

Cytometria przepływowa stwarza możliwości nowoczesnej oceny cech morfologicznych komórek z określeniem ich stopnia dojrzałości i zróżnicowania. W rutynowej diagnostyce klinicznej metoda ta ma główne zastosowanie w analizie chorób układu krwiotwórczego.

Cytometria przepływowa, dzięki opracowanym zestawom przeciwciał, nie tylko pozwala ocenić fenotyp komórek rozrostowych, ale także umożliwia ustalenie ich pochodzenia. W badaniach stosuje się panel przeciwciał monoklonalnych, umożliwiający ocenę przynależności komórek do linii i etapu różnicowania. Klasyfikacja przynależności do linii, jak i rozpoznawanie etapu rozwoju, oparta jest na stwierdzeniu koekspresji niektórych antygenów i zjawisku zanikania jednych antygenów, a pojawianiu się innych, w kolejnych etapach dojrzewania komórek prawidłowych. Im wcześniejszy etap różnicowania i dojrzewania został zakłócony, tym rozpoznanie na podstawie tylko morfologii jest trudniejsze. Analiza fenotypów komórek chłoniakowych i białaczkowych ma znaczenie w diagnostyce, monitorowaniu oraz poszukiwaniu choroby resztkowej i jest niezbędna do oceny, rokowania i doboru sposobu leczenia. Korelowanie wyników uzyskanych poprzez analizę fenotypową wykonaną za pomocą cytometru przepływowego z oceną morfologiczną, histologiczną i badaniami genetycznymi umożliwia szczegółową analizę chorób układu krwiotwórczego z uwzględnieniem zmian odczynowych, pierwotnych i wtórnych niedoborów immunologicznych oraz chorób autoimmunizacyjnych. Zastosowanie cytometru przepływowego zwiększa w sposób istotny uzyskanie wiarygodnego wyniku poprzez analizę zdecydowanie większej liczby komórek i możliwość uzyskania większego zakresu informacji o badanych cechach komórek.

**Słowa kluczowe:** cytometria przepływowa, fenotyp, chłoniaki niezaradne, białaczki, przeciwciała monoklonalne, komórki nowotworowe.

# Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej

*The role of flow cytometry in clinical diagnosis*

Aldona Kaczmarek, Tatsuya Osawa, Ewa Leporowska, Andrzej Mackiewicz

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Akademia Medyczna i Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

## WSTĘP

Cytometria przepływowa rozwija się od 25 lat. Służyła najpierw jako metoda liczenia komórek, określania ich rozmiarów, aż osiągnęła dzisiejszy poziom wysoce specjalistycznego narzędzia do wieloparametrowej analizy biochemicznych i biofizycznych właściwości komórek i ich składowych. Cytometria przepływowa pozwala określić morfologię i funkcje niektórych komórek, umożliwia ilościową i jakościową analizę antygenów różnicowania na dowolnej liczbie komórek nawet bardzo heterogenicznej populacji. Cytometria przepływowa stanowi obiektywną i powtarzalną metodę ustalania rozpoznania i monitorowania przebiegu terapii w różnych schorzeniach głównie hematologicznych [21]. Cytometria przepływowa pozwala jakościowo i ilościowo ocenić stan układu immunologicznego i dostarcza szeregu danych, które pozwalają szerzej spojrzeć na mechanizmy aktywacji i funkcje komórek układu odpornościowego. Prowadzi to do lepszego poznania zarówno ich znaczenia w patogenezie wielu chorób o podłożu zapalnym, jak i nieinfekcyjnym, a także roli w regulacji odpowiedzi immunologicznej ustroju. Cytometria

przepływowa pomaga obiektywnie opisać wiele procesów dzięki analizie wielkości i populacji komórek.

## CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA – UWAGI OGÓLNE

Podstawowym pomiarem w cytometrze przepływowym jest rejestrowanie światła rozproszonego na komórce oraz światła wysyłanego przez wzbudzony fluorochrom. Dwa detektory mierzą światło rozproszone. Pierwszy rejestruje rozproszenie od przodu zgodnie z kierunkiem wiązki laserowej pod niewielkim kątem poniżej  $10^\circ$  (FS – *Forward Scatter*). Drugi detektor rejestruje rozproszenie pod kątem  $90^\circ$  (SS – *Side Scatter*). FS – rozdziela komórki pod względem wielkości, a SS – rozdziela komórki ze względu na ich kształt i wewnętrzną ziarnistość.

Dodatkowo można otrzymać parametry wyliczane z kształtu impulsów fluorescencji (szerokość sygnału, jego powierzchnia), dzięki czemu można odróżnić komórki z 4N chromosomów od dwóch zlepionych 2N (tzw. dyskryminacja dubletów).

