PCR-based clonality detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma

Yu.V. Sidorova, Ye.Ye. Nikulina, N.G. Chernova, L.G. Gorenkova, Ye.A. Gilyazitdinova, S.K. Kravchenko, A.M. Kovrigina, and A.B. Sudarikov

ABSTRACT

In this article, we discuss the issues of angioimmunoblastic T-cell lymphoma diagnosis, particularly the PCR-based methods of clonality detection. Assessments of T-and B-cell clonality was based on TCRG (Vγ-Jγ), TCRB (Vβ-Jβ, Dβ-Jβ), IGH (FR1, FR2, and FR3), IGK (Vκ-Jκ, Vκ/intron-Kde), or IGL (Vλ-Jλ) gene rearrangements in 15 patients. Clonal TCRG gene rearrangements were found in 66.7 % of primary biopsy samples. The combined use of primers for TCRG and TCRB gene rearrangements confirmed T-cell monoclonal population in most cases (86.7 %). The rate of B-cell clonality detection was 26.6 %. The presence of B-cell clones was not associated with monoclonal secretion in the blood or detecting Epstein-Barr virus positive B-cells in the biopsy samples. PCR-based clonality analysis is an important step in diagnosis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma that enables identifying monoclonal origin of T-lymphocytes in most cases. However, when interpreting the results obtained by this method, it is necessary to consider the possibility of detecting B-cell monoclonal products of unclear origin.

Keywords: angioimmunoblastic T-cell lymphoma, PCR, clonality, T-cell antigen receptor gamma- and beta-chain gene rearrangements.

Accepted: March 30, 2014

Hematology Research Center, RF Ministry of Health
125167, Novyy Zykovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation

Yu.V. Sidorova, PhD, Senior scientific worker, Laboratory of molecular hematology

Ye.Ye. Nikulina, Scientific worker, Laboratory of molecular hematology

N.G. Chernova, PhD, Hematologistin of the scientific and clinical department for chemotherapy of hematological diseases (with a day patient facility)

L.G. Gorenkova, PhD, Scientific worker of the scientific and clinical department for chemotherapy of hematological diseases and the intesive care unit

Ye.A. Gilyazitdinova, Scientific worker of the scientific and clinical department for outpatient care

S.K. Kravchenko, PhD, associate professor, Head of the scientific and clinical department for chemotherapy of hematological diseases and the intesive care unit

A.M. Kovrigina, DSci, Head of the department of morbid anatomy

A.B. Sudarikov, DSci, Head of the laboratory of molecular hematology

Address correspondence to:
Yu.V. Sidorova
125167, Novyy Zykovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation
Tel.: +7 (495) 6126511, e-mail: iouliavl@rambler.ru

Определение клональности методом ПЦР при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме

Ю.В. Сидорова, Е.Е. Никулина, Н.Г. Чернова, Л.Г. Горенкова, Е.А. Гилязитдинова, С.К. Кравченко, А.М. Ковригина, А.Б. Судариков

Р Е Ф Е Р А Т

В статье обсуждаются вопросы диагностики ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы (АИТЛ), в частности определение клональности методом ПЦР. Оценка Т- и В-клеточной клональности проведена по результатам изучения реаранжировки генов *TCRG* (Vγ-Jγ), *TCRB* (Vβ-Jβ, Dβ-Jβ), *IGH* (FR1, FR2, FR3), *IGK* (Vκ-Jκ, Vκ/intron-Kde) и *IGL* (Vλ-Jλ) у 15 пациентов с АИТЛ. Выявляемость клональности в материале первичной биопсии по реаранжировкам генов *TCRG* составила 66,7 %. Совместное использование праймеров к генам *TCRG* и *TCRB* позволило подтвердить Т-клеточную природу опухоли в большинстве случаев (86,7 %). Частота обнаружения В-клеточных клонов при данном заболевании составила 26,6 %. В-клеточная клональность не была связана с наличием моноклональной секреции или наличием Эпштейна—Барр вирус-положительных В-лимфоцитов в материале биопсии. Определение клональности методом ПЦР является важным этапом диагностики АИТЛ, позволяющим уточнить моноклональность Т-лимфоцитов в большинстве наблюдений. Однако при интерпретации результатов ПЦР-исследования необходимо учитывать возможность обнаружения В-клеточных моноклональных продуктов, происхождение которых остается неясным.

