

ROLA CYTOMETRII W DIAGNOSTYCE I MONITOROWANIU CHŁONIAKÓW (LYMPHOMA)*

UTILITY OF FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSTICS AND MONITORING OF LYMPHOMAS

Jan ŻEROMSKI, Jan SIKORA, Grzegorz DWORACKI

Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego
w Poznaniu

Streszczenie: Chłoniaki są nowotworami układu limfatycznego, ale komórki tego układu, głównie limfocyty są morfologicznym substratem układu odpornościowego. Limfocyty znamionuje ekspresja różnych antygenów pojawiających się na kolejnych stadiach ich różnicowania. Antygeny te, ujęte w tzw. klasyfikacji CD (ang. *cluster determinants*), wykazują także ekspresję w chłoniakach. Pozwala to na ich wykrycie przy pomocy różnych metod, a w szczególności cytometrii przepływowej. Ta ostatnia ma nie tylko funkcje diagnostyczną, ale pozwala również wykryć chorobę resztkową, a także monitorować proces nowotworowy w przebiegu leczenia. Diagnostyka chłoniaków jest w pierwszym rzędzie oparta na badaniu histopatologicznym skrawka tkankowego, ale cytometria stanowi tu cenne uzupełnienie zapewniając szybkość uzyskania wyniku, dane liczbowe komórek dodatnich, odsetek komórek proliferujących, ploidię DNA, jednak bez oceny topografii zmiany. Materiał do badania cytometrycznego może pochodzić nie tylko z krwi czy szpiku kostnego, ale także z oligobiopsji guza lub węzła chłonnego. Duża i stale rosnąca liczba antygenów różnicowania limfocytów stwarza szerokie możliwości oceny nie tylko chłoniaków z komórek B, ale także T i NK. Metodyka badania oparta na ocenie w świetle lasera kilku do kilkunastu tysięcy żywych komórek poddanych reakcji z przeciwciałem znakowanym fluorochromem jest stosunkowo prosta i pozwala na uzyskanie wartościowego wyniku w ciągu kilku godzin. W podsumowaniu, przedstawione dane, poparte przykładami obrazów cytometrycznych, świadczą jednoznacznie, że równoległe stosowanie cytometrii przepływowej z oceną morfologiczną skrawka tkankowego może stanowić „złoty standard” w diagnostyce i monitorowaniu tej grupy nowotworów złośliwych.

Summary: Lymphomas are tumors of the lymphatic system, but its cells, mainly lymphocytes constitute morphological substrate of the immune system. Lymphocytes are characterized by the expression of several antigens manifested in subsequent stages of development. These, so called differentiation antigens grouped in CD classification are also expressed in lymphomas. They may be traced by means of various methods, and in particular, by flow cytometry. The latter has not only diagnostic function, but also permits to detect residual disease and allows for monitoring of neoplastic process in the course of anti-tumor therapy. Diagnostics of lymphomas is still based on histopathological assessment of tissue sec-

*Przygotowanie rozdziału zostało częściowo sfinansowane ze środków Projektu Badawczego Zamawianego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr PBZ-KBN 119/PO5/2005.

tions. Flow cytometry constitutes however valuable complement, providing quantitative data of positive cells, percent of proliferating ones, DNA ploidy, and above all, fast response. It does not however, provide information about topography of lesion. Cells for flow cytometry may originate not only from blood or bone marrow, but also from oligobiopsy of tumor or lymph node. Marked and steadily growing number of known differentiation antigens creates vast possibilities for the evaluation of not only B-cell but also T-cell and NK-cell tumors. Technology of flow cytometry, based on the assessment of several thousands of living cells in the laser beam, subjected previously to the reaction with fluorochrome labelled monoclonal antibodies – is relatively simple and permits to obtain comprehensive results within couple of hours. In summary, the data presented, with the examples of cytometric diagrams, show unequivocally, that parallel use of flow cytometry with morphological assessment of tissue section may constitute „gold standard” in diagnostics and monitoring of this group of malignancies.

WPROWADZENIE

Chłoniaki stanowią szczególną grupę nowotworów. Są to bowiem guzy układu limfatycznego będącego substratem morfologicznym układu odpornościowego. Komórki tego układu, ich subpopulacje, a także cechy czynnościowe są stosunkowo szczegółowo scharakteryzowane, a ich markery różnicowania ujęte są w jednolitej klasyfikacji CD (ang. *cluster determinants*). Klasyfikacja ta obejmuje antygeny różnicowania komórek, powierzchniowe i cytoplazmatyczne. Liczba opisanych antygenów w CD sięga już ponad 300 pozycji. Większość tych antygenów ulega ekspresji w przebiegu nowotworzenia, jednak ich ekspresja może różnić się istotnie od stanu, jaki ma miejsce w ontogenezie normalnej. Stwarza to unikalne możliwości wykorzystania ekspresji poszczególnych molekuł na/w komórkach nowotworowych dla charakterystyki nozologicznej guza i jego biologii. Pozwala to określić, nie tylko na jakim etapie rozwoju komórki powstał nowotwór, ale także jego stopień dojrzałości i cechy czynnościowe, takie jak: pomoc, cytotoksyczność czy produkcja immunoglobulin. Niezwykle przydatną okazała się tu cytometria przepływowa pozwalająca w krótkim czasie określić ekspresję szeregu antygenów w jednym badaniu, przy użyciu odpowiednich przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami o różnych kolorach fluorescencji.

Cytometria przepływowa w klinice chłoniaków wykorzystywana jest obecnie trojako:

- ♦ Służy do ustalenia szczegółowej diagnozy danego nowotworu.
- ♦ Pozwala potwierdzić lub wykluczyć chorobę resztkową.
- ♦ Jest metodą z wyboru dla monitorowania leczenia przeciwnowotworowego.

Ponadto, w przypadku terapeutycznego przeszczepu szpiku, cytometria pozwala na śledzenie losów przeszczepionych komórek i stopnia regeneracji mikrośrodowiska szpiku.

ODRĘBNOŚCI METODYCZNE W DIAGNOSTYCE CHŁONIAKÓW

W przeciwieństwie do diagnostyki białaczek i innych chorób krwi czy szpiku, chłoniaki należą do guzów litych i dlatego pierwszeństwo w ich ocenie mają metody morfologiczne. Patolog po otrzymaniu do badania bioptatu guza lub powiększony

węzeł chłonny, oceni przede wszystkim skrawek z kostki parafinowej barwiony hematoksyliną i eozyną (H+E) i często na tej podstawie ustali rozpoznanie, zwłaszcza w przypadku zmian nienowotworowych. Gdy powstaną wątpliwości odnośnie rozpoznania, następnym krokiem będzie wykonanie reakcji immunohistochemicznych na kolejnych skrawkach parafinowych. Może to pozwolić ustalić topografię komórek tworzących rozrost nowotworowy, a także ich fenotyp, jeżeli zastosuje się odpowiednie przeciwciała przeciw antygenom różnicowania komórek. Zwykle jednak nie udaje się tu ustalić ko-ekspresji różnych antygenów, a także stosunków ilościowych w obrębie poszczególnych rodzajów komórek. Postępowanie diagnostyczne w pracowni histopatologicznej może jednak trwać stosunkowo długo. Cykl przygotowania materiału biologicznego do badania, jego ocena, wykonanie barwień dodatkowych i reakcji immunohistochemicznych, często powtarzanych, może przedłużyć uzyskanie ostatecznego rozpoznania nawet do kilku tygodni.

Cytometria przepływowa oferuje tu zupełnie nowe możliwości, aczkolwiek nie może zastąpić badania histopatologicznego. Należą tu:

- możliwość jednoczesnego badania komórek guza, krwi, a także szpiku kostnego, co pozwala określić zakres inwazji,
- określenie ekspresji i ko-ekspresji powierzchniowej i/lub cytoplazmatycznej poszczególnych antygenów, a także ich braku na komórkach nowotworowych,
- uzyskanie danych ilościowych dla badanych subpopulacji komórek,
- określenie liczbowe puli komórek proliferujących,
- możliwość wykonania badania z materiału uzyskanego drogą oligobiopsji guza lub węzła chłonnego,
- określanie w godzinach czasu potrzebnego do wykonania i oceny badania cytometrycznego.

Natomiast pewną wadą cytometrii przepływowej jest brak możliwości określenia topografii komórek. Ponadto, kłopoty sprawia niekiedy wymóg dostarczenia do badania żywych, nieuszkodzonych komórek w zawieszinie krwi zabezpieczonej przed krzepnięciem.

WARUNKI POBIERANIA I RODZAJE MATERIAŁU BADAWCZEGO NADAJĄCEGO SIĘ DO OCENY CYTOMETRYCZNEJ

W odniesieniu do krwi i szpiku kostnego pobranie materiału w zasadzie nie różni się od sposobów stosowanych w rutynowej diagnostyce hematologicznej. Kluczowe znaczenie ma zapobieżenie krzepnięciu ze względu na konieczność zapewnienia swobodnego ruchu pojedynczych komórek w aparacie. Materiał pobiera się do probówek zawierających odpowiednią ilość wersenianu sodu (EDTA).

W przypadku materiału tkankowego, najczęściej z węzłów chłonnych lub z migdałka, sytuacja jest nieco inna. Pobranie drogą oligobiopsji pozwala bezpośrednio wykorzystać komórki zawarte w igle biopsyjnej do reakcji immunofluorescencyjnej po zawieszeniu w buforowanym płynie (PBS pH 7.4). Problemem jest tu mała ilość uzyskanych komórek, ograniczająca liczbę reakcji możliwych do wykonania.

TABELA 1. Klasyfikacja chłoniaków nieziarnicznych i ziarnicznych według WHO z kodami ICD10 lub /i ICD-0 (wybrane jednostki)

ICD10	ICD-0	Chłoniaki z komórek B
OSTRE		
C91.0	9835/3 ¹ 9728/3 ²	ostra białaczka/chłoniak ² limfoblastyczny-prekursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma (B-ALL/B-LBL)
PRZEWLEKŁE		
C91.1	9823/3	przewlekła białaczka limfocytowa z komórek B B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL)
C91.3	9833/3	białaczka prolifocytarna – B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL)
C91.4	9940/3	białaczka włosiano-komórkowa – Hairy-cell leukemia (HCL)
C90.0	9732/3	szpiczak mnogi i nowotwory z komórek plazmatycznych – plasma cell myeloma/plasmacytoma
C82	9690/3	chłoniak guzkowy (grudkowy) – follicular lymphoma (FL)
C83.7	9687/3 9826/3	chłoniak Burkitta -- Burkitt lymphoma/Burkitt cell leukemia (BL)
C83.5	9680/3	chłoniak z dużych komórek (rozłany) – diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)
	9673/3	chłoniak z komórek płaszcza – mantle cell lymphoma (MCL)
	9689/3	chłoniak strefy brzeżnej śledzionowy – splenic marginal zone lymphoma (SMZL)
	9699/3	chłoniak strefy brzeżnej węzłowy – nodal marginal zone B-cell lymphoma (NMZL)
	9671/3	chłoniak limfoplazmatyczny/makroglobulinemia Waldenströma lymphoplasmatic lymphoma/Waldeström macroglobulinemia

Jeśli natomiast otrzymamy fragment utkania powiększonego węzła chłonnego pobrany metodą chirurgiczną, to materiał taki wymaga mechanicznego rozdrobnienia dla uzyskania zawiesiny komórek, zwykle bez konieczności stosowania enzymów. Po przepłukaniu buforowanym płynem komórki nadają się do użytku.

Oprócz wspomnianych najczęściej stosowanych substratów biologicznych w diagnostyce cytometrycznej chłoniaków, możliwe jest użycie niemal każdego źródła komórek ustroju pod warunkiem, że będą to komórki w zawiesinie hydrofilnej. Można tu wymienić wysięki opłucnowe, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz i inne.