W zależności od aparatu mogą być różne ilości detektorów fluore-

*Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) – flow cytometry is a modern instrument used to analyze the morphological features of cells, and it allows the evaluation of the degree of maturity and differentiation. The flow cytometry is now the preferred method used in the routine clinical diagnosis of hematological diseases. This method makes it possible to detect not only the phenotype of malignant cells, but also the source of its origin. Using commercially available monoclonal antibodies against the membrane and cytoplasmic proteins, a very precise diagnosis is possible in many cases. In the routine analysis, the panel for monoclonal antibodies is used to categorize the cellular lineage of malignant cells and their phase of differentiation. This classification is based on the co expression of certain antigens and also the disappearance and appearance of others during the subsequent stages of normal cells development. If the process of differentiation and maturation are disturbed at an earlier phase, than the diagnosis based only on the morphology of cells becomes more difficult. The diagnostic value is also improved by using a wider panel including antibodies against proteins such as: apoptotic regulatory proteins (CD95, bcl-2, annexin, caspases) and the resistance for drugs (MDR), etc. The analysis of malignant phenotypes in leukemia and lymphoma plays a significant role in the diagnosis, detection of minimal residual diseases, controlling of therapy, and also in deciding the course of treatment. The final diagnosis and classification of the disease is based on the correlation of immunological characteristics of abnormal cells, cell morphology, histology, and genetic analysis, and allows the differentiation between hematologic, immunodeficient, and autoimmune diseases. The most important factors for the early diagnosis of these diseases are the percentage or the number of T*

scencji. Minimum powinny być 2 detektory, ale najczęściej przy jednowiązkowym systemie wzbudzenia używa się trzech detektorów FL1, FL2, FL3. Kiedy dostępna jest jeszcze jedna wiązka laserowa mogą być użyte jeszcze detektory dla FL 4 i FL 5.

Integralną i niezbędną częścią każdego aparatu jest system komputerowy wraz z oprogramowaniem. Każda firma ma własny zestaw programów do zbierania i analizy danych.

Do analizy i obrazowania danych stosuje się kilka typów wykresów: jednowymiarowe (histogram), dwuwymiarowe (kropkowy, gęstości, konturowy), wykresy trójwymiarowe (perspektywiczny).

Podczas analizy możliwe jest bramkowanie, ilościowa ocena komórek w każdym regionie, wyliczanie podstawowych wielkości statystycznych itd.

Analizy ekspresji determinant w poszczególnych kombinacjach przeciwciał stosowanych do barwienia komórek dokonuje się najczęściej poprzez analizę kwadrantową (rozkład punktowy, którego osie wykazują intensywność fluorescencji). Można wykonywać ocenę fenotypową: krwi obwodowej, szpiku, węzłów chłonnych, płynu mózgowo-rdzeniowego czy popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelikowych.

Analiza fenotypowa może być wykonana tylko w zawiesinie żywych komórek (antykoagulanty) bez zamrażania i środków konserwujących. Ocena dowolnej liczby antygenów w danej populacji ograniczona jest liczbą dostępnych kolorów fluorescencji wykrywanych przez detektory cytometru. W większości stosowanych aparatów można analizować od 2 do 4 kolorów znacznikowych. Nie jest możliwe badanie fragmentów tkankowych i materiału archiwalnego. Materiał musi być świeży i analizowany niezwłocznie po pobraniu jednocześnie na wszystkie znaczniki fluorescencyjne.

#### **Analiza cytometryczna obejmuje:**

- ▶ opis populacji komórkowych występujących w badanej zawieszynie na podstawie jej właściwości fizycznych (wielkość i ziarnistość),
- ▶ określenie proporcji pomiędzy badanymi populacjami komórek z podaniem odsetka subpopulacji,
- ▶ ocenę bezwzględnej liczby komórek wybranych subpopulacji (np. u osób zakażonych HIV – CD4/CD8),
- ▶ określenie odsetka komórek wykazujących ekspresję powierzchniową lub cytoplazmatyczną badanej determinanty lub kombinacji determinant,
- ▶ określenie intensywności fluorescencji, co odpowiada poziomowi ekspresji determinanty.

Cytometrię przepływową wykorzystuje się do badania pojedynczych komórek, jąder komórkowych lub chromosomów przy zastosowaniu metod barwienia, powodujących zachowanie żywotności komórek i integralności błony komórkowej.

#### **Obecność komórek rozrostowych**

(białaczkowych lub chłoniakowych) stwierdza się na podstawie obecności jednej, przeważającej populacji o nietypowej charakterystyce fizycznej, zaniku populacji komórek występujących w prawidłowym szpiku, węzle, krwi obwodowej. Pojawienie się w szpiku nadmiernej liczby komórek o identycznym fenotypie, często charakterystycznym dla komórek młodych lub z ekspresją nietypowych antygenów jest cechą charakterystyczną komórek rozrostowych. Ekspresję powierzchniową lub cytoplazmatyczną stwierdza się na podstawie porównania intensywności fluorescencji badanej próbki z intensywnością fluorescencji w próbce zawierającej kontrolę izotypową.