Ключевые слова:
ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ПЦР, клональность, реаранжировки генов γ- и β-цепей Т-клеточного рецептора.

Принято в печать: 30 марта 2014 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ) — редкий вариант нодальной периферической Т-клеточной лимфомы (ПТКЛ). Опухоль составляет 15—20 % всех ПТКЛ и 1—2 % всех неходжкинских лимфом. В конце 1980-х годов молекулярными методами исследования клональности была доказана Т-клеточная природа заболевания и оно было отнесено к ПТКЛ, что нашло отражение в классификации ВОЗ 2008 г. [1]. Заболевание имеет агрессивное течение. Более чем у 80 % больных ко времени первичной диагностики имеет место III—IV стадия распространения опухоли. Часто диагностируются экстранодальные поражения с вовлечением селезенки, костного мозга, кожи, печени и легких [2].

Для АИТЛ характерны иммунные нарушения [3]:

- гипергаммаглобулинемия;
- иммунный гемолиз с положительной пробой Кумбса;
- моноклональная секреция иммуноглобулинов.

Отличительные морфологические черты АИТЛ [3—6]:

- полиморфно-клеточная инфильтрация, состоящая из небольшого количества опухолевых Т-клеток, и выраженное реактивное микроокружение;
- пролиферация разветвленных кровеносных сосудов;
- периваскулярная пролиферация фолликулярных дендритных клеток;

ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ, Москва
125167, Новый Зыковский пр., д. 4а, Москва, Российская Федерация

- наличие крупных активированных CD30-позитивных В-клеток, инфицированных вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), которые морфологически могут быть сходными с клетками Березовского—Рид—Штернберга.

Чаще всего дифференциально-диагностические сложности возникают между АИТЛ и смешанно-клеточным вариантом лимфомы Ходжкина, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, богатой Т-клетками или гистиоцитами, прочими периферическими Т-клеточными лимфомами [4]. Субстратом опухоли служат фолликулярные Т-хелперы CD4+, имеющие иммунофенотип зрелых Т-клеток (CD2+, CD3+, CD4+, CD5+) и экспрессирующие маркеры CD10, BCL6, CXCL13, PD1 [7–9]. В связи со сложностями в интерпретации гистологических и иммуногистохимических данных одним из необходимых методов считается диагностика клональности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Данная методика основана на изучении нуклеотидного разнообразия перестроенных генов Т-клеточных рецепторов (TCR) и генов иммуноглобулинов (IG). Т-клеточная клональность обнаруживается в большинстве (76–96 %) случаев АИТЛ. В то же время в 17–45 % случаев методом ПЦР обнаруживается клональная или олигоклональная популяция В-клеток [10–12]. Одновременное обнаружение Т- и В-клональности представляет диагностическую дилемму как для патоморфолога, так и для клинициста. Возможных объяснений данного феномена может быть только два: либо в образце присутствуют одновременно клоны Т- и В-клеток, либо один клон с одновременной перестройкой генов TCR и генов IG. Наличие в опухолевых клетках одновременных перестроек генов TCR и IG может наблюдаться при острых лейкозах, однако редко встречается при зрелых лимфоидных опухолях [13, 14]. С другой стороны, наиболее вероятным при АИТЛ представляется присутствие двух клонов: опухолевого Т-клеточного и реактивного В-клеточного. Выявление В-клеточной клональности при АИТЛ, по некоторым данным, коррелирует с наличием ВЭБ-положительных В-лимфоцитов [15, 16] или выраженной В-клеточной пролиферации в лимфатических узлах [17]. Кроме того, нельзя исключить наличие опухолевого В-клеточного компонента при АИТЛ, т. к. у некоторых пациентов наблюдается моноклональная секреция иммуноглобулинов. Также в литературе представлены описания связи АИТЛ и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ) [18]. Следует подчеркнуть, что в таких случаях разграничение композитной лимфомы (АИТЛ/ДВКЛ) и трансформации моноклональной В-клеточной популяции в ДВКЛ при АИТЛ чрезвычайно затруднено.