KLASYFIKACJA CHŁONIAKÓW

Klasyfikacja tych guzów ma długą historię. Kilkanaście różnych klasyfikacji (Rappaporta, Lukesa-Collinsa, Dorfmana, Lennerta itd.) opartych było niemal wyłącznie na cechach morfologiczno-klinicznych, co odpowiadało dużej różnorodności

TABELA 1 cd. Klasyfikacja chłoniaków nieziarnicznych i ziarnicznych według WHO z kodami ICD10 lub /i ICD-0 (wybrane jednostki)

ICD10	ICD-0	Chłoniaki z komórek B
Chłoniaki z komórek T i NK		
OSTRE		
C91.0	9837/31 9729/32	ostra białaczka/chłoniak limfoblastyczny-prekursor T-lymphoblastic (acute) leukemia lymphoma (T-ALL/T-LBL)
PRZEWLEKŁE		
C91.3	9834/3	białaczka prolimfocytarna – T cell prolymphocytic leukemia (T-PLL)
	9831/3	białaczka limfocytarna z dużych ziarnistych komórek T T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL)
C84.2	9827/3	chłoniak/białaczka strefy T dorosłych – adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL)
C84.0	9700/3	ziarniniak grzybiasty – mycosis fungoides
C84.1	9701/3	zespół Sezary'ego – Sezary syndrome
C84.4	9702/3(10)	chłoniak z obwodowych limfocytów T peripheral T-cell lymphoma, lymphoepithelioid cell lymphoma (Lennert)
C84.3	9714/3	chłoniak anaplastyczny wielokomórkowy – anaplastic large cell lymphoma (ALCL)
Chłoniak Hodgkina (ziarnica złośliwa)		
C81.7	9659/3	guzkowy chłoniak Hodgkina z przewagą limfocytów nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL)
C81	9650/3	chłoniak (choroba) Hodgkina klasyczny – classical Hodgkin lymphoma
C81.1	9663/3	stwardnienie guzkowe – nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma (NSHL)
C81.0	9651/3	z przewagą limfocytów – lymphocyte rich classical Hodgkin lymphoma (LR CHL)
81.2	9652/3	Mieszanokomórkowa – mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma (MCH)
C81.3	9653/3	ze zmniejszeniem limfocytów – lymphocyte depleted classical Hodgkin lymphoma (LDHL)

chłoniaków. W 1994 roku w amerykańskim czasopiśmie *Blood* ukazał się artykuł będący wspólnym wynikiem pracy badaczy amerykańskich i brytyjskich, który całkowicie zmienił podejście klasyfikacyjne do tej grupy nowotworów.

Autorzy wyszli z założenia, że nowotwory te wywodzą się z komórek układu immunologicznego, a więc ich zróżnicowanie jest pochodną bogactwa morfologicznego i czynnościowego tego układu. Jako wykładniki różnorodności tych guzów przyjęli antygeny różnicowania komórek limfoidalnych, co pozwoliło odróżnić od siebie chłoniaki morfologicznie bardzo podobne jak choćby chłoniak limfocytarny i chłoniak płaszczka (*mantle cell lymphoma*). Podział na chłoniaki T i B oraz konsekwentne stosowanie szerokiego wachlarza przeciwciał monoklonalnych przeciwko kilkunastu czy nawet kilkudziesięciu antygenom różnicowania pozwoliło stworzyć spójny system podziału tych guzów, przyjęty obecnie na całym świecie (początkowo klasyfikacja REAL, a obecnie WHO. Podziałem tym objęto także chłoniaki Hodgkina (ziarniczne), w których jednak rola diagnostyczna cytometrii przepływowej jest stosunkowo niewielka. Wynika to ze skąpej liczby komórek znamiennej dla tej grupy chorób, takich jak: komórki Reed-Sternberga (RS), czy komórki Hodgkina w guzie,

mających co prawda swoisty fenotyp (CD15⁺, CD30⁺) ale łatwiej rozpoznawanych w skrawkach parafinowych. Warto jednak pamiętać, że komórki RS wykazują także ekspresję takich antygenów, jak: CD25, HLA-DR, ICAM-1, CD95, CD40 i CD86, co stanowi odbicie ich interakcji z limfocytami B i T obecnymi w naciekach komórkowych.

Główne składowe klasyfikacji REAL/WHO z przykładami jednostek chorobowych, ich powszechnie stosowanymi skrótami, a także z międzynarodowymi kodami ICD10 i ICD-0 przedstawiono w tabeli 1.

MARKERY WYKORZYSTYWANE W DIAGNOSTYCE CHŁONIAKÓW

CD1

Charakterystyka ogólna: Rodzina niepolimorficznych glikoprotein podobnych do cząsteczek HLA klasy I, obecnych na powierzchni różnych komórek prezentujących antygen. Należy do nadrodziny immunoglobulin. Występuje w postaci 5 różnych form (CD1a–CD1e), wszystkie niekowalencyjnie związane z β 2-mikroglobuliną. Infekcja *Mycobacterium tuberculosis* lub ekspozycja na produkty jej ściany komórkowej przekształca CD1(-) prekursorzy linii mieloidalnej w kompetentne CD1(+) komórki prezentujące antygen.

Funkcja: udział w prezentacji autologicznych i bakteryjnych antygenów lipidowych komórkom T, może także uczestniczyć w rozwoju grasiczych limfocytów T;

Zastosowanie: diagnostyka histiocytozy X;

Reakcje dodatnie (kom. normalne): korowe tymocyty (70%), aktywowane komórki T, komórki Langerhansa, komórki dendrytyczne;

Reakcje dodatnie (patologie): histiocytoza X, pre-T ALL z fenotypem korowych tymocytów;

Reakcje ujemne: dojrzałe obwodowe limfocyty T, obwodowe chłoniaki T komórkowe.

CD2

Charakterystyka ogólna: Określany też nazwą receptora rozet E (przeciwciała przeciw CD2 blokują tworzenie rozet z erytrocytami owcy), LFA2, T11, należy do nadrodziny immunoglobulin, wczesny marker komórek T.

Funkcje: (a) wiąże CD58 (LFA3) na komórkach prezentujących antygen (APC); (b) indukuje sygnały kostymulujące w komórkach T; (c) indukuje produkcję cytokin przez komórki T; (d) uczestniczy w przyleganiu komórek T do APC; (e) reguluje aktywność cytolityczną komórek T i NK; (f) blokuje apoptozę aktywowanych obwodowych limfocytów T; (g) reguluje anergię limfocytów T;

Zastosowanie: marker limfocytów T, ekspresja powierzchniowa;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): tymocyty (95%), dojrzałe obwodowe limfocyty T, komórki NK (80–90%), grasicze komórki B (50%);

Reakcje dodatnie (patologie): T-ALL, białaczki/chłoniaki T-komórkowe;
Reakcje ujemne: limfocyty B, nowotwory spoza układu krwiotwórczego.

CD3

Charakterystyka ogólna: OKT3. Należy do nadrodziny immunoglobulin. Kompleks glikoproteinowych łańcuchów δ , ϵ , γ , ξ i ϵ związanych z receptorem komórki T (TCR). Kompleks TCR-CD3 składa się z heterodimerów TCR α/β lub TCR γ/δ występujących w błonie komórkowej w ko-ekspresji z CD3. CD3 zeta wchodzi w interakcje z białkiem HIV Nef.

Zastosowanie: najbardziej swoisty marker limfocytów T; ekspresja powierzchniowa oraz cytoplazmatyczna na niższych etapach różnicowania limfocytów T;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): tymocyty, obwodowe komórki T, kom. NK (CD3 epsilon, w cytoplazmie w 56%, brak ekspresji błonowej);

Reakcje dodatnie (patologie): 80% chłoniaków z komórek T, chłoniaki z kom. NK (cytoplazmatyczna, brak ekspresji błonowej);

Reakcje ujemne: większość chłoniaków B komórkowych, białaczka z dużych ziarnistych kom. NK, rak drobnokomórkowy, czerniak, poprzyszczepowe zespoły limfoproliferacyjne.

CD4

Charakterystyka ogólna: OKT4 – niepolimorficzna glikoproteina należąca do nadrodziny immunoglobulin – występuje na powierzchni komórek T pomocniczych, jako koreceptor w aktywacji limfocytów T, w warunkach restrykcji MHC klasy II; receptor dla wirusa HIV na komórkach T, makrofagach, mózgu – homologiczny do CD223;

Zastosowanie: klasyfikacja chłoniaków i stanów zapalnych; stężenie w surowicy jest markerem progresji AIDS i odpowiedzi na terapię;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): tymocyty (80–90%), komórki T pomocnicze, makrofagi, komórki Langerhansa, komórki dendrytyczne, granulocyty;

Reakcje dodatnie (patologie): wiele pograsiczych białaczek/chłoniaków z kom. T;

Reakcje ujemne: kom. NK, chłoniaki z komórek T z fenotypem cytotoksycznym, wątrobowo-śledzionowe chłoniaki α/β i γ/δ , zwykle chłoniaki z komórek B, chłoniak Hodgkina (zwykle), nowotwory spoza układu krwiotwórczego.

CD5

Charakterystyka ogólna: Należy do konserwatywnej nadrodziny receptorów związanych z komórkami B-1 produkującymi polireaktywne, naturalne przeciwciała o niskim powinowactwie przeciw antygenom egzogennym (toksoid tężca, lipopolisacharyd), a także autoreaktywne przeciwciała; pierwsza linia obrony przed antygenami, o niskim progu aktywacji; jedyna linia obrony w sytuacji braku możliwości produkcji swoistych przeciwciał; kluczowy regulator tolerancji immunologicznej, zaburzenia mogą być przyczyną procesów autoimmunizacyjnych; wiąże się z antygenem CD72;

Zastosowanie: marker CLL, chłoniaka z komórek płaszczka, komórek T (normalnych i nowotworowych), raki grasicy;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): tymocyty, większość komórek T, komórki B strefy płaszczka śledziony i węzłów chłonnych, 12% limfocytów B w krwi obwodowej, komórki B w jamie opłucnej i otrzewnej, w życiu płodowym większość komórek B w śledzionie jest CD5⁺;

Reakcje dodatnie (patologie): komórki B w CLL/SLL, chłoniak z komórek płaszczka (80–90%), rozlany chłoniak z dużych limfocytów B, agresywny wariant chłoniaka grudkowego, większość rozrostów nowotworowych z komórek T, chłoniaki NK/T, białaczka prolimfocytowa;

Reakcje ujemne: chłoniak z kom. T związany z enteropatią, wątrobowo-śledzionowe chłoniaki z kom. T z receptorem α/β i γ/δ , chłoniak z dużych ziarnistych limfocytów T, większość chłoniaków z komórek B innych niż MCL lub CLL, komórki Reed-Sternberga w chłoniaku Hodgkina.

CD7

Charakterystyka ogólna: należący do nadrodziny immunoglobulin czynnik kostymulujący limfocytów T, ekspresja błonowa we wczesnych etapach rozwoju limfocytów T, przed rearanżacją (przegrupowaniem) genów TCR, odgrywanie istotnej roli w interakcjach między komórkami T i B we wczesnych fazach rozwoju tkania limfatycznego, utrata ekspresji CD7 i zaburzenia glikozylacji mogą być przyczyną oporności na apoptozę nowotworowych limfocytów T w ziarniniaku grzybiastym (*mycosis fungoides*);

Zastosowanie: może być użyteczny w diagnostyce ziarniniaka grzybiastego;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): tymocyty, dojrzałe komórki T (85%), większość komórek NK, monocyty, progenitorowe komórki hematopoetyczne, wczesne komórki linii mieloidalnej, komórki pre-B;

Reakcje dodatnie (patologie): T-ALL (bardzo dobry marker) i inne niedojrzałe komórki T, chłoniaki NK, rzadziej chłoniaki B, ostra białaczka mieloidalna – AML (czasem), przewlekłe białaczki szpikowe (CML);

Reakcje ujemne: dojrzałe komórki B, granulocyty, B-ALL, ziarniniak grzybiasty, T komórkowa białaczka/chłoniak dorosłych, komórki Reed-Sternberga.

