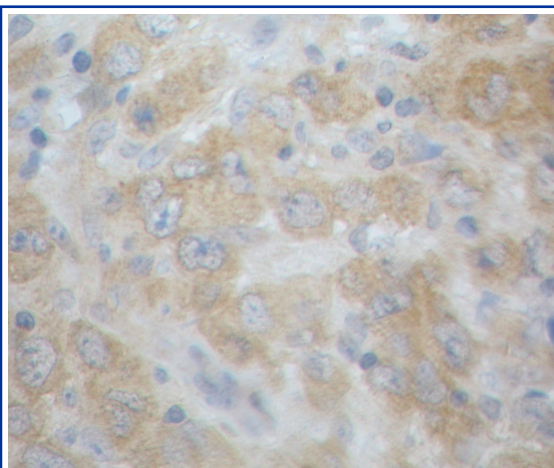
Fot. 43. białko BCRP:
intensywność ekspresji +
prekursor NHL-T, pacjent nr 1



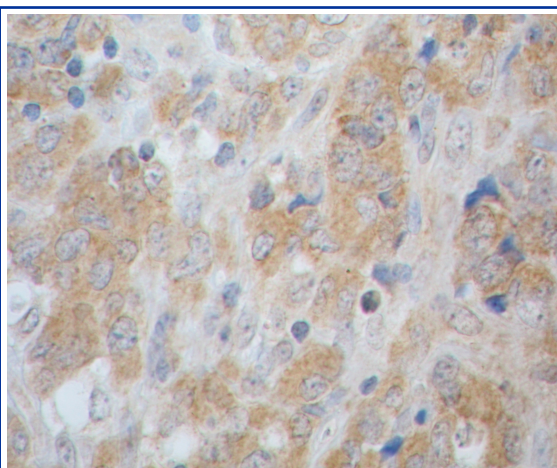
Fot. 44. białko BCRP:
Intensywność ekspresji ++
prekursor NHL-T, pacjent nr 17



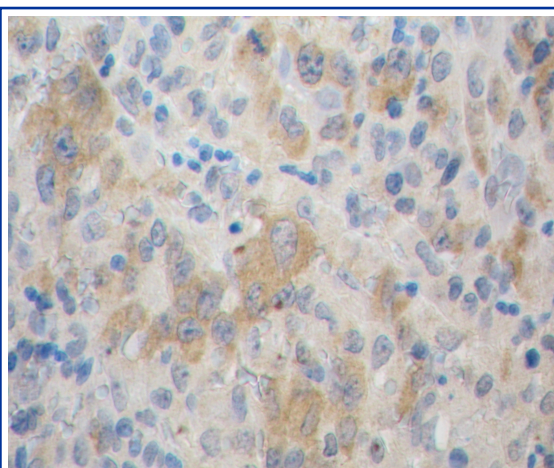
Fot. 45. białko BCRP:
intensywność ekspresji +
ALCL, pacjent nr 50



Fot. 46. białko BCRP:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 47



Fot. 47. białko BCRP:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 54



Fot. 48. białko BCRP:
intensywność ekspresji ++
ALCL, pacjent nr 46

