

¹Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Department of Clinical Immunology, University School of Medicine, Lublin

²Katedra i Klinika Hematologii Akademii Medycznej w Lublinie
Department of Hematology, University School of Medicine, Lublin

JACEK ROLIŃSKI¹, ZOFIA MONIKA RUPNIEWSKA²,
EWA WAŚIK-SZCZEPANEK², AGNIESZKA BOJARSKA-JUNAK¹

*Odsetek komórek CD19/CD5 dodatnich jest wyższy we krwi
obwodowej niż w szpiku u chorych w okresie 0 przewlekłej
białaczki limfatycznej B komórkowej*

The frequency of CD19/CD5 plus cells is higher in peripheral blood
than in the bone marrow of patients with B-CLL in stage 0

CEL PRACY

Stosunkowo mało uwagi poświęcono w piśmiennictwie ocenie ilościowej populacji białaczkowych komórek we krwi i w szpiku u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową (PBL-B). Nasza praca ma na celu ustalenie czy rozmieszczenie komórek białaczkowych (komórki CD19 i CD5 dodatnie) u chorych z PBL-B jest równomierne w tkankach hemopoetycznych (tj. we krwi obwodowej i w szpiku) i czy nie ulega zmianom w czasie postępu choroby.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

U 36 nieleczonych chorych z PBL-B badano fenotyp immunologiczny limfocytów krwi obwodowej i szpiku. Chorych z uwagi na okres kliniczny choroby według klasyfikacji Rai i wsp. [1] podzielono na 4 grupy:

- Do grupy I należało 14 chorych z PBL-B w okresie 0;
- Do grupy II — 5 chorych w okresie 1;
- Do grupy III — 13 chorych w okresie 2;
- Do grupy IV — 4 chorych w okresach 3 i 4, a więc w okresach w których występują już objawy niewydolności szpiku.

Dane kliniczne i hematologiczne badanych przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Dane kliniczne chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną B–komórkową (PBL–B) w okresach klinicznych 0–4 wg klasyfikacji Rai i wsp.

Okres kliniczny wg. Rai	Liczba chorych	Płeć			Wiek	Score–CMG	Krew obwodowa		
		M	K				Limfocytoza w μl	Komórki B (CD19+) %	Komórki T (CD3+) %
0	14	4	10	Zakres wartości	43–77	2,9–6,9	8.300–48.680	12,6–88,5	1,9–43,4
				Średnia	62	4,7	22.980	59,1	27,2
				Mediana	61	4,5	19.890	60,4	29,5
1	5	2	3	Zakres wartości	47–69	3,4–8,1	8.600–37.000	40,8–72,4	19,3–28,3
				Średnia	57	5,9	21.100	59,8	24,3
				Mediana	53	6,4	21.600	60,1	25,5
2	13	9	4	Zakres wartości	42–77	4,7–28,6	15.600–383.100	59,1–86,3	1,9–20,0
				Średnia	59	13,3	122.390	79,5	8,0
				Mediana	60	11,8	88.200	80,2	6,4
3–4	4	3	1	Zakres wartości	68–76	14,4–24,6	36.300–214.300	82,4 – 89,1	1,8–3,9
				Średnia	73	20,3	123.500	84,5	2,0
				Mediana	73	20,3	123.500	84,5	2,0

xScore–CMG — Score całkowitej masy guza;

Tabela II. Fenotyp immunologiczny limfocytów B we krwi obwodowej i w szpiku u chorych z PBL–B w okresach klinicznych 0–4 wg klasyfikacji Rai i wsp.

Okres kliniczny wg. Rai	Liczba chorych		Komórki CD19+/CD5+ %		Komórki CD79 β +/CD19+ %	
			Krew obwodowa	Szpic	Krew obwodowa	Szpic
0	14	Zakres wartości	28,9–80,7	0,3–74,6	0,4–61,0	3,3–50,9
		Średnia	54,5	41,8	22,6	18,0
		Mediana	53,8	48,9	18,8	18,1
		Odch. Standardowe	15,5	22,7	21,5	13,7
1	5	Zakres wartości	32,4–68,7	23,0–87,1	1,4–34,0	4,8–41,5
		Średnia	48,6	40,5	17,7	18,3
		Mediana	44,1	31,7	17,6	8,6
2	13	Zakres wartości	36,7–85,8	30,1–97,4	8,1–52,0	1,8–81,7
		Średnia	69,7	72,3	19,6	27,1
		Mediana	75,1	78,1	18,4	15,9
3–4	4	Zakres wartości	78,3–85,9	84,0–85,9	17,1 – 35,5	13,6–44,3
		Średnia	82,4	85,0	25,1	28,1
		Mediana	82,7	85,0	23,8	27,2

Score całkowitej masy guza (*score* CMG) obliczano wg. kryteriów Jakšić i Vitale [2]. Wartości *score* równe lub wyższe od 9 są czynnikiem niepomyślnym prognostycznie.

Przeciwciała i metoda

Fenotyp immunologiczny limfocytów krwi obwodowej i szpiku oznaczono stosując następujące monoklonalne przeciwciała:

- Anty-