CD8

Charakterystyka ogólna: OKT8 – błonowa glikoproteina, należąca do nadrodziny immunoglobulin, heterodimer zbudowany z łańcuchów α/β i γ/δ , związanych mostkiem dwusiarczkowym, wiąże się z niepolimorficznym regionem cząsteczek HLA klasy I, niski stosunek CD8:CD3 sugeruje rozpoznanie ziarniniaka grzybiastego;

Zastosowanie: marker komórek T cytotoksycznych;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): korowe tymocyty (70–80%), komórki T (25–35% dojrzałych obwodowych komórek T), komórek NK (30%, które są także CD3 negatywne);

Reakcje dodatnie (patologie): epidermotroficzne limfocyty w ziarniniaku grzybiastym, chłoniak z komórek T w tkance podskórnej, nieagresywny rozrost prekursorów komórek T, chłoniak z komórek NK/T (różnie), niektóre pograsicze chłoniaki z kom. T;

Reakcje ujemne: białaczka/chłoniak z komórek T dorosłych.

CD10

Charakterystyka ogólna: CALLA (*Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen*), obojętna endopeptydaza 24.11, neprylizyna, enkefalinaza, metalopeptydaza, charakterystyczny marker komórek centr rozrodczych i chłoniaka grudkowego, inaktywuje bioaktywne peptydy, w tym bombezynę;

Zastosowanie: ostra białaczka limfoblastyczna (ALL): jeden z pierwszych markerów do identyfikacji komórek białaczkowych u dzieci, angioimmunoblastyczny chłoniak z komórek T: komórki nowotworowe są CD10⁺ w przypadku węzłowej i pozawęzłowej lokalizacji innej niż szpikowa, w odróżnieniu od braku ekspresji CD10 w innych chłoniakach z kom. T, nienowotworowe komórki T mogą być CD10⁺, chłoniak Burkitta: potwierdzenie rozpoznania, rozlany chłoniak wielkokomórkowy: marker centr rozrodczych (także bcl-6), chłoniak grudkowy: CD10⁺ może potwierdzać rozpoznanie; CD10⁺ i bcl-6⁺ stanowi pozytywny czynnik rokowniczy, nietypowa ekspresja w chłoniakach: opisano w chłoniaku z komórek płaszczka, chłoniaku strefy brzeżnej, innych chłoniakach z ko-ekspresją CD5, reakcje dodatnie (komórki normalne): komórki hematopoetyczne – pre-B, pre-T, komórki centr rozrodczych, granulocyty, niektóre komórki T;

Reakcje dodatnie (patologie): białaczka/chłoniak – preB ALL (75%), preT ALL (63%), angioimmunoblastyczny z kom. T, chłoniak Burkitta, CML w przełomie blastycznym (90%), rozlany chłoniak z dużych komórek B, grudkowy (70%), białaczka włosianokomórkowa (10%), szpiczak (czasem);

Reakcje ujemne: białaczki/chłoniaki – AML, chłoniak *Burkitt's-like*, CLL, zaburzenia limfoproliferacyjne EBV⁺, chłoniak z komórek płaszczka, chłoniak strefy brzeżnej.

CD19

Charakterystyka ogólna: wczesny antygen komórek B w tkankach płodowych, reguluje rozwój, aktywację i różnicowanie tych komórek;

Zastosowanie: ocena komórek B i związanych z nimi zaburzeń;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): komórki pre B, komórki B, pierwszy antygen kom. B po HLA-DR, grudkowe komórki dendrytyczne – FDC (*follicular dendritic cells*);

Reakcje dodatnie (patologie): białaczki/chłoniaki z komórek B, czasem AML (M0), czasem CML w fazie przełomu blastycznego, niekiedy w anaplastycznym chłoniaku wielkokomórkowym;

Reakcje ujemne: komórki plazmatyczne, szpiczak, większość chłoniaków z komórek T.

CD20

Charakterystyka ogólna: pojawia się na komórkach B po CD19/CD10 i przed CD21/CD22 i immunoglobulinami powierzchniowymi, ściśle związany z FMC7, który rozpoznaje epitopy CD20, szczególnie w przypadkach wysokiej ekspresji CD20. Rituximab jest chimerycznym mysio-ludzkim przeciwciałem anty-CD20 używanym w leczeniu chłoniaków B komórkowych; leczenie może powodować selekcję CD20 negatywnych (ale CD79a⁺) subklonów nowotworowych;

Zastosowanie: marker komórek B;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): większość komórek B, także grudkowe komórki dendrytyczne;

Reakcje dodatnie (patologie): 90% chłoniaków z komórek B; także B-CLL, HCL, pre B ALL/LBL, 20% klasycznych chłoniaków Hodgkina, niektóre szpiczaki;

Reakcje ujemne: komórki spoza układu krwiotwórczego, większość limfocytów T, komórki plazmatyczne.

CD21

Charakterystyka ogólna: CR2, receptor C3d, receptor EBV;

Zastosowanie: różnicuje skórne lub węzłowe chłoniaki z komórek płaszczka od chłoniaka grudkowego;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): dojrzałe kom. B, grudkowe komórki dendrytyczne;

Reakcje dodatnie (patologie): mięsak z grudkowych komórek dendrytycznych, HCL, chłoniaki B komórkowe (szczególnie z komórek płaszczka i strefy brzeżnej), niektóre T-ALL;

Reakcje ujemne: komórki plazmatyczne.

CD22

Charakterystyka ogólna: cząsteczka adhezyjna limfocytów B (BL-CAM); wiąże CD45;

Zastosowanie: marker kom. B, diagnostyka HCL, B-CLL zwykle CD22(-);

Reakcje dodatnie (komórki normalne): kom. B;

Reakcje dodatnie (patologie): HCL, pre B-ALL, inne białaczki/chłoniaki z kom. B;

Reakcje ujemne: komórki plazmatyczne.

CD23

Charakterystyka ogólna: Zwany również receptorem dla IgE o niskim powinowactwie fragment Fc receptora IgE (lektyna typu C) działa jako czynnik wzrostu i aktywacji kom. B. Promuje różnicowanie do kom. plazmatycznych. Reguluje syntezę IgE przez wiązanie CD21 i IgE. CD21, CD23 i CD35 są markerami komórek dendrytycznych.

Zastosowanie: różnicowanie między SLL/CLL (CD23⁺) i MCL lub chłoniakiem MALT (CD23⁻); marker kom. B, szczególnie w diagnostyce SLL/CLL, chłoniaka z dużych kom. B śródpiersia i chłoniaka limfoplazmocytairego; chłoniak z komórek płaszczka (MCL): zwykle CD23 ujemny, ale czasem CD23 jest obecny z niską intensywnością w analizie cytometrycznej, przypadki CD23⁺MCL wykazują wysoką

ekspresję cykliny D1; różnicowanie między MCL i chłoniakiem grudkowym (FL); wysokie stężenie rozpuszczalnego CD23 jest związane z większą agresywnością i gorszą prognozą w CLL;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): aktywowane, dojrzałe kom. B wykazujące ekspresję IgM lub IgD, aktywowane monocyty/makrofagi, płytki, eozynofile, kom. Langerhansa, FDC;

Reakcje dodatnie (patologie): kom. B w CLL/SLL (większość przyp., wysoka ekspresja); guzy z komórek dendrytycznych, chłoniak z dużych kom. B śródpiersia (70%), chłoniak limfoplazmocytarny (61%, zwykle słaba ekspresja), HCL (17%), DLBL (16%);

Reakcje ujemne: inne chłoniaki B-komórkowe, jak chłoniak Burkitta, chłoniak Burkitt-like, FL, MCL, MZL; także większość chłoniaków T komórkowych.

CD25

Charakterystyka ogólna: łańcuch receptora dla IL-2 TAG;

Zastosowanie: wysoka ekspresja CD25 jest związana z zaawansowanym skórnym chłoniakiem T komórkowym;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): aktywowane kom. B i T, makrofagi, niektóre tymocyty, niektóre kom. prekursorowe linii mieloidalnej;

Reakcje dodatnie (patologie): HCL (większość), anaplastyczny chłoniak wielkokomórkowy, większość nowotworów z kom. B, chłoniak/białaczka z kom. T dorosłych, większość chłoniaków Hodgkina, niektóre AML;

Reakcje ujemne: chłoniak strefy brzeżnej, chłoniak/białaczka z dużych ziarnistych kom. T, zwykle HCL-v.

CD30

Charakterystyka ogólna: Należy do rodziny powierzchniowych receptorów dla TNF, nadekspresja powoduje konstytutywną ekspresję czynnika jądrowego NF- κ B, co tworzy molekularne podstawy nieprawidłowego wzrostu i ekspresji cytokin prowadzących do chłoniaka Hodgkina, przeciwciała anty-CD30 mogą mieć zastosowanie terapeutyczne w leczeniu opornych postaci chłoniaka Hodgkina;

Zastosowanie: potwierdzenie rozpoznania anaplastycznego chłoniaka wielkokomórkowego i klasycznego chłoniaka Hodgkina;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): granulocyty, niektóre komórki plazmatyczne, aktywowane komórki B, T i NK, monocyty;

Reakcje dodatnie (patologie): anaplastyczny chłoniak wielkokomórkowy (90%), komórki Reed-Sternberga, także kom. Reed-Sternberg-podobne w chłoniaku grudkowym, chłoniak z dużych kom. B pierwotny śródpiersia, obwodowy chłoniak T komórkowy (czasem), chłoniak Lennerta (czasem), pierwotny chłoniak wysiękowy;

Reakcje ujemne: białaczka prolimfocytarna z komórek T, chłoniak/białaczka z kom. T dorosłych, pre-B ALL.

CD34

Charakterystyka ogólna: międzykomórkowe białko adhezyjne (mucyna) i powierzchniowa glikoproteina; ligandem jest CD62L (L-selektyna), uczestniczy w

wiązaniu komórek macierzystych (pnia – *stem cells*) do szpikowej macierzy pozakomórkowej lub bezpośrednio do komórek podścieliska, marker hematopoetycznych komórek macierzystych, występuje jednak także w niektórych komórkach normalnych, np. we wszystkich śródbłonkach naczyń;

Zastosowania w hematologii:

- a) diagnostyka ostrych białaczek mieloblastycznych i białaczek/chłoniaków limfoblastycznych,
- b) ocena ilościowa i badania czystości populacji limfohematopoetycznych komórek progenitorowych do celów badawczych i w transplantologii,
- c) identyfikacja blastów w hipoplastycznych w szpikach dla różnicowania między ostrą białaczką i zespołem mielodysplastycznym (blasty obecne) i anemią aplastyczną (brak blastów/niska zawartość komórek CD34⁺),
- d) zły czynnik prognostyczny w świeżo rozpoznanych AML,
- e) diagnostyka przełomu blastycznego w MDS, CML,
- f) różnicowanie między grasiczakiem bogatym w limfocyty (kom. CD34⁺) i T-ALL (zwykle CD34⁻);

Reakcje dodatnie (w zakresie komórek normalnych układu krwiotwórczego/chłonnego): hematopoetyczne komórki progenitorowe, prekursorowe limfocyty T i B, megakariocyty;

Reakcje dodatnie (patologie w zakresie komórek układu krwiotwórczego/chłonnego): preB-ALL (75%), AML (40–60%), z wyjątkiem M3, AML-M0 (większość), zespół mielodysplastyczny – MDS (mieloblasty), mięsak Kaposiego.

CD38

Charakterystyka ogólna: wielofunkcyjny enzym, ligandem jest CD31, w zależności od środowiska komórkowego ogranicza lub stymuluje aktywację i proliferację komórek, udział w adhezji między limfocytami i komórkami śródbłonna, marker aktywacji, może powodować fizjologiczną śmierć komórek T w grasicy, komórki T CD8⁺ CD38⁺ u chorych HIV dodatnich mogą być bardziej podatne na apoptozę, obecność na 30% lub więcej komórek B-CLL jest związana z gorszym rokowaniem;

Zastosowanie: identyfikacja komórek plazmatycznych i o różnicowaniu plazmoblastycznym, diagnostyka szpiczaka, wartość prognostyczna u chorych z CLL;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): silna reakcja komórek plazmatycznych, komórki T, B, NK, monocyty, prekursorzy komórek linii erytrocytarnej i mieloidalnej;

Reakcje dodatnie (patologie): pre-T ALL, AML podtyp t(6;9) (100%), CLL/SLL, rozlany chłoniak wielkokomórkowy z kom. B (część przypadków), chłoniaki grudkowy, limfoplazmocytny (48%), plazmoblastyczny, szpiczak;

Reakcje ujemne: komórki tuczne, prymitywne wielopotencjalne komórki pnia, śledzionowy chłoniak strefy brzeżnej.