Przyjęto, że komórki badane wykazują ekspresję analizowanej determinanty, jeżeli odsetek komó-

*lymphocytes (CD3) and its subpopulation CD4, CD8, as well as B lymphocytes (CD19, CD20) and natural killer (NK) cells (CD 16+56). The FACS improves the diagnostic value since it allows the analysis of larger number of cells, and the possibility to obtain more information about the cells. The flow cytometry allows the use of antibodies labeled with different fluorochromes and the analysis of co expression of antigens atypical for the line, which the tumor cells are derived from.*

*Hematologic diseases are often non symptomatic, or the symptoms, if they occur, are in many cases unspecific. It is also very important to diagnose the disease at an early phase for the therapy to be successful. Therefore, control phenotype analysis should be performed in patients with immunological disorders. The substitution of manual method, with successful flow cytometric techniques, including FACS, makes it possible to analyze promptly and accurately, the rarely occurring and atypical subpopulation of cells. Moreover FACS is a complex, multiparameter technique which helps in the standardization of protocols in laboratory diagnostics.*

*Key words: flow cytometry, phenotype, non-Hodgkin's lymphomas, leukemia, monoclonal antibody, malignant cells.*

rek wykazujących fluorescencję jest wyższy niż kontrola izotypowa i wynosi nie mniej niż 20 proc. [1, 2].

Kontrola izotypowa polega na barwieniu dodatkowej próbki zawierającej komórki zawieszoną w fragmentach mysiej immunoglobuliny znakowanej fluorochromem odpowiadającym fluorochromowi przeciwciała monoklonalnego (FITC, RPE, ACP, PerCP, RPE-Cy-5). Powinna być tak dobrana, by klasa mysiej IgG odpowiadała podklasie IgG przeciwciała monoklonalnego. Ilość białka mysiego powinna być taka sama, jak w próbce barwionej przeciwciałem monoklonalnym. Zastosowanie kontroli izotypowej dotyczy każdego kolejnego fluorochromu, jakim wyznakowane są przeciwciała monoklonalne.

W przypadku badania populacji o słabej intensywności prawidłowo dobrana kontrola izotypowa jest krytyczna i umożliwia przeprowadzenie poprawnej analizy.

#### **Cytometria przepływowa pozwala rozpoznawać i monitorować niektóre choroby:**

- ▶ choroby rozrostowe układu krwiotwórczego, a zwłaszcza białaczki i chłoniaki [3, 4],
- ▶ wrodzone i nabyte niedobory immunologiczne [5],
- ▶ choroby nowotworowe,
- ▶ choroby płuc,
- ▶ choroby autoimmunizacyjne,
- ▶ przeszczepy narządów [6].

Przy pomocy cytometrii przepływowej można również:

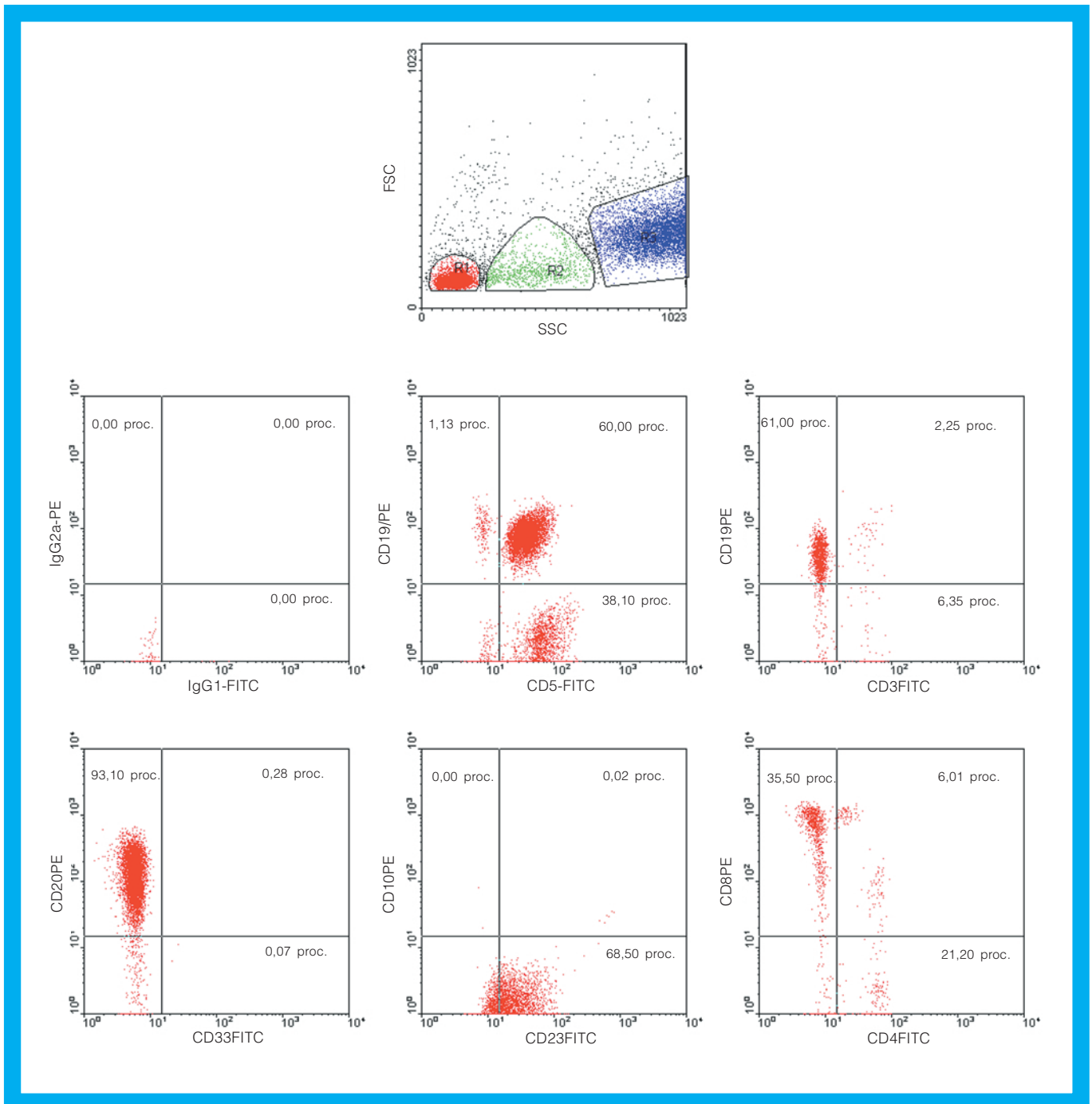
- ▶ badać oporność wielolekową [7, 8],
- ▶ analizować DNA [9, 10],
- ▶ badać apoptozę (programową śmierć komórek) [11–14].