Таким образом, нам представлялось интересным и важным, прежде всего с клинической точки зрения, изучить не только Т-, но и В-клеточную клональность у пациентов с АИТЛ, а также оценить возможности молекулярной диагностики клональности при данном заболевании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включено 15 пациентов, которые наблюдались в клинике ФГБУ ГНЦ МЗ РФ с 2002 по 2012 г. Соотношение мужчины/женщины составило 11:4, медиана возраста — 61 год (диапазон 29–77 лет). Диагноз АИТЛ устанавливался на основании морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований биоптата опухоли. Иммуногистохимическое исследование выполнялось с использованием расширенной панели моноклональных антител: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD20, CD79a, PD1, CXCL13, BCL6. Иммуноморфологический диагноз во всех случаях был верифицирован двумя независимыми гемопатологами. У всех пациентов диагностирована IV стадия заболевания по Ann-Arbor. Поражение костного мозга имелось у 14 (93 %) пациентов, легких — у 13 (87 %), селезенки — у 12 (80 %), печени — у 9 (60 %), кожи — у 6 (40 %), толстой кишки — у 1 (7 %). У всех 15 пациентов до начала лечения проведено иммунохимическое исследование сыворотки и мочи. Гипергаммаглобулинемия зарегистрирована в 8 (53 %) случаях. У 5 (33 %) больных обнаружена следовая моноклональная секреция. ВЭБ был выявлен у 9 (82 %) из 11 обследованных пациентов методом гибридизации *in situ* на гистологических препаратах лимфатического узла.

Определение Т- и В-клональности методом ПЦР

У всех 15 пациентов выполнены молекулярные исследования опухолевой ткани биоптатов лимфатических узлов. У 13 больных дополнительно исследованы пунктаты костного мозга, у 2 — повторно ткань лимфатических узлов и селезенки после спленэктомии.

Лейкоциты и ДНК из костного мозга выделяли, как описано ранее [19]. Для выделения ДНК из ткани, залитой в парафиновый блок, использовали 5 срезов по 5 мкм. Ткань подвергали депарафинизации методом нагревания [20, 21]. ДНК выделяли методом, основанным на растворении ткани в концентрированном аммиаке и последующем осаждении белков ледяной уксусной кислотой [22]. Концентрацию ДНК определяли на UV-спектрофотометре. Образцы ДНК хранили при температуре −20 °C.

Оценку Т-клеточной клональности проводили на основании изучения реаранжировки генов *TCRG* (Vγ-Jγ) и *TCRB* (Vβ-Jβ, Dβ-Jβ). Оценку В-клеточной клональности проводили по реаранжировкам генов *IGH* (FR1, FR2, FR3), *IGK* (Vκ-Jκ, Vκ/intron-Kde) и *IGL* (Vλ-Jλ). Для этого использовали метод ПЦР с мультиплексными системами праймеров BIOMED-2 [23]. Фрагментный анализ ПЦР-продуктов проводился с использованием автоматического анализатора нуклеиновых кислот ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). С этой целью 2 мкл разведенного в 20 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 0,04 мкл GeneScan 500-LIS Size Standard (Applied Biosystems, США). После денатурации при температуре 95 °C в течение 3 мин и последующего охлаждения 10 мкл смеси вносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems, США). Флюоресценция амплификатов и их профиль (распределение по длине) оценивались с помощью компьютерной программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США).