CD56

Charakterystyka ogólna: N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), marker kom. NK, obecny także na kom. CD4⁺ i CD8⁺;

Zastosowanie: marker kom. NK i chłoniaków z kom. NK; różnicuje kom. plazmatyczne w szpiczaku (CD56⁺) od odczynowego rozrostu plazmocytów lub gammapatii monoklonalnej o nieokreślonym znaczeniu – MGUS (CD56⁻);

Reakcje dodatnie (komórki normalne): kom. NK (80–90%), aktywowane kom. T, osteoblasty; tyreocyty, tkanka neuroendokrynną, mięśnie szkieletowe (czasem);

Reakcje dodatnie (patologie): AML (czasem), skórne zespoły limfoproliferacyjne, chłoniaki z komórek NK/T, szpiczak mnogi (w części przypadków).

CD57

Charakterystyka ogólna: Leu7, β -1,3-glukuronylotransferaza 1, glikoproteina pełniąca funkcje cząsteczki adhezyjnej;

Zastosowanie: marker kom. NK i nowotworów neuroendokrynnych;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): kom. NK, T, także tkanka neuroektodermalna, mózg, prostata;

Reakcje dodatnie (patologie): niektóre chłoniaki śledzionowowątrobowe z kom. T, chłoniak Hodgkina, pre T-ALL (czasem), białaczka z dużych ziarnistych limfocytów T (czasem);

Reakcje ujemne: kom. B, monocyty, erytrocyty, płytki krwi, chłoniaki NK/T nosowe, guz Wilmsa.

CD79a

Charakterystyka ogólna: MB-1, łańcuch kompleksu receptorowego limfocytów B (BCR); wczesny antygen różnicowania limfocytów B, obecny na tych komórkach zanim pojawią się markery dojrzałych limfocytów B, występuje też na komórkach plazmatycznych;

Zastosowanie: identyfikacja limfocytów B, diagnostyka ALL, w tym przypadki CD20(–) lub po leczeniu rituximabem (anty CD-20);

Reakcje dodatnie (komórki normalne): limfocyty B, plazmocyty;

Reakcje dodatnie (patologie): białaczki/chłoniaki z komórek B;

Reakcje ujemne: anaplastyczny chłoniak wielkokomórkowy.

CD79b

Charakterystyka ogólna: B29, łańcuch kompleksu receptorowego limfocytów B (BCR);

Zastosowanie: różnicowanie CLL od innych rozrostów z komórek B;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): limfocyty B, kom. plazmatyczne;

Reakcje dodatnie (patologie): chłoniaki z kom. B i zespoły limfoproliferacyjne – CLL (18%), CLL z ekspresją IgM (58%), chłoniak limfoplazmatyczny (85%);

Reakcje ujemne: HCL (zwykle).

CD103

Charakterystyka ogólna: integryna (EB7);

Zastosowanie: marker śródnapłonkowych limfocytów (normalnych lub nowotworowych);

Reakcje dodatnie (komórki normalne): limfocyty śródnabłonkowe, niektóre limfocyty błony podstawnej w jelicie;

Reakcje dodatnie (patologie): HCL, AML, chłoniak z komórek T związany z enteropatią, białaczka z kom. T dorosłych związana z HTLV-1.

CD117

Charakterystyka ogólna: c-kit, receptor czynnika wzrostu 145 kD kinazy tyrozynowej niezbędny dla rozwoju i przeżycia hematopoetycznych komórek macierzystych;

Zastosowanie: różnicowanie nowotworów o lokalizacji szpikowej;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): hematopoetyczne komórki progenitorowe, melanocyty, śródbłonki, komórki tuczne;

Reakcje dodatnie (patologie): AML, chłoniak Hodgkina (niektóre komórki Reed-Sternberga), mięsak Ewinga, mięsak granulocytarny.

CD138

Charakterystyka ogólna: syndekan-1, cząsteczka adhezyjna, wiąże typ I kolagenu, receptor dla białek macierzy pozakomórkowej, czynnik wzrostu, związany z późną fazą różnicowania kom. B, utrata ekspresji CD138 jest związana ze wzrostem agresywności raka płaskonabłonkowego głowy, szyi i krtani, ekspresja powierzch-niowa;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): prekursorzy kom. B, kom. plazmatyczne, nabłonek płaski;

Reakcje dodatnie (patologie): rogowiak kolczysty (*keratoacanthoma*), szpiczak, pierwotny chłoniak wysiękowy, chłoniak na tle ropniaka opłucnej;

Reakcje ujemne: dojrzałe kom. B.

TdT

Charakterystyka ogólna: Terminalna deoksynukleotydylo-transferaza, polimeraza, jądrowy enzym katalizujący wiązanie nukleotydów do jednoniciowego DNA, jak wykazano, TdT jest włączony w regulację rearanzacji genów w czasie rozwoju normalnych limfocytów T i B;

Reakcje dodatnie (komórki normalne): w jądrach niedojrzałych limfocytów T i B obecnych w grasicy i szpiku kostnym;

Reakcje dodatnie (patologie): niektóre komórki nowotworowe białaczek/chłoniaków limfoblastycznych wykazują wysoką aktywność TdT;

Reakcje ujemne: dojrzałe limfocyty normalnej krwi obwodowej zwykle nie zawierają tego enzymu.

PROCEDURY REAKCJI IMMUNOFLUORESCENCYJNYCH

W większości przypadków, identyfikację markerów poszczególnych typów komórek w toku przygotowania ich do analizy cytometrycznej w diagnostyce białaczek/chłoniaków prowadzi się na podstawie bezpośredniej reakcji immuno-

fluorescencyjnej. Przeciwciała przeciw tym cząsteczkom (najczęściej monoklonalne) znakowane są różnymi fluorochromami. Umożliwia to równoczesną ocenę ekspresji kilku markerów na określonej populacji komórek. Zakres tej oceny jest uwarunkowany typem dostępnego cytofluorymetru.

Poniżej zamieszczamy przykład procedury bezpośredniej reakcji immunofluorescencyjnej. Procedura ta umożliwia jednoczesną ocenę ekspresji cząsteczek powierzchniowych i występujących w cytoplazmie.

Procedura

1. Przygotować zawiesinę (komórek wyizolowanych techniką gradientową lub pochodzących z hodowli komórkowej) zawierającą 5×10^6 komórek/ml w HBSS+0,1% BSA.

2. Do probówek 12×75 mm wprowadzić 100 l zawiesiny komórek (5×10^5 kom.). Dodać określoną objętość przeciwciał przeciw białkom powierzchniowym. Optymalną objętość przeciwciał należy określić w testach kontrolnych. Zwykle jest to 2–10 μ l przeciwciała. Inkubować 30 min, w temp. 4°C, bez dostępu światła.

3. Płukać komórki 2 \times w HBSS i zawiesić w 200 l tego medium.

Po wykonaniu tych czynności można przystąpić do cytometrycznej akwizycji danych, gdy celem jest ocena ekspresji markerów powierzchniowych. Procedurę można kontynuować, gdy równocześnie chcemy zbadać obecność białek w cytoplazmie badanych komórek.

4. Do zawiesiny komórek (zob. punkt 3) dodać 200 l świeżo przygotowanego 2% roztworu paraformaldehydu w HBSS. Roztwór ten nie powinien być dłużej używany niż 1 tydzień. Utrwalać w temp. 4°C, przez 30 min.

5. Płukać komórki nie mniej niż 3 \times w HBSS. Osad zawiesić w 1 ml 0,1% roztworu saponiny w HBSS. Permeabilizować przez 30 min w temp. 4°C.

6. Zwirować, osad komórek pozostawić w 100 l supernatantu.

7. Dodać przeciwciało przeciw badanej cząsteczce cytoplazmatycznej. Wymieszać. Inkubować 30 min w temp. pok., bez dostępu światła.

8. Płukać komórki w HBSS. Zwirować 2000 rpm., 5 min. Odrzucić supernatant. Zawiesić osad komórek w 300 l PBS.

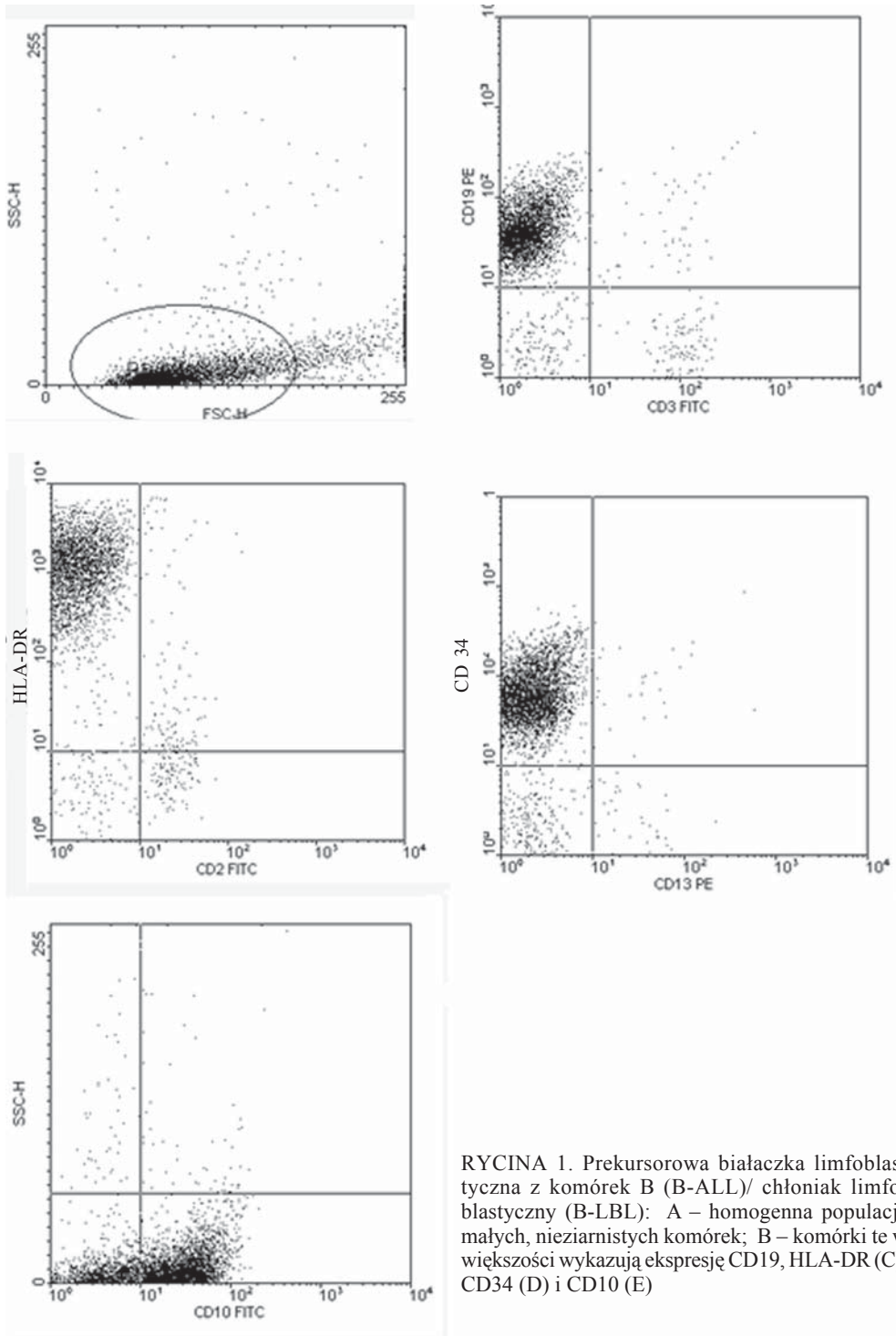
9. Przeprowadzić akwizycję cytometryczną.