**Zestaw przeciwciał monoklonalnych** do analizy powinien być tak dobrany, aby pozwalał na ocenę ekspresji powierzchniowych determinant charakterystycznych dla:

- ▶ komórek macierzystych,
- ▶ prekursorów i różnicujących się limfocytów T,

- ▶ dojrzałych limfocytów T,
- ▶ prekursorów i różnicujących się limfocytów B,
- ▶ dojrzałych limfocytów B,
- ▶ prekursorów i różnicujących się komórek linii mieloidalnej,
- ▶ komórek linii megakariocytarnej w szpiku prawidłowym,
- ▶ populacji komórek blastycznych w szpiku patologicznym i krwi obwodowej zawierającej takie komórki.

Zestawy przeciwciał do rutynowej oceny fenotypu zostały opracowane tak, by przy niewielkiej liczbie przeciwciał uzyskać możliwie precyzyjny opis fenotypu. Mając do dyspozycji przeciwciała znakowane, np. FITC i PE dobiera się je parami, by uzyskać dodatkową informację o równoczesnym występowaniu lub braku równoczesnej ekspresji badanych determinant na powierzchni komórki. Cytometria przepływowa umożliwia stosowanie w jednej próbce kombinacji przeciwciał o różnej swoistości i znakowanych różnymi fluorochromami, pozwalając na uzyskanie informacji o koekspresji antygenów nietypowych dla linii, z której pochodzą komórki nowotworowe [21]. W zależności od jakości cytometru można badać koekspresję nawet czterech antygenów, co nie jest możliwe w żadnej innej metodzie diagnostycznej. Kliniczne znaczenie koekspresji nie jest jednoznaczne. Koekspresja determinant limfoidalnych na komórkach białaczki mieloidalnej poprawia lekowrażliwość, a w konsekwencji rokowanie [15]. W białaczkach ostrych pochodzenia limfoidalnego koekspresja determinant mieloidalnych jest uważana przez większość ośrodków za czynnik o złym znaczeniu rokowniczym [8, 16]. Stosując szerszy panel przeciwciał monoklonalnych, rozbudowany o ocenę ekspresji białek, takich jak regulatory apoptozy (np. CD95 i bcl-2, aneksyna i kaspazy) oraz decydujących o wrażliwości komórki nowo-



**Ryc. Analiza cytometryczna ekspresji najbardziej charakterystycznych determinantów na powierzchni komórek o fenotypie B-CLL. Badane komórki wykazują nadekspresję antygenów CD19, CD20, CD23 oraz koeskspresję CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>**

tworowej na zastosowane leczenie (glikoproteina P nazywana również antygenem oporności wielolekowej) można wynik badania wzbogacić o dodatkowe informacje, mające znaczenie rokownicze [17]. Dodatkową korzyścią oceny cytometrycznej jest możliwość oznaczenia ploidii w komórkach o określonym fenotypie. Badanie to jest szczególnie przydatne w przypadku, gdy w analizowanym szpiku znajdują się jeszcze komórki pra-

widłowe. Skojarzone oznaczenie ploidii DNA w komórkach noszących charakterystyczne dla poszczególnych linii błonowe markery umożliwia wykrycie populacji komórek rozrostowych, jeśli mają one zmienioną ilość DNA. Ocena DNA może przyczynić się do wczesnego wykrycia choroby, a obecność aneuploidii DNA może wskazywać na zwiększone ryzyko czynnego procesu nowotworowego [18]. Wartości DNA mogą

być również przydatne w rokowaniu i wyborze terapii, a we wczesnym okresie choroby pozwalają wyróżnić grupę nowotworów, które wymagają bardziej agresywnego leczenia.