Таблица 1. Результаты обследования пациентов

№	ВЭБ	Иммунохимическое исследование крови	Ткань	Т-клональность TCRG (Vγ-Jγ)	Т-клональность TCRB (Dβ-Jβ)	Т-клональность TCRB (Vβ-Jβ)	В-клональность IGH (VH-JH, FR1/2/3)	В-клональность IGK (Vκ-Jκ, Vκ-Kde)	В-клональность IGL (Vλ-Jλ)
1	+	Без особенностей	ЛУ	М	П	М	П	П	П
			КМ	М?*	НД	НД	П	НД	НД
2	+	Следовая моноклональная секреция Gκ	ЛУ	М?	М	М	О*	П	П
			СЕЛ	М	М	М	О*	П	П
			КМ	О*	НД	НД	О*	НД	НД
3	+	Гипергаммаглобулинемия	ЛУ	М?*	П	М	П	П	НД
			ЛУ	М	П	М	П	П	НД
			КМ	П	НД	НД	П	НД	НД
4	Отр.	Следовая моноклональная секреция белка BJκ	ЛУ	М?	М	М	П	НД	НД
			КМ	П	НД	НД	П	НД	НД
5	+	Гипергаммаглобулинемия	ЛУ	М?	НД	НД	П	П	П
			ЛУ	М	М	М	П	П	П
6	НД	Гипергаммаглобулинемия	ЛУ	М	П	П	П	П	П
			КМ	М?	НД	НД	НД	НД	НД
7	+	Моноклональная секреция Mλ (2,6 г/л)	ЛУ	М	П	М	П	П	П
			КМ	П	НД	НД	П	П	П
8	НД	Гипергаммаглобулинемия	ЛУ	М	М	П	П	О	НД
9**	+	Диспротеинемия	ЛУ	М	П	М	М	М	НД
			КМ	М	НД	НД	М	М	НД
10	НД	Моноклональная секреция Gκ (14 г/л)	ЛУ	М	М	П	П	П	П
			КМ	М*	НД	НД	П	П	П
11	+	Следовая моноклональная секреция Gλ	ЛУ	М	П	М	П	П	П
			КМ	М*	П	М	П	П	П
12	НД	Гипергаммаглобулинемия	ЛУ	П	П	П	П	НД	НД
			СЕЛ	О	П	М	П	НД	НД
			КМ	О	НД	НД	НД	НД	НД
13	+	Гипергаммаглобулинемия	ЛУ	М	П	М	М?	НД	НД
			КМ	П	НД	НД	П	НД	НД
14	+	Диспротеинемия	ЛУ	М	П	П	П	М?	НД
			КМ	М?*	НД	НД	НД	НД	НД
15	Отр.	Гипогаммаглобулинемия	ЛУ	М	П	М	М?	НД	НД
			КМ	М	П	М	П	НД	НД

* Клоны по длине амплификатов различались между образцами.

** У пациента было сочетание ДВКЛ и АИТЛ.

ЛУ — лимфатические узлы; КМ — костный мозг; СЕЛ — селезенка; М — моноклональная картина; М? — сомнительная моноклональная картина (моноклональный пик на поликлональном фоне); О — олигоклональная картина (> 3 клонов); П — поликлональная картина; Отр. — отрицательный результат; НД — нет данных

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одна из основных проблем — это трудности при верификации диагноза АИТЛ. В исследуемой группе срок от первых симптомов заболевания до верификации диагноза АИТЛ в среднем составил 11 мес. (диапазон 1–45 мес.). Сложности диагностики АИТЛ связаны, как правило, с использованием редуцированной панели моноклональных антител и/или игнорированием молекулярно-генетических методов исследования опухоли.

Молекулярно-генетические методы определения клональности при изучении препаратов лимфатических узлов позволили подтвердить Т-клеточную моноклональность у большинства больных.

Моноклональность по реаранжировкам *TCRG* была выявлена в лимфатических узлах у 10 (66,7 %) из 15 пациентов при первичной диагностике, при этом у остальных пациентов картина либо была сомнительной, либо носила поликлональный характер (табл. 1). Моноклональность по реаранжировкам *TCRB* была выявлена в опухолевой ткани лимфатических узлов у 11 (73,4 %) из 15 пациентов при первичной диагностике. Совместное использование праймеров для генов *TCRG* и *TCRB* повысило выявляемость Т-клеточной клональности при первичной диагностике до 86,7 % (13 из 15 пациентов). Представляет интерес то, что у 4 пациентов из 15 (пациенты № 6, 8, 10 и 14) наблюдались реаранжировка генов *TCRG* и отсутствие полной реаранжировки генов *TCRB* (Vβ-Jβ), т. е. картина соответствовала незрелым стадиям развития Т-лимфоцита (αβ Т-лимфоцит должен показывать полную реаранжировку генов *TCRB*).

При исследовании пунктата костного мозга Т-клеточная моноклональность по генам *TCRG* выявлялась намного реже. Только у 3 (23 %) из 13 пациентов в костном мозге наблюдались четкие моноклональные пики, которые по длине амплификата совпадали с клонами в биоптатах лимфатического узла. При этом поражение костного мозга при гистологическом исследовании было подтверждено у 14 из 15 пациентов. Низкая выявляемость клональности в костном мозге, скорее всего, связана с малым количеством опухолевых клеток и/или выраженным реактивным компонентом. Чувствитель-