Procedurę reakcji cytoplazmatycznych można przeprowadzić również z zastosowaniem gotowych zestawów do utrwalania i permeabilizacji. Ich producenci określają sposób ich wykorzystania.

CHARAKTERYSTYKA IMMUNOFENOTYPOWA

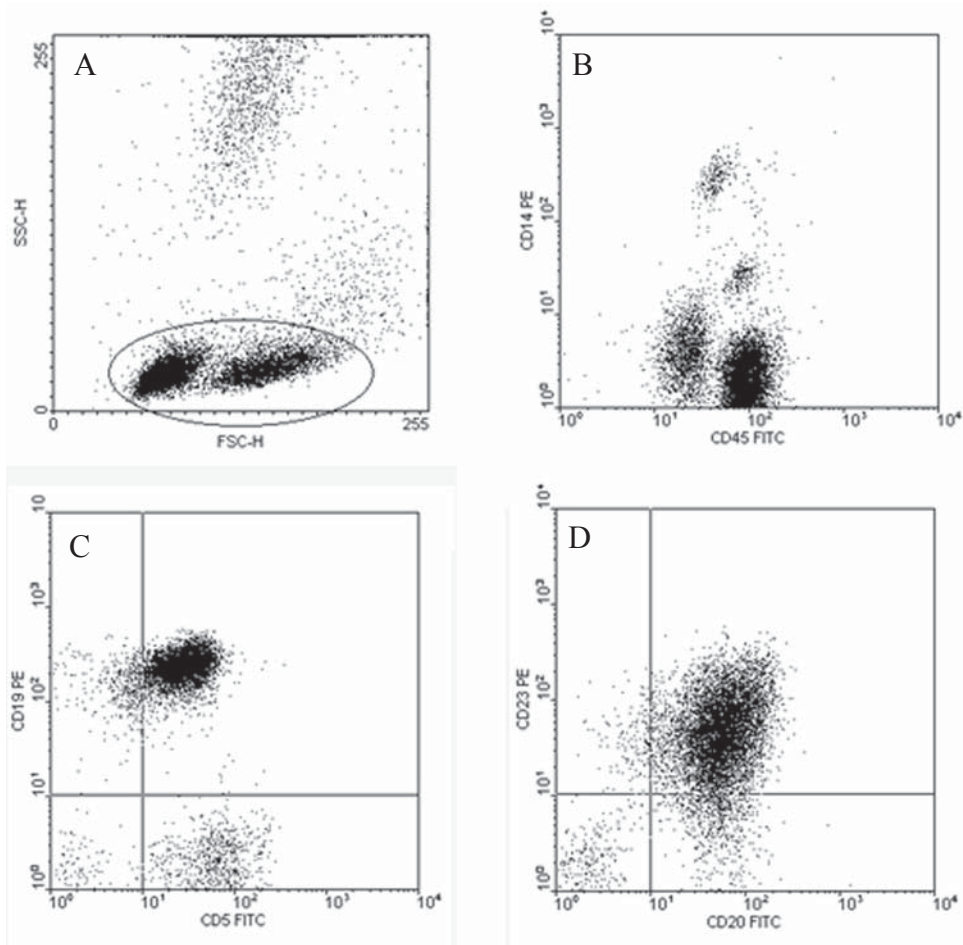
Prekursorowe chłoniaki z komórek B

Prekursorowa białaczka limfoblastyczna z komórek B (B-ALL)/ chłoniak limfoblastyczny (B-LBL). Limfoblasty w B-ALL/LBL wykazują obecność transferazy deoksynukleotydylowej (TdT), HLA-DR. Zwykle są CD19(+) i cCD79a(+). W



RYCINA 1. Prekursorowa białaczka limfoblastyczna z komórek B (B-ALL)/ chłoniak limfoblastyczny (B-LBL): A – homogenna populacja małych, nieziarnistych komórek; B – komórki te w większości wykazują ekspresję CD19, HLA-DR (C), CD34 (D) i CD10 (E)

większości przypadków są CD10(+) i CD24(+). W ok. 30% B-ALL/B-LBL występują aberracje chromosomalne. Mają one znaczenie prognostyczne, są też związane z określonym obrazem immunofenotypowym, np. limfoblasty w t(4;11)ALL są zwykle CD10(-), CD24(-). Powierzchniowa ekspresja CD22 i CD20 jest zróżnicowana, natomiast obecność cCD22 jest liniowo-swoista. CD45 może nie występować. Stopień zróżnicowania blastów koreluje z przebiegiem klinicznym i zaburzeniami genetycznymi. W stadium najwcześniejszym (pro-B-ALL) blasty wykazują obecność CD19, cCD79a, cCD22 i TdT. W stadium pośrednim (*common ALL*) blasty są CD10(+). W stadium dojrzałych prekursorów (pre-B-ALL) blasty wykazują ekspresję cytoplazmatyczną łańcucha ciężkiego mu (*cyt-mu*). Charakterystyczny jest brak powierzchniowej ekspresji immunoglobulin. CD34 występuje w ok. 75% przypadków. Mogą być obecne markery linii mieloidalnej CD13 i CD33. Ich ekspresja nie wyklucza rozpoznania prekursorowego chłoniaka z komórek B.



RYCINA 2. Przewlekła białaczka limfatyczna z komórek B: A, B – wśród leukocytów dominują limfocyty; C – są to limfocyty B CD19 w większości wykazujące obecność CD5; D – limfocyty B CD20+ w całości wykazują obecność CD23

Rozrosty nowotworowe z dojrzałych limfocytów B

Przewlekłe białaczki limfatyczne dzieli się na cztery grupy. Najczęściej występuje przewlekła białaczka limfatyczna B-CLL (85–90%), rzadziej białaczka prolimfocytowa z komórek B (5%), białaczka włosianokomórkowa (HCL) (5–10%) i HCLv (*hairy cell variant' leukaemia*). Niektóre typy B-NHL szybko przechodzą w postać białaczkową. W tych przypadkach, z klinicznego punktu widzenia, istotne jest różnicowanie między klasyczną przewlekłą białaczką limfatyczną i różnymi podtypami białaczkowych postaci B-NHL, takich jak: chłoniak z komórek płaszczka – MCL (*mantle-cell lymphoma*), chłoniak grudkowy – FL (*follicular lymphoma*), śledzionowy chłoniak strefy brzeżnej – SLVL (*splenic marginal zone lymphoma with villous lymphocytes*) i chłoniak Burkitta. Wieloparametryczna analiza immunofenotypowa pozwala na różnicowanie tych podtypów rozrostów nowotworowych z dojrzałych limfocytów B.

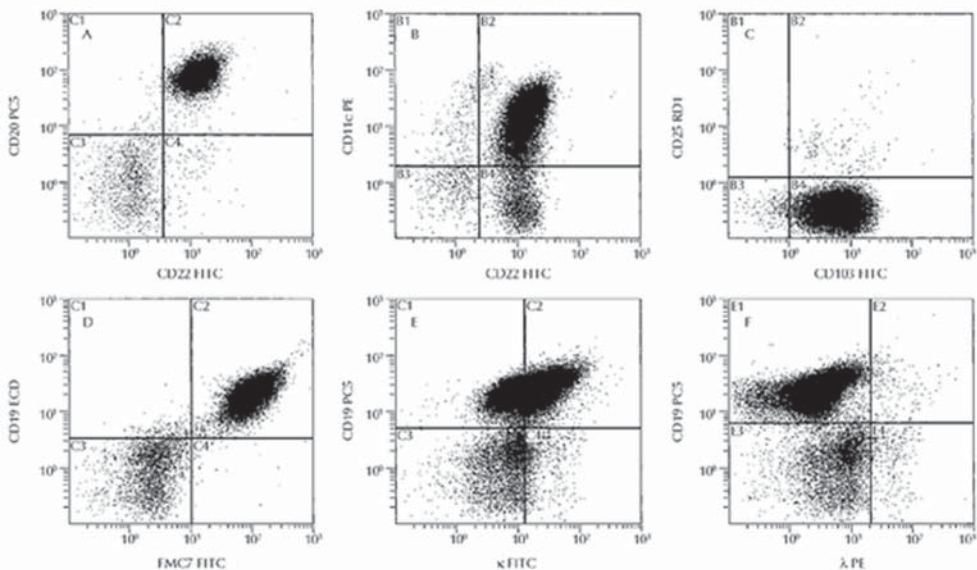
Przewlekła białaczka limfatyczna z komórek B. Typowe komórki B-CLL są względnie małe, zwykle nieco większe niż normalne limfocyty. Ekspresja powierzchniowych immunoglobulin jest słaba do bardzo słabej. Komórki te wykazują ekspresję CD5 i CD23. Jednocześnie komórki te wykazują słabą ekspresję CD79b i CD22 oraz są FMC7 ujemne.

Badania molekularne genów immunoglobulinowych pozwoliły na zidentyfikowanie B-CLL bez somatycznych hipermutacji tych genów, co jest związane z bardziej agresywnym przebiegiem choroby. Brak mutacji somatycznych w badaniach cytometrycznych koreluje z ekspresją kinazy ZAP-70 i w mniejszym zakresie z ekspresją CD38.

Wśród komórek B-CLL mogą występować komórki większe, jak prolimfocyty, komórki podobne do immunoblastów czy też komórki o różnicowaniu limfoplazmocytnym z cytoplazmatyczną ekspresją immunoglobulin. Czasem liczba prolimfocytów wzrasta w miarę progresji choroby. Wzrost odsetka tych komórek do 10–55% upoważnia do rozpoznania prolimfocytowej transformacji B-CLL.

Białaczka prolimfocytowa z komórek B. Do rozpoznania B-PLL upoważnia obecność wśród komórek białaczki z dojrzałych limfocytów B 55% lub więcej prolimfocytów. Są to komórki okrągłe, średniej wielkości, ale dwukrotnie większe od limfocytów, z jednym dużym centralnie zlokalizowanym jądrem. Jest to rzadki typ białaczki, zwykle charakteryzujący się wysoką leukocytozą. Ekspresja SmIg jest silniejsza w porównaniu z B-CLL. W większości B-PLL nie stwierdza się ekspresji CD5 i CD23, natomiast występuje silna ekspresja CD22 i FMC7.

Chłoniak limfoplazmocytny/makroglobulinemia Waldenstroema. Jest to rozrost nowotworowy komórek różnicujących się w kierunku komórek plazmatycznych i ich prekursorów. Są to komórki B CD5(-), cechujące się zaburzeniami produkcji immunoglobulin. Komórki wykazują cytoplazmatyczną i powierzchniową obecność Ig (zwykle IgM, czasem IgG, rzadko IgA). Wykazują ekspresję markerów linii B (CD19, CD20, CD22, CD79a) i są CD5(-), CD10(-), CD23(-) i CD38(+). Brak CD5 i silna cytoplazmatyczna ekspresja Ig pozwala na różnicowanie z CLL.



RYCINA 3. Białaczka włosianokomórkowa – wariant HCL (HCLv): A – ekspresja antygenów różnicowania limfocytów B CD20 i CD22; B – ekspresja CD11c na komórkach nowotworowych; C – ekspresja CD103 na komórkach nowotworowych i w odróżnieniu od HCL brak obecności CD25; D – ekspresja CD19 i FMC7 na komórkach nowotworowych; E i F – cechy rozrostu monoklonalnego: obecność łańcuchów lekkich kappa immunoglobulin i brak ekspresji łańcuchów lambda (wg *Pathologyoutlines.com*)

Białaczka włosianokomórkowa i wariant HCL (HCLv). Większość komórek HCL ma owalne do nerkowatych jądra, obfitą cytoplazmę. W błonie komórkowej występują cienkie, nieregularne wypustki (stąd nazwa „włosianokomórkowa”). Te cechy morfologiczne znajdują odzwierciedlenie w obrazie cytometrycznym. W układzie FSC/SSC obraz komórek HCL różni się od normalnych limfocytów. Komórki nowotworowe przemieszczają się na osi FSC w kierunku wyższych wartości rozproszenia przedniego, co zbliża je do obrazu monocytów. Ekspresja SmIg jest silna, podobnie jak CD20 i CD22. Komórki HCL są także CD11c (+), CD25 (+) i CD103 (+). CD103, a także HC2 są antygenami swoistymi dla HCL. Komórki te nie wykazują też obecności CD24.