## **CHOROBY ROZROSTOWE UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO**

Podstawowymi cechami fenotypowymi, wyróżniającymi nowotwory są:

- ▶ pojawienie się antygenów wcześniejszych etapów dojrzewania,
  - ▶ brak antygenów, które powinny być obecne na komórkach dojrzałych,
  - ▶ pojawienie się antygenów z innych linii różnicowania, np. antygenów linii mieloidalnej na komórkach linii limfoidalnej,
  - ▶ zmniejszenie ekspresji antygenów lub bardzo silna ekspresja innych antygenów oraz koekspresja antygenów,
  - ▶ określenie klonalności rozplemu na podstawie rozkładu łańcuchów *kappa* i *lambda* w odniesieniu do komórek B,
  - ▶ obecność antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych niejednokrotnie pozwalających określić etap różnicowania populacji komórkowych.
- Zestaw przeciwciał** do diagnostyki białaczek u dorosłych zaproponowany przez PALG (*Polish Acute Leukemia Group*):
- ▶ TdT, CD34, HLA-DR (dodatkowo CD38, CD71) – niezróżnicowanokomórkowe,
  - ▶ CD13, CD33, CD65, CD117 oraz MPO – białaczki szpikowe (mieloidalne),
  - ▶ CD19, CD10 oraz cyt. CD22, cyt.

**Tab. 1. Proponowany zestaw podstawowych przeciwciał monoklonalnych wg klasyfikacji CD do fenotypowej charakterystyki komórek białaczkowych ostrych białaczek i chłoniaków niezłośliwych [21]**

| Przeciwciała dla:                              | Występowanie na komórkach prawidłowych                                                                                                  |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>limfocyty T i ich prekursorzy</b>           |                                                                                                                                         |
| CD2                                            | limfocyty T od wczesnych prekursorów do form dojrzałych                                                                                 |
| CD3                                            | limfocyty T dojrzałe (ekspresja powierzchniowa), prekursorzy (ekspresja cytoplazmatyczna)                                               |
| CD5                                            | limfocyty T od prekursorów do dojrzałych, część limfocytów B, zwłaszcza w węzłach chłonnych                                             |
| CD7                                            | limfocyty T od prekursorów do form dojrzałych                                                                                           |
| CD4                                            | limfocyty T wspomagające we krwi obwodowej i węzłach chłonnych                                                                          |
| CD8                                            | limfocyty T supresorowe we krwi obwodowej i węzłach chłonnych                                                                           |
| <b>limfocyty B i ich prekursorzy</b>           |                                                                                                                                         |
| CD19                                           | limfocyty B od wczesnych prekursorów do form dojrzałych (determinanta restrykcyjna dla limfocytów B)                                    |
| CD10                                           | limfocyty B stadium common dojrzewania w szpiku, słaba ekspresja na granulocytach                                                       |
| CD20                                           | limfocyty B stadium common do form dojrzałych                                                                                           |
| CD22                                           | limfocyty B dojrzałe we krwi obwodowej i węzłach chłonnych                                                                              |
| <b>granulocyty, monocyty i ich prekursorzy</b> |                                                                                                                                         |
| CD13                                           | granulocyty i monocyty od wczesnych prekursorów do form dojrzałych                                                                      |
| CD33                                           | wczesne prekursorzy granulocytów i monocytów (słaba ekspresja)                                                                          |
| CD65                                           | granulocyty od stadium promielocyta i monocyty (słaba ekspresja)                                                                        |
| CD15                                           | dojrzałe granulocyty                                                                                                                    |
| CD14                                           | monocyty od form prekursorowych do dojrzałych (determinanta restrykcyjna, niektóre przeciwciała wykazują słabą reakcję z granulocytami) |
| CD41, CD42                                     | płytki, megakariocyty i ich prekursorzy                                                                                                 |
| <b>Inne</b>                                    |                                                                                                                                         |
| CD34                                           | komórka macierzysta szpiku, wczesne prekursorzy mieloidalne                                                                             |
| HLA-DR                                         | komórka macierzysta szpiku, prekursorzy mieloidalne, limfocyty B od prekursorów do dojrzałych, aktywowane limfocyty T                   |
| TdT                                            | końcowa deoksytranferaza – od prekursorów do form dojrzałych limfocytów T i B                                                           |
| łańcuchy ciężkie i lekkie Ig                   | limfocyty B                                                                                                                             |

**Tab. 2. Podstawowy zestaw przeciwciał monoklonalnych stosowany do rozpoznawania fenotypów komórek rozrostowych w ostrych białaczkach**