ность ПЦР-анализа на Т- и В-клональность составляет 1–10 % опухолевых лимфоцитов от Т- или В-клеток в образце [23]. Однако данного уровня чувствительности недостаточно для получения положительного результата анализа костного мозга. Молекулярными методами (single-cell ПЦР) и иммуногистохимически было показано, что содержание опухолевых Т-клеток при АИТЛ крайне невелико, они диффузно рассеяны среди доминирующего В-клеточного инфильтрата [24]. У 2 пациентов по генам *TCRG* в костном мозге наблюдалась моноклональная картина, у 3 — сомнительная моноклональная картина, у 1 — олигоклональная картина. Однако пики не совпадали по длине с амплификатами, выявленными в материале биопсии. Такое несовпадение можно объяснить либо ложноположительными результатами определения клональности в костном мозге, либо множественностью опухолевых клонов и разным их представительством в лимфатическом узле и костном мозге. В настоящее время показано, что на начальных этапах становления и развития АИТЛ клетки CD3+, CD10+ олигоклональны и только потом (на более поздних этапах) становятся моноклональными [25].

В-клеточная клональность по генам IG обнаружена в лимфатическом узле у 1 пациента с сочетанием ДВКЛ и АИТЛ. У 4 (26,6 %) из 15 пациентов в лимфатических узлах выявлены доминирующие В-клеточные клоны. При этом ни у одного пациента с моноклональной секрецией не было найдено клональности по генам *IGH, IGK* или *IGL*. Не обнаружено корреляции между выявлением В-клеточной клональности и наличием ВЭБ-положительных В-лимфоцитов в биоптатах. Определение В-клеточной клональности при АИТЛ значительно усложняет диагностику в связи с наличием в биоптатах крупных «уродливых» В-клеток, которые могут быть приняты за субстрат опухоли. ПЦР-диагностика клональности не позволяет отличить иммунный клональный продукт от опухолевого, а лишь обнаруживает В-лимфоциты с одинаковой перестройкой генов, если их количество превышает 1–10 % общего числа В-лимфоцитов. Комплексная оценка данных ПЦР-диагностики клональности и расширенного иммуногистохимического исследования может подтвердить или исключить диагноз сопутствующей ДВКЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПЦР-диагностика клональности необходима при подозрении на АИТЛ. Совместное использование праймеров для оценки клональности по генам *TCRG* и *TCRB* позволяет уточнить Т-клеточную природу опухоли в большинстве случаев (86,7 %). Костный мозг не является диагностическим материалом для выявления клональности при АИТЛ, что, возможно, связано с малым количеством опухолевых клеток и/или выраженным реактивным компонентом. При интерпретации результатов изучения клональности при АИТЛ необходимо учитывать вероятность (26,6 %) выявления В-клеточной клональности неясной этиологии, которая в нашем исследовании не была связана с наличием моноклональной секрецией и/или наличием ВЭБ-положительных В-лимфоцитов в биоптатах.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.

2. *Mourand N., Mounier N., Briere J. et al.* Clinical, biologic and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. Blood 2008; 111: 4463–70.

3. *Dogan A., Attygalle A.D., Kyriakou C.* Angioimunoblastic T-cell lymphoma. Br. J. Haematol. 2003; 121: 681–91.

4. *Стефанов Д.Н., Ковригина А.М., Поддубная А.М.* Новая концепция происхождения ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы: от молекулярной биологии к терапии. Бюл. СО РАМН 2011; 31(2): 14–9.

[*Stefanov D.N., Kovrigina A.M., Poddubnaya A.M.* New concept of origin of angioimmublastic T-cell lymphoma; from moleculat biology to therapy. Byul. SO RAMN 2011; 31(2): 14–9. (In Russ.)].

5. *Weiss L.M., Jaffe E.S., Liu X.F. et al.* Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. Blood 1992; 79: 1789–95.

6. *Dupuis J., Boye K., Martin N. et al.* Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). A new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T-cells. Am. J. Surg. Pathol. 2006; 30: 490–4.

7. *Attygalle A., Al Jehani R., Diss T.C. et al.* Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. Blood 2002; 99: 627–33.

8. *de Leval L., Rickman D.S., Thielen C. et al.* The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T cells (TFH). Blood 2007; 109: 4952–63.

9. *Yu H., Shahsafaei A., Dorfman D.* Germinal-center T-helper cell markers PD-1 and CXCL13 are both expressed by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Am. J. Clin. Pathol. 2009; 131: 33–41.

10. *Lachenal F., Berger F., Ghesquieres H. et al.* Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. Medicine (Baltimore) 2007; 86(5): 282–92.