Komórki HCL-v morfologicznie cechuje wyższy stosunek jądro/cytoplazma i obecność jąderek w porównaniu z HCL. Liczba komórek białaczkowych w krwi obwodowej jest zwykle wyższa w HCLv niż w klasycznym HCL. W obrazie immunofenotypowym komórki HCLv nie wykazują obecności CD25 i HC2.

Chłoniak z komórek płaszczka – MCL (*mantle-cell lymphoma*). Komórki nowotworowe są małe do średnich, ze skąpą cytoplazmą. Jądro jest nieregularne. MCL jest często rozsiany, w krwi i szpiku mogą być obecne liczne komórki nowotworowe. Obraz immunofenotypowy jest następujący: CD5(+), CD20(+), FMC7(+), CD10(-), CD23(-), SmIg (+), cyklina D1(+).

Chłoniak grudkowy – FL (*follicular lymphoma*). FL szybko przechodzi w fazę białaczkową. W obrazie immunofenotypowym komórki FL wykazują silną ekspresję

SmIg (głównie IgM) i często słabą ekspresję CD10. Czasem FL jest CD5 (+) lub CD23(+). Badanie cytometryczne wewnątrzkomórkowej ekspresji bcl-2 pozwala na różnicowanie normalnych reaktywnych limfocytów B (słaba ekspresja) od FL (nadekspresja).

Chłoniak strefy brzeżnej śledziony z kosmkowymi limfocytami – SLVL (*splenic marginal zone lymphoma with villous lymphocytes*). Komórki nowotworowe są małe do średnich z okrągłymi jądrami, obfitą cytoplazmą z małymi wypustkami. SLVL szybko rozprzestrzenia się do szpiku kostnego i krwi obwodowej, na podstawie kryteriów morfologicznych jest zbliżony do B-CLL, a szczególnie do HCL, ale immunofenotyp jest odmienny. Charakteryzuje się normalną lub silną obecnością SmIg (czasem również CyIg w części komórek). Podobnie do HCL, SLVL może wykazywać obecność CD11c i CD24, ale zwykle jest CD25(-) i CD103(-). W większości przypadków SLVL nie wykazuje również obecności CD5, CD23 i CD10. Brak jądrowej ekspresji cykliny D1 pozwala na różnicowanie z MCL.

Pozawęzłowe chłoniaki strefy brzeżnej systemu MALT – MZL-MALT (*marginal zone lymphoma of mucosa associated lymphatic tissue*). Komórki nowotworowe wykazują ekspresję IgM, rzadziej IgA lub IgG i restrykcję łańcuchów lekkich. Wykazują również obecność antygenów związanych ze strefą brzeżną CD21 i CD35. W diagnostyce różnicowej z innymi chłoniakami z komórek B istotny jest brak charakterystycznych dla nich markerów: brak CD5 i cykliny D1 jest użyteczny w diagnostyce różnicowej z MCL, brak CD10 w diagnostyce różnicowej z FL.

Chłoniak Burkitta. Komórki tego chłoniaka są średniej wielkości do dużych, z okrągłym jądrem i zasadochłoną cytoplazmą z charakterystycznymi wodniczkami. W analizie immunofenotypowej stwierdza się SmIgM, silną ekspresję CD10 i brak TdT. Ocena immunofenotypowa może być uzupełniona stwierdzeniem wewnątrzkomórkowej nadekspresji c-myc. W badaniu cytogenetycznym charakterystyczną translokacją jest t(8;14) lub rzadziej t(2;8) czy t(8;22), które przenoszą c-myc na chromosomie 8 do jednego z genów immunoglobulinowych.

Rozlany chłoniak z dużych limfocytów B – DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*). Jest to rozrost z dużych limfocytów B, których jądra są wielkością zbliżone do jąder makrofagów i dwukrotnie przekraczają wielkość jąder normalnych limfocytów. Komórki nowotworowe wykazują ekspresję markerów limfocytów B CD19, CD20, CD22, CD79a, ale mogą tracić jeden lub więcej spośród nich. Powierzchniową lub cytoplazmatyczną ekspresję immunoglobulin stwierdza się w 50–75% przypadków. Immunoglobuliny cytoplazmatyczne stwierdza się w przypadkach o różnicowaniu plazmocytań. Anaplastyczne chłoniaki z dużych limfocytów B w większości wykazują obecność CD30. 10% przypadków wykazuje obecność CD5, 25–50% CD10. Przypadki CD5+ nie wykazują ekspresji cykliny D1, co odróżnia je od wariantu blastycznego MCL. W większości przypadków występują markery różnicowania plazmocytań (np. CD138). Aktywność proliferacyjna mierzona ekspresją Ki-67 jest wysoka (>40%).

Chłoniak z dużych komórek B śródpiersia (*mediastinal large B-cell lymphoma*). Jest to podtyp DLBCL wywodzący się z grasiczych kom. B. Komórki

nowotworowe wykazują obecność CD19 i CD20. Immunoglobuliny i antygeny HLA są często nieobecne. CD5 i CD10 również nie występują. CD30 występuje często, ale ekspresja jest słaba. Ekspresja CD45 jest pełna, w odróżnieniu od klasycznego chłoniaka Burkitta, który jest typowo CD45(-).

Pierwotny chłoniak wysiękowy – PEL (*primary effusion lymphoma*). Jest nowotworem z dużych limfocytów B przebiegającym z wysiękiem surowiczym bez wykrywalnej masy guza. Jest związany z wirusami herpes. Komórki chłoniaka zwykle wykazują obecność CD45, przy braku ekspresji markerów linii B CD19, CD20, CD79a. Nie stwierdza się również cytoplazmatycznej i powierzchniowej ekspresji immunoglobulin. Wykrywalne są zwykle markery aktywacji i związane z różnicowaniem plazmocytarnym CD30, CD38, CD138.

Wewnątrznaczyniowy chłoniak z dużych komórek B (*intravascular large B-cell lymphoma*). Jest rzadkim podtypem pozawęzłowego DLBCL, charakteryzującym się obecnością komórek chłoniakowych tylko w świetle drobnych naczyń, szczególnie kapilarnych.

Komórki nowotworowe wykazują obecność antygenów różnicowania limfocytów B (CD19, CD20, CD22, CD79a). W części przypadków są CD5(+). Chłoniak ten rzadko wykazuje fenotyp komórek T.

OCENA CYTOMETRYCZNA CHŁONIAKÓW Z KOMÓREK T I Z KOMÓREK NK

Cytometria przepływową stanowi bardzo pomocne narzędzie w ocenie rozrostów z komórek limfoidalnych, w tym chłoniaków wywodzących się z linii komórek T. Niejednokrotnie wyłącznie na podstawie unikalnego składu antygenów różnicowania można postawić prawidłowe rozpoznanie chłoniaka. Trzeba jednak zaznaczyć, że chłoniaki T komórkowe mają mniej charakterystyczny rozkład antygenów różnicowania w porównaniu z rozrostami linii B-komórkowej. Do zalet badania cytometrycznego, oprócz wspomnianych już wcześniej, należy zaliczyć możliwość oceny aktualnie od czterech do ośmiu markerów na jednej komórce, wysoką czułość. Ponadto badania cytometryczne w porównaniu z badaniami morfologicznymi dają możliwość łatwiejszej obiektywizacji składowych oceny, co powoduje, że postawienie diagnozy opiera się na bardziej porównywalnych kryteriach. Nie znaczy to jednak, że badanie cytometryczne może wyeliminować badania morfologiczne. Ponieważ daje często możliwość postawienia rozpoznania, jest raczej cennym uzupełnieniem badania morfologicznego.

Cytometria przepływową stwarza także niedogodności, zwłaszcza w przypadku nowotworowych rozrostów z komórek T. Trudność ta wynika przede wszystkim z faktu braku czułego i łatwego w użyciu markera do oceny monoklonalności, co powoduje, że patologiczny immunofenotyp można rozpoznać tylko w 50–70% badanych przypadków. Wśród innych ograniczeń należy wymienić: brak możliwości oceny z materiału archiwalnego, konieczność użycia do oceny jedynie żywych komórek. Ponadto należy tu brak korelacji między fenotypem a obrazem morfolo-

gicznym, wysokie nieswoiste tło barwień cytoplazmatycznych i jądrowych w porównaniu z oznaczeniami antygenów powierzchniowych, łatwa możliwość uszkodzenia, a nawet rozpadu dużych komórek. Wszystko to powoduje ograniczenie stosowania cytometrii przepływowej do diagnostyki chłoniaków wielkokomórkowych i anaplastycznych. Niemniej warto podkreślić, że przy porównaniu badań immunohistochemicznych i cytometrycznych w dobrych ośrodkach zgodność oceny immunofenotypu sięga ponad 95%. Wskazuje to, że w ocenie immunofenotypowej można się oprzeć jedynie na jednym typie postępowania, np. badaniu cytometrycznym. Uzupełnienie tego badania o rutynową ocenę cytologiczną umożliwia szybkie postawienie prawidłowego rozpoznania bez konieczności pobierania całego węzła chłonnego. W doświadczonych ośrodkach taka strategia zaczyna dominować i daje możliwość poprawnego rozpoznania chłoniaków w przeważającej części przypadków. Jednocześnie, co jest szczególnie istotne dla chorego, jest to postępowanie minimalnie inwazyjne. Należy jednak zwrócić uwagę, że istnieją historyczne kontrowersje co do możliwości poprawnego rozpoznawania chłoniaków, jedynie przy użyciu materiału cytologicznego bez pobierania całego węzła chłonnego, co uniemożliwia pełną ocenę histologiczną jego struktury i obrazu immunomorfologicznego.

Materiał do badań diagnostycznych rozrostów T komórkowych, podobnie jak w przypadku wszystkich chłoniaków, mogą stanowić wszystkie substraty biologiczne wymienione wcześniej, a ponadto komórki izolowane z biopsji skóry. Pomimo trudności w izolacji tych komórek okazało się, że i w tych przypadkach cytometria może być skuteczną metodą w ustaleniu rozpoznania chłoniaków skórnych.

Markery charakterystyczne dla linii T komórkowej

Charakterystyczną cechą rozrostów tej linii jest obecność antygeny CD3. Antygen ten nie jest jednak obecny na wszystkich etapach różnicowania komórki T. Komórki niedojrzałe (*immature T-cells*) wykazują ekspresję cytoplazmatyczną (CyCD3), natomiast komórki dojrzałe – ekspresję powierzchniową w błonie komórkowej, gdzie antygen CD3 jest powiązany z receptorem TCR tworząc charakterystyczny dla dojrzałych komórek T kompleks CD3-TCR. Typowymi markerami obecnymi na wszystkich etapach różnicowania komórek linii T są antygeny CD2 i CD7.