| Linia    | Monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko: | Etap różnicowania i dojrzewania (rozpoznanie)                         |
|----------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>B</b> | TdT, HLA-DR, CD34                               | fenotyp komórek o niskim zróżnicowaniu (niskozróżnicowana)            |
|          | TdT, HLA-DR, CD34, CD19                         | limfocyt pro B (limfoblastyczna progenitor B)                         |
|          | HLA-DR, CD34, CD19, CD10                        | limfocyt B (limfoblastyczna B z antygenem powszechnym - common, cALL) |
|          | HLA-DR, CD34, CD19, CD10, CD20                  | limfocyt pre B (limfoblastyczna pre B prekursor B)                    |
|          | HLA-DR, CD19, CD20 sIgM                         | limfocyt B (limfoblastyczna dojrzałokomórkowa B)                      |
| <b>T</b> | TdT, HLA-DR, CD34, CD7, CD2, CD10               | prekursor tymocyta (limfoblastyczna pro T)                            |
|          | TdT, CD7, CD2, CD5, cCD3                        | wczesny tymocyt (limfoblastyczna pro T)                               |
|          | CD7, CD2, CD5, cCD3, CD3, CD4/CD8               | tymocyt (limfoblastyczna T niezróżnicowana)                           |
|          | CD7, CD2, CD5, CD3, CD4 lub CD8                 | dojrzały tymocyt (limfoblastyczna dojrzałokomórkowa T)                |
| <b>M</b> | HLA-DR, CD34, CD13, CD33, cMPO+/-               | mieloblast (mieloblastyczna)                                          |
|          | CD13, CD33, cMPO                                | promielocyt (promielocytowa)                                          |
|          | CD13, CD33, CD15, cMPO                          | mielocyt (mielocytowa)                                                |
|          | HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD14, CD15            | promielocyt (mielo-monoblastyczna)                                    |
|          | HLA-DR, CD13, CD33, CD14, CD4                   | monocyt (monoblastyczna)                                              |
|          | HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD41, CD61            | megakarioblast (megakarioblastyczna)                                  |
|          | CD13, CD33, CD71, glikoforyna A                 | erytroblast (erytroblastyczna)                                        |

CD79a – limfoblastyczne z linii limfocyta B,

- CD2, CD7 oraz cyt. CD3 – limfoblastyczne z linii limfocyta T.

W przypadku niejednoznacznych wyników należy wykorzystać przeciwciała proponowane jako barwienia uzupełniające:

- CD14, CD15, CD41 i/lub CD61, glikoforyna A – białaczki szpikowe (mieloidalne),
- CD20, CD23, CD24, łańcuchy lekkie  $\kappa$  i  $\lambda$ , cyt IgM – białaczki z linii limfocyta B,
- CD1a, CD3, CD4, CD5, CD8, TCR $\alpha/\beta$ , TCR $\gamma/\delta$  – białaczki linii limfocyta T,
- CD16 – chłoniaki olbrzymiokomórkowe.

Zasadnicze znaczenie dla wczesnej diagnostyki fenotypowej

ma ocena odsetka lub wartości bezwzględnych limfocytów T (CD3) oraz ich subpopulacji CD4, CD8, a także limfocytów B (CD19, CD20) i komórek NK (CD16+56+). W pierwszym histogramie muszą być widoczne wszystkie typy komórek.

Coraz szerszy panel otrzymywanych na skalę komercyjną przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko błonom i cytoplazmatycznym białkom umożliwia w wielu przypadkach precyzyjne rozpoznanie. Zbierane z dużej liczby ośrodków informacje o rozpoznawanych fenotypach komórek rozrostowych i przebiegu choroby (zastosowanie terapii, czas uzyskania remisji choroby i przeżycia) były i są ciągle opracowywane statystycznie. Wiedza ta jest pod-

stawą optymalnych schematów służących do diagnozy, leczenia oraz rokowania, szczególnie w chorobach nowotworowych, a zwłaszcza do powstania zmodyfikowanej, opartej na fenotypach i pochodzeniu komórki chłoniaka, klasyfikacji chłoniaków niezróżnicowanych [19], zaproponowanej w miejsce rozdrobnionej klasyfikacji histopatologicznej [20]. Nowa klasyfikacja wymaga nieco odmiennego zestawu przeciwciał monoklonalnych, w porównaniu do zestawu rytynowo używanego w fenotypowej klasyfikacji białaczek.

## KLASYFIKACJA FENOTYPOWA OSTRYCH BIAŁACZEK

W tab. 2. przedstawiono podstawowy zestaw przeciwciał mono-

**Tab. 3. Fenotypy komórek chłoniaków nieziarnicznych wywodzących się z linii limfocytu T. W nawiasach podano dodatkowe informacje oraz dodatkowe barwienia**

| Typ chłoniaka nieziarniczego                                                                | Fenotyp                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| białaczki/chłoniaki limfoblastyczne z prekursorów komórek T (T-ALL/T-LBL)                   | TdT <sup>+</sup> , CD7 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> (cytoplazmatyczne), CD2 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> , CD4/CD8 <sup>+</sup> lub CD4/CD8 <sup>-</sup>                                                                    |
| przewlekła białaczka limfatyczna z kk T (T-CLL)<br>białaczka prolimfocytarna z kk T (T-PLL) | CD2 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> , CD7 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>-</sup> lub CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (65 proc.) CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (20 proc.) |
| białaczki z dużych ziarnistych limfocytów (T-LGL)                                           | CD2 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD7 <sup>-</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+</sup> , CD57 <sup>-</sup> , CD25 <sup>-</sup>                                   |
| nieagresywny rozrost z dużych ziarnistych komórek NK (NK-LGL)                               | CD2 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>+/</sup> , CD16 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+/</sup> , (TCR alpha/beta)                                                                                            |
| ziarniak grzybiasty (MF), zespół Sezary'ego                                                 | CD2 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> , CD7 <sup>+/</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>-</sup> , CD25 <sup>-</sup>                                                                                              |
| chłoniak z obwodowych limfocytów T                                                          | CD2, CD3, CD5, CD7 – zmienna, CD4 <sup>+</sup> częściej niż CD8 <sup>+</sup> , (postać śledzionowa – TCR gamma/delta <sup>+</sup> )                                                                                               |
| chłoniak z komórek T – angioimmunoblastyczny (T-AILD) i angiocentryczny                     | immunofenotypy nie pomagają w różnicowaniu                                                                                                                                                                                        |
| chłoniak jelitowy z komórek T                                                               | CD3 <sup>+</sup> , CD7 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+/</sup> , CD4 <sup>-</sup> , (CD103 <sup>+</sup> )                                                                                                                                |
| białaczka/chłoniak z komórek T dojrzałych (ALT/L)                                           | CD2 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> , CD7 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>-</sup> , DR                                                                                                              |
| chłoniak z dużych komórek anaplastycznych (ALCL-T)                                          | CD2, CD3, CD5, CD7 – zmienna ekspresja, (CD30 <sup>+</sup> )                                                                                                                                                                      |