11. *Zaki M.A., Wada N., Kohara M. et al.* Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. Eur. J. Haematol. 2011; 86(5): 412–9.

12. *Синицына М.Н., Стефанов Д.Н., Захарова Е.С. и др.* Изучение морфоиммуногистохимических особенностей и В-клеточной клональности при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме. Злокачественные лимфомы. М.: Медиа Медика, 2010: 51.

[*Sinitsyna M.N., Stefanov D.N., Zakharova Ye.S., et al.* Izucheniye morfoimmunogistokhimicheskikh osobennostey i B-kletochnoy klonalnosti pri angioimmunoblastnoy T-kletochnoy limfome. Zlokachestvennye limfomy (Studies of morphoimmunohistochemical features and B-cell clonality in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Malignant lymphomas). M.: Media Medika, 2010: 51.

13. *van Dongen J.J., Wolvers-Tettero I.L.* Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. Clin. Chem. Acta 1991; 198(1–2): 93–174.

14. *Theriault C., Galoin S., Valmary S. et al.* PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. Mod. Pathol. 2000; 13(12): 1269–79.

15. *Higgins J.P., van de Rijn M., Jones C.D., Zehnder J.L., Warnke R.A.* Peripheral T-cell lymphoma complicated by a proliferation of large B cells. Am. J. Clin. Pathol. 2000; 114: 236–47.

16. *Lome-Maldonado C., Canioni D., Hermine O. et al.* Angio-immunoblastic T cell lymphoma (AILD-TL) rich in large B cells and associated with Epstein-Barr virus infection. A different subtype of AILD-TL? Leukemia 2002; 16: 2134–41.

17. *Tan B.T., Warnke R.A., Arber D.A.* The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein-Barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. J. Mol. Diagn. 2006; 8(4): 466–75.

18. *Xu Y., McKenna R.W., Hoang M.P., Collins R.H., Kroft S.H.* Composite angioimmunoblastic T-cell lymphoma and diffuse large B cell lymphoma: a case report and review of the literature. Am. J. Clin. Pathol. 2002; 118: 848–54.

19. *Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др.* Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациент-специфичной ПЦР. Клин. лаб. диаг. 2011; 12: 22–35.

[*Sidorova Yu.V., Sorokina T.V., Biderman B.V., et al.* Detection of minimal residual disease in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using patient-specific PCR. Klin. lab. diag. 2011; 12: 22–35. (In Russ.)]

20. *Wu L., Patten N., Yamashiro C.T., Chui B.* Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2002; 10: 269–74.

21. *Coombs N.J., Gough A.C., Primrose J.N.* Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucl. Acids Res. 1999; 27: e 12.

22. *Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B.* A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. Exp. Dermatol. 2012; 21(1): 57–60.

23. *Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M. et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17(12): 2257–317.

24. *Willenbrock K., Renne C., Gaulard P., Hansmann M.L.* In angioimmunoblastic T-cell lymphoma neoplastic T-cells may be a minor cell population. A molecular single-cell and immunohistochemical study. Virchows Arch. 2005; 446: 15–20.

25. *Zhang D., Saunders C.J., Zhao W., Davis M., Cunningham M.T.* The clonality of CD3+ CD10+ T cells in angioimmunoblastic T cell lymphoma, B cell lymphoma, and reactive lymphoid hyperplasia. Am. J. Hematol. 2009; 84(9): 606–8.

Ю.В. Сидорова — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии

Е.Е. Никулина — научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии

Н.Г. Чернова — кандидат медицинских наук, врач-гематолог научно-клинического отделения химиотерапии гематологических заболеваний со стационаром дневного пребывания

Л.Г. Горенкова — кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-клинического отделения химиотерапии гематологических заболеваний и интенсивной терапии

Е.А. Гилязитдинова — научный сотрудник научно-клинического отделения амбулаторно-поликлинической помощи

С.К. Кравченко — кандидат медицинских наук, доцент, заведующий научно-клиническим отделением химиотерапии гематологических заболеваний и интенсивной терапии

А.М. Ковригина — доктор биологических наук, заведующая патологоанатомическим отделением

А.Б. Сударикова — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной гематологии

Адрес для переписки: Ю.В. Сидорова, 125167, Новый Зыковский пр., д. 4а, Москва, Российская Федерация
тел.: +7 (495) 6126511, e-mail: iouliavl@rambler.ru