Cechy immunofenotypowe nowotworowych rozrostów z progenitorowych niedojrzałych komórek linii T

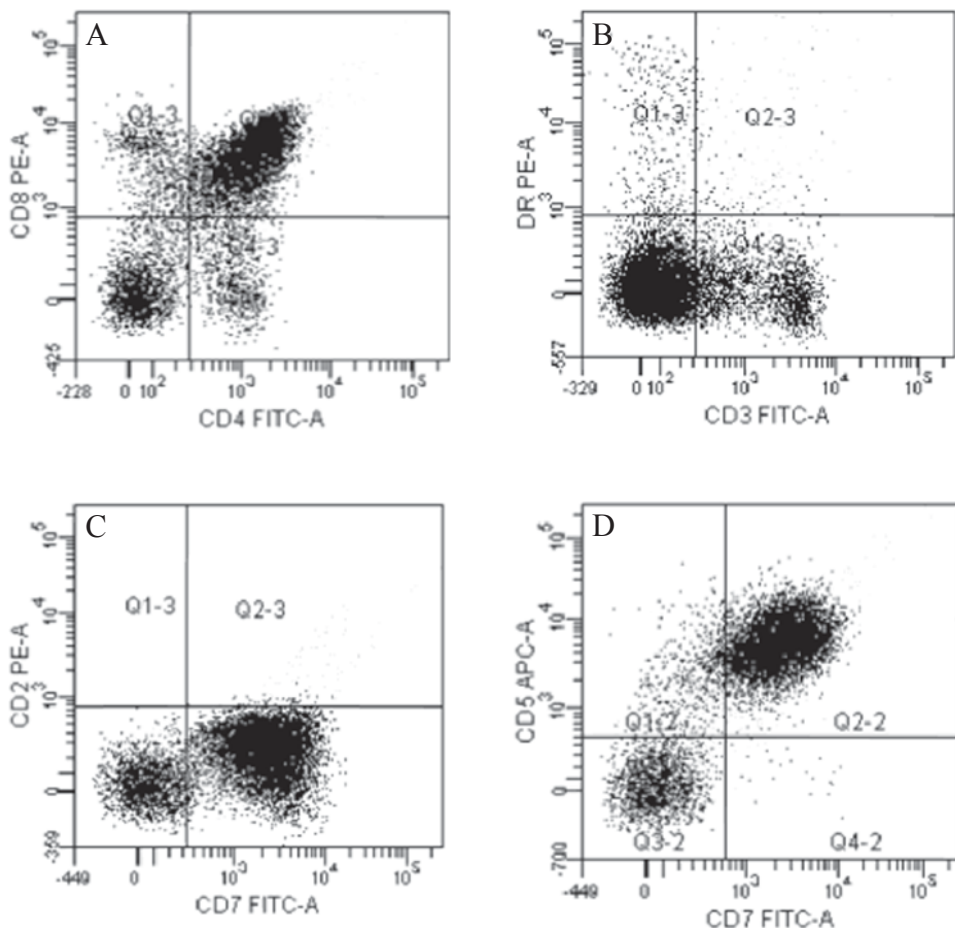
Rozrosty te mają jądrową ekspresję terminalnej transferazy nukleotydów (TdT). Obecność tego enzymu jest charakterystyczna dla nowotworów z niedojrzałych, prekursorowych komórek limfoidalnych linii zarówno B, jak i T komórkowej. W niewielkim stopniu dotyczy to także linii mieloidalnej. Rozrosty te mają zazwyczaj również ekspresję antygeny CD34. Wśród innych markerów w rozrostach z linii T komórkowej spotykany jest antygen CD117. Najczęściej jego obecność dotyczy blastów ostrej białaczki linii mieloidalnej, niemniej stwierdzana jest także w rozrostach z prekursorowych komórek linii T, a także z komórek NK. Warto także zwrócić uwagę na możliwość jednoczesnego oznaczenia ekspresji TdT i ploidii DNA, co

może bardzo ułatwić postawienie diagnozy i następnie na podstawie tych parametrów monitorowanie choroby resztkowej. Spośród innych markerów wart wymienienia jest antygen CD90. Jego obecność spotykana jest w rozrostach z linii prekursorowych komórek T i B, natomiast nie jest stwierdzana w tymocytach.

W różnicowaniu przydaje się także antygen CD133, którego ekspresję spotyka się jedynie w obrębie komórek prekursorowych CD34 dodatnich linii mieloidalnej.

Cechy immunofenotypowe rozrostów nowotworowych z dojrzałych komórek T

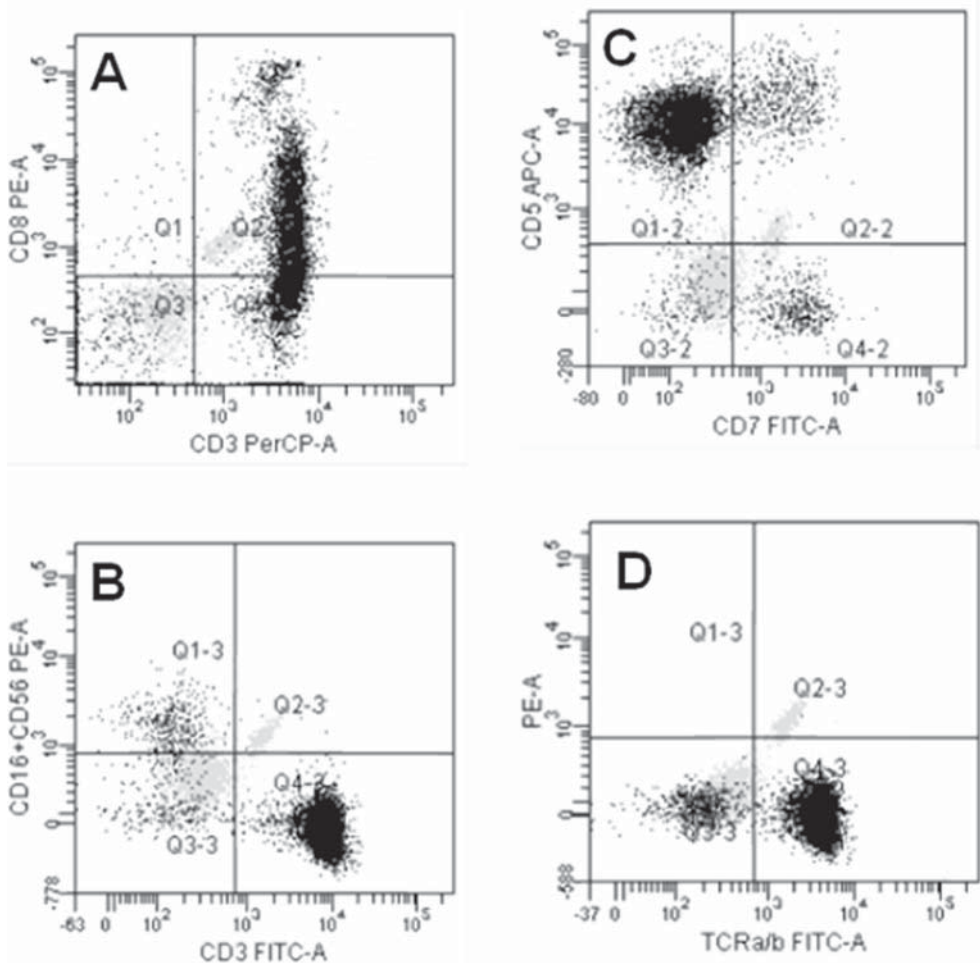
Rozrosty z dojrzałych komórek T, po zakończeniu różnicowania w grasicy, mają powierzchniową ekspresję łańcuchów TCR α/β lub TCR γ/δ w postaci kompleksu z antygenem CD3. Ekspresja łańcuchów TCR γ/δ ze względu na wieloparametry-



RYCINA 4. Prolimfocytowa białaczka T komórkowa (*T-cell prolymphocytic leukemia*) – bramka FSC/SCC. Populacja niedojrzałych komórek T o podwójnie pozytywnym fenotypie – CD4(+)/CD8(+)- A, przy braku ekspresji antygeny CD3(-) – C. Ponadto obecna ekspresja antygenów CD7(+)- B, D i CD5(+)- D, przy braku CD2(-)- B

czność oceny jest zdecydowanie łatwiejsza do wykrycia w cytometrii przepływowej niż przy pomocy innych metod. Rozrosty z tych komórek najczęściej spotykane są w rozplach typu T-LGL (ang. *large granular cell leukaemia*) dużych ziarnistych limfocytów. Spotykane są także pierwotne rozrosty w skórze, wątrobie, a także postaci blastyczne chłoniaków z komórek TCR γ/δ . Dalsze różnicowanie opiera się najczęściej na analizie ekspresji antygenów CD4 i CD8, a także analizie jakościowej i ilościowej ekspresji pozostałych podstawowych markerów linii T, takich jak: CD2, CD5, CD7, CD57. Analiza ziarnistości cytotoksycznych powinna dotyczyć rozrostów CD8 dodatnich.

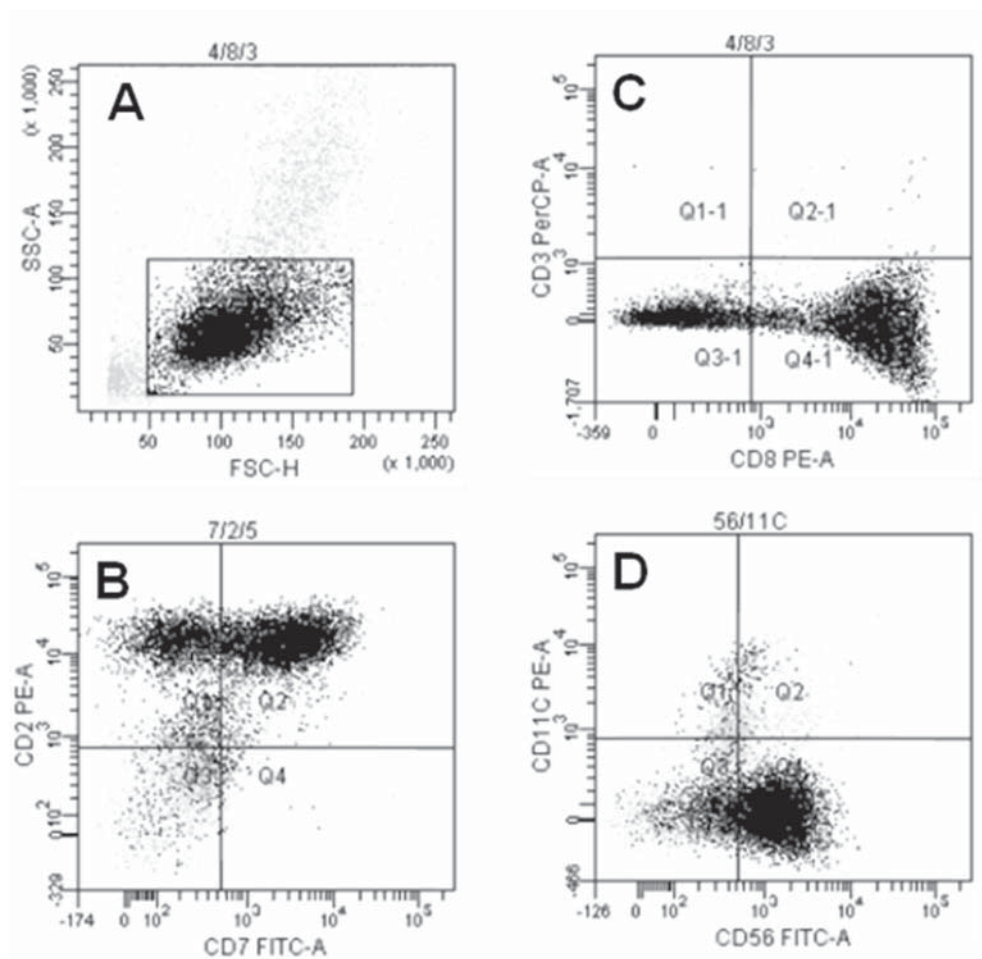
Charakterystycznymi cechami chłoniaków T komórkowych są: utrata jednego lub więcej antygenów różnicowania, najczęściej z grupy CD2, CD3, CD5 i/lub CD7. Często spotykane są także różnice intensywności ekspresji wspomnianych markerów.