klonalnych stosowany do rozpoznawania fenotypów komórek rozrostowych w ostrych białaczkach

## KLASYFIKACJA FENOTYPOWA CHŁONIAKÓW NIEZIARNICZYCH

W tab. 3. i 4. przedstawiono fenotypy komórek chłoniaków w poszczególnych grupach klasyfikacyjnych nowego, zmodyfikowanego podziału chłoniaków i białaczek [19].

Cytometria przepływowa, jako metodologia XXI w., jest bardzo nowoczesną i dokładną metodą analizy pod względem biochemicznych i fizycznych właściwości komórek. W ciągu kilku sekund można z niezwykłą dokładnością i powtarzalnością wykryć subpopulacje rzadko występujące i nietypowe. Pozwala szerzej spojrzeć na mechanizmy aktywacji i funkcje komórek odpornościowych. Zastąpienie w ocenie stanu czynnościowego układu immunologicznego żmudnych metod manualnych technikami cytometrycznymi pozwala na w pełni miarodajne badanie kilku parametrów jednocześnie i stwarza

możliwość standaryzacji. Obecnie cytometria przepływowa ma zastosowanie w codziennej rutynowej diagnostyce w chorobach układu krwiotwórczego, gdzie zmiany fenotypu są szczególnie wyraźne, będąc odbiciem różnicowania i dojrzewania licznych suppopulacji. Należy jednak zawsze pamiętać, by każde badanie było analizowane indywidualnie i korelowane z innymi badaniami morfologicznymi wykonanymi na tym samym materiale (histopatologicznymi, cytogenetycznymi) z uwzględnieniem wieku pacjenta, zmian odczynowych chorób autoimmunizacyjnych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bradstock K, Matthews J, Benson E, et al. *Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia*. Blood 1994; 84: 1220-5.
2. Boldt DH, Kopecky KJ, Head D, et al. *Expression of myeloid antigens by blast cells in acute lymphoblastic leukemia of adults. The Southwest Oncology Group Experience*. Leukemia 1994; 8: 2118-26.
3. Jennings CD, Foon KA. *Flow cytometry: Recent advances in diagnosis and*

*monitoring of leukemia*. Cancer Invest 1997; 15: 384.

4. Tbakhi A, Etinger M, Myles J, Pohlman B, Tubbs RR. *Flow cytometric immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas and related disorders*. Cytometry 1996; 25: 113.
5. Żeromski J, Dworacki G. *Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowania kliniczne*. Central European J of Immunology 1996; 21: 99-106.
6. Pojda Z, Strużyńska J. *Cytometria przepływowa w badaniach komórek krwiotwórczych*. Central European J of Immunology 1996; 21: 114-8.
7. Carey JL, Hanson CA. *Flow cytometric analysis of leukemia and lymphoma*. In: *Flow Cytometry and Clinical diagnosis*. Eds.: Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE. American Society of Clinical Pathologists 1994; 197-308.
8. Huh YO, Andreeff M. *Flow cytometry. Clinical and research applications in hematological malignancies*. Hematol Oncol Clin North Amer 1994; 8: 703-23.
9. Macartney JC, Camplejohn RS. *DNA flow cytometry of non-Hodgkin's lymphomas*. Eur J Cancer 1990; 26: 635.

**Tab. 4. Fenotypy komórek chłoniaków nieziarniczych wywodzących się z linii limfocytu B [6]; slg - powierzchniowa ekspresja łańcuchów ciężkich immunoglobulin; clg - cytoplazmatyczna ekspresja łańcuchów ciężkich immunoglobulin. W nawiasach podano dodatkowe informacje oraz dodatkowe barwienia**

| Typ chłoniaka nieziarniczego                                                               | Fenotyp                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| prekursorowe białaczki/chłoniaki limfoblastyczne z komórek B (B-LBL)                       | TdT <sup>+</sup> , CD19 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD20 <sup>+/+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD10 <sup>+/+</sup> , CD34 <sup>+/+</sup> , slg <sup>-</sup> (może być koekspresja CD13, CD33)                                                                                   |
| przewlekła białaczka limfatyczna (B-CLL)                                                   | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD23 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> , CD10 <sup>-</sup> , DR, CD43 <sup>-</sup>                                                                                                                                            |
| chłoniak limfocytarny (B-SLL) z małych limfocytów; białaczka prolifocytarna z kk B (B-PLL) | CD43 <sup>+</sup> , CD10 <sup>-</sup> , CD11c <sup>+/+</sup> , CD22 <sup>-</sup> , CD23 <sup>-</sup> , slgD <sup>+/+</sup> , slgM <sup>+</sup> (słabo z wyjątkiem B-PLL – reakcja silna)                                                                                                 |
| chłoniak z komórek płaszczka (MCL)                                                         | DR, CD19, CD20, CD5, CD22, CD23 <sup>-</sup> , CD10 <sup>-</sup> , CD43 <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                     |
| chłoniak z ośrodków rozmnażania (FL)                                                       | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+/+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD23 <sup>+/+</sup> , CD11c <sup>-</sup> , slg <sup>+</sup> (IgM>IgD>IgG), CD43 <sup>-</sup>                                                                                        |
| pozawęzłowe chłoniaki strefy brzeżnej (MZL)                                                | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD10 <sup>-</sup> , CD23 <sup>-</sup> , CD11c <sup>+/+</sup> , IgD <sup>-</sup> , slg <sup>+</sup> , (IgM> IgG), clg <sup>+</sup> (40 proc.) CD25 <sup>-</sup> , CD 103 <sup>-</sup> |
| białaczka włochatokomórkowa (HCL)                                                          | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD23 <sup>-</sup> , CD11c <sup>+</sup> (silne), slg <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> , DR, CD103 <sup>-</sup>                                                                        |
| chłoniak plazmocytowy/szpiczak (PL)                                                        | CD19 <sup>-</sup> , CD20 <sup>-</sup> , CD22 <sup>-</sup> , CD79a <sup>+</sup> , slg <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> , clg <sup>+</sup> (IgG/IgA), kappa/lambda <sup>+</sup> , DR <sup>-</sup> , CD38 <sup>-</sup>                                                                    |
| chłoniaki rozlane z dużych komórek B (DL BCCL)                                             | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD5 <sup>+/+</sup> , CD10 <sup>+/+</sup> , slg <sup>+/+</sup> , clg <sup>+/+</sup> ,                                                                                                                    |
| chłoniaki z dużych kk B pierwotny chłoniak śródpiersia (ML BCL)                            | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , slg <sup>-</sup> , CD30 <sup>+</sup>                                                                                                                                                                    |
| chłoniak Burkitta (BL)                                                                     | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD5 <sup>-</sup> , CD10 <sup>+</sup> , CD23 <sup>-</sup> , slg <sup>+</sup> (IgM) kappa/lambda <sup>+</sup>                                                                                             |
| chłoniak z komórek B typu Burkitta o wysokim stopniu złośliwości                           | CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , CD79a <sup>+</sup> , CD10 <sup>-</sup> , slg <sup>+/+</sup> , slg <sup>+/+</sup> ,                                                                                                                                           |

- Niezabitowski A, Lackowska B. *Przydatność kliniczna oceny DNA przy użyciu cytometrii przepływowej w nowotworach ludzkich*. Central European J of Immunology 1996; 21: 147-55.
- Darzynkiewicz Z. *Apoptosis in antitumor strategies: Modulation of cell cycle and differentiation*. J Cell Biochem 1995; 58: 151-59.
- Fisher DE. *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. Cell 1994; 78: 539-42.
- Hickmann JA. *Apoptosis induced by anticancer drugs*. Cancer Metast Rev 1992; 11: 121-39.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon V. *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer 1994; 73: 2013-26.
- Vidriales MB, Orfao A, Gonzales M, et al. *Expression of NK and lymphoid-associated antigens in blast cells of acute myeloblastic leukemia*. Leukemia 1993; 7: 2026-9.
- Drexler HG, Thiel E, Ludwig W-D. *Review of incidence and clinical relevance of myeloid antigen – positive acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia 1991; 5: 637-45.
- Wąsik M. *Przydatność i zasady oceny fenotypu komórek w diagnozowaniu ostrych białaczek*. Diagn Lab 2001; 37: 221-52.
- Niezabitowski A, Lackowska B, Gruchała AG, et al. *Flow cytometric DNA analysis of cells obtained with fine needle aspiration biopsy of the breast*. Gen Diagn Pathol 1996; 142: 33-39.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. *A revisited European – American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood 1994; 84: 1361-92.
- National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphoma. Cancer 1982; 49: 2112-35.
- Pituch-Noworolska A. *Zastosowanie cytometrii przepływowej do diagnostyki białaczek i chłoniaków nieziarniczych*. Central European J of Immunology 1996; 21: 138-46.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**

dr med. **Aldona Kaczmarek**  
 Zakład Diagnostyki i Immunologii  
 Nowotworów  
 Wielkopolskie Centrum Onkologii  
 ul. Garbary 15  
 61-866 Poznań