RYCINA 5. T-LGL leukaemia – bramka FSC/SCC. Obecna populacja dojrzałych limfocytów T CD3(+)/CD8(+) – A, co potwierdza powierzchniowa ekspresja receptora dla antygeny TCR – D. Brak ekspresji antygeny CD56(-) – B wyłącza z różnicowania rozplach z komórek NK. Rozrost komórek T potwierdza ekspresja CD5 – C

Chłoniaki z komórek T najczęściej ujawniają wyraźne przesunięcie stosunku CD4/CD8, mogą być także podwójnie negatywne CD4(-)CD8(-) bądź podwójnie pozytywne CD4(+)CD8(+) – cecha charakterystyczna białaczki T prolimfocytowej. Odczynowe rozrosty z komórek T mogą przebiegać ze wzrostem stosunku CD4/CD8 czasami nawet ponad 10:1 Tak wysoki wzrost, o czym trzeba pamiętać, może być związany z rozplemem odczynowym w przebiegu chłoniaka Hodgkina i jest najczęściej obserwowany w postaci grudkowej i klasycznej tej choroby, rzadziej w chłoniakach B komórkowych. Ekspresja antygenu CD10 występuje niekiedy w chłoniaku angioimmunoblastycznym, niemniej nie jest to cecha swoista.

W wątpliwych przypadkach rozstrzygające jest potwierdzenie monoklonalnego charakteru rozrostu.



RYCINA 6. Białaczka/chłoniak z komórek NK (*NK cell leukemia/lymphoma*) – bramka FSC/SSC. Obecna populacja stosunkowo dużych o nieco podwyższonej ziarnistości komórek – A z ekspresją antygenu CD56(+) – D i braku ekspresji antygenu CD3(-) przy obecności antygenu CD8 – C, co wskazuje na różnicowanie z komórek NK. Ponadto obecna ekspresja antygenów CD2(+) i CD7(+)- B

Tak jak w odniesieniu do rozrostów z komórek B potwierdzeniem monoklonalności rozplemu jest stwierdzenie restrykcji łańcuchów lekkich immunoglobulin powierzchniowych IgM, tak w odniesieniu do komórek T określenie monoklonalnego charakteru stało się dostępne dzięki analizie ekspresji rodzin łańcucha TCR $V\beta$. Łańcuch ten występuje w ok. 30 rodzinach i przyjmuje się, że w warunkach rozplemu odczynowego odsetek komórek należących do pojedynczej rodziny mieści się w granicach 0,5–15% ogółu limfocytów T i zasadniczo nie przekracza tych granic. Standard tej oceny jest obecnie rozwijany. Ocena monoklonalności limfocytów T poprzez oznaczanie łańcucha $V\beta$ nie jest możliwa w odniesieniu do postaci z niższych etapów różnicowania, kiedy nie dochodzi do powierzchniowej bądź cytoplazmatycznej ekspresji łańcuchów receptora dla antygeny TCR. Cennym uzupełnieniem badania cytometrycznego może być w takich przypadkach ocena monoklonalności rozrostu z komórek T oparta na analizie rearanżacji łańcucha TCR $V\gamma$ i/lub TCR $V\beta$ technikami biologii molekularnej. Standard tych oznaczeń został określony w europejskim programie Biomed-2. Ocena molekularna ze względu na niższe koszty, stanowi aktualnie podstawowe badanie w ocenie monoklonalności rozplemów T komórkowych. Warto tutaj zaznaczyć, że cytometria przepływowa daje jednak możliwość analizy wybranej poprzez bramkowanie wydzielonej populacji, co może ułatwić i zwiększyć czułość badania, zwłaszcza w odniesieniu do oceny choroby resztkowej po leczeniu.

CECHY IMMUNOFENOTYPOWE SPOTYKANE W NOWOTWOROWYCH ROZROSTACH Z KOMÓREK NK

Immunofenotypową „definicję” komórek NK określa w populacji limfocytów ekspresja antygenów CD56 i CD16, przy braku ekspresji kompleksu TCR-CD3. Subpopulacje komórek NK mogą mieć także ekspresję antygenów CD57 i CD8. Charakterystyczna jest także ekspresja typowych dla linii komórek T antygenów CD2 i CD7. Niemniej, monoklonalność rozplemu tych komórek jest bardzo trudna do potwierdzenia jedynie na podstawie kryteriów fenotypowych. Jako pomocne w różnicowaniu rozrostów z komórek NK można wymienić receptory KIR (ang. *killer inhibitory receptors*), a także białka o funkcjach cytotoksycznych, takie jak granzymy i perforyna. Są to jednak markery o tyle mniej wygodne, że wymagają w celu oceny wykonania procedury permeabilizacji komórek.

CECHY IMMUNOFENOTYPOWE ROZROSTÓW Z KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH

Są to bardzo rzadkie rozrosty wśród nowotworów wywodzących się z układu krwiotwórczego. Najczęściej nie są diagnozowane metodami cytometrii przepływowej, ponieważ komórki te łatwo ulegają uszkodzeniu podczas prób izolacji i w trakcie etapów

wirowania. Opisano jednak nowotworowy rozplem komórek o immunofenotypie CD4(+)CD56(+)CD68(+)BDCA2(+)CD123(+)HLADR(+), przy równoczesnym braku liniowych antygenów komórek B i innych antygenów linii T, co przy powyższym fenotypie wskazuje na rozplem z komórek prezentujących antygen. Komórki te w prezentacji FSC/SCC najczęściej lokalizują się w obszarze typowym dla monocytów. Podejrzenia rozrostów z komórek dendrytycznych można powziąć w przypadku obecności populacji komórek liniowo negatywnych [CD20(-), CD7(-), CD56(-) CD14(-), CD16(-)] z silną ekspresją antygenów zgodności tkankowej klasy II HLA DR(+).

NAJCZĘŚCIEJ SPOTYKANE ROZROSTY NOWOTWOROWE Z KOMÓREK T I NK W DIAGNOSTYCE CYTOMETRYCZNEJ

Prolimfocytowa białaczka T-komórkowa (*T-cell prolymphocytic leukemia*). Jest agresywnym typem rozrostu przebiegającym z hepatosplenomegalią, uogólnionym powiększeniem węzłów chłonnych i z wysoką leukocytozą. Najczęstszy immunofenotyp ujawnia obecność populacji podwójnie pozytywnej CD4(+)CD8(+) z wyraźną ekspresją antygeny CD7, przy słabej bądź braku ekspresji antygeny CD25. Obecny jest antygen komórek T CD3(+). Warto zaznaczyć, że niewielka (nawet do ok. 10% wśród limfocytów) populacja komórek podwójnie dodatnich CD4(+)CD8(+) bywa także spotykana u zdrowych osób bez jakichkolwiek stwierdzanych zaburzeń. Przykład przedstawiono na rycinie 4.

Białaczka/Chłoniak z dojrzałych komórek T – ATLL (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*). Rozrost ten jest najczęściej związany z endemicznym występowaniem zakażenia wirusem HTLV-1 i dotyczy głównie obszarów Japonii i Karaibów. W typowych przypadkach komórki mają ekspresję antygenów CD3(+)/CD4(+)/CD8(-) przy silnej ekspresji antygeny CD25(++).

Zespół Sezary'ego. Jest uogólnioną postacią ziarniniaka grzybiastego – postaci chłoniaka skórniego. Komórki mają ekspresję antygenów CD3(+),CD4(+), przy braku antygenów CD8(-) i CD25(-). Za charakterystyczną cechą zespołu Sezary'ego uważa się brak ekspresji antygeny CD26(-); często spotyka się także dominację klonu z brakiem ekspresji antygeny CD7(-), nie jest to jednak cecha swoista i nie może stanowić podstawy do rozpoznania. W przypadku podejrzenia zespołu Sezary'ego warto osobno zabezpieczyć (zamrozić) „pellet” leukocytów dla badań molekularnych oceny monoklonalności, ponieważ przy obecnej niewielkiej populacji nowotworowych komórek T, dopiero skojarzone badanie może dać podstawę do rozpoznania.

Rozrosty z dużych ziarnistych limfocytów – T-LGL (ang. *large granular lymphocytic leukaemia*). Rozrosty te związane są z monoklonalnym rozplemem komórek T i NK. Pod względem morfologicznym są to duże ziarniste limfocyty, co w obrazie „morfologii” badania cytometrycznego ujawnia populację nieco większych i bardziej ziarnistych komórek leżących pomiędzy limfocytami i monocytami. Najczęściej charakteryzują się stosunkowo łagodnym przebiegiem, chociaż rozrosty z komórek NK częściej mają agresywny przebieg. Towarzyszy im najczęs-

kiej obraz cytopenii i współistnienie chorób autoimmunizacyjnych. Ocena monoklonalności w przypadku rozrostów z komórek NK jest trudna, można ją jednak oprzeć na analizie ekspresji receptorów KIR (patrz poprzedni podrozdział). Pod względem immunofenotypowym są to najczęściej komórki CD3(+),CD8(+) i/lub rzadziej CD16(+),CD56(+),CD57(+), czyli nie jest to immunofenotyp, który wyczerpuje znamiona nowotworowego rozplemu. W większości przypadków, różnicowanie w przypadku rozplemów nowotworowych ułatwia stwierdzenie zaburzeń ekspresji antygenów CD2, CD5, CD94 i CD158, a także ocena monoklonalności na podstawie ekspresji TCR $V\beta$. Przykłady przedstawiono na rycinach 5 i 6.

PIŚMIENNICTWO

- [1] DROESE J, LANGERAK AW, GROENEN PJ et al., Validation of BIOMED-2 multiplex PCR tubes for detection of TCRB gene rearrangements in T-cell malignancies. *Leukemia* 2004; **18**: 1531–1538.
 - [2] GORCZYCA W, TUGULEA S, LIU Z et al. Flow cytometry in the diagnosis of mediastinal tumors with emphasis on differentiating thymocytes from precursor T-lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 529–538.
 - [3] HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H i wsp. A revised European - American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; **84**: 1361–1392.
 - [4] JAFFE E, HARRIS NL, STAIN H et al. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumors. (red.) P. Kleihues, L. Sobin. IARC Press International Agency for Research on Cancer. Lyon 2001: 352.
 - [5] JORGENSEN JL. State of the Art Symposium: flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration. *Cancer* 2005; **105**: 443–451.
 - [6] LANDGREN O, PORWIT MACDONALDA, TANI E et al. A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas. *Hematol J* 2004; **5**: 69–76.
 - [7] LUNDELL R, HARTUNG L, HILL S et al. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am J Clin Pathol* 2005; **124**: 937–946.
 - [8] MIZERA-NYCZAK E, DWORACKI G, SIKORA J i wsp. Postępy w diagnostyce patomorfologicznej chłoniaków. *Post Chir Głowy i Szyi* 2006; **5**: 63–82.
 - [9] MORETTA L, MORETTA A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 626–633.
 - [10] OSHTORY S, APISARNTHANARAX N, GILLIAM AC et al. Usefulness of flow cytometry in the diagnosis of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2007; **57**: 454–462.
 - [11] SAITO T, MATSUNO Y, TANOSAKI R et al. Gamma delta T-cell neoplasms: a clinicopathological study of 11 cases. *Ann Oncol* 2002; **13**: 1792–1798.
 - [12] SOKOLOWSKA-WOJDYLO M, WENZEL J, GAFFAL E et al. Absence of CD26 expression on skin-homing CLA⁺ CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood is a highly sensitive marker for early diagnosis and therapeutic monitoring of patients with Sezary syndrome. *Clin Exp Dermatol* 2005; **30**: 702–706.
 - [13] STACHURAJ, RUDZKI Z, GAŁĄZKA K i wsp. Diagnostyka chłoniaków. Zarys standardów diagnostycznych. *Pol J Pathol* 2006; **57**: 1–8.
 - [14] SZCZEPAŃSKI T, VAN DER VELDEN VH, VAN DONGEN JJ. Classification systems for acute and chronic leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; **16**: 561–582.
 - [15] ŻEROMSKI J, DWORACKI G, MIZERA-NYCZAK E i wsp. Doświadczenia w diagnostyce nowotworów układu krwiotwórczego przy użyciu skojarzonych metod badawczych. *Now Lek* 2001; **73**: 483–488.
- Wykorzystano również dane pochodzące ze strony: PathologyOutlines.com.

prof. dr hab. Jan Żeromski
Katedra Immunologii Klinicznej UM
Ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań
e-mail: jzeromski@ump.edu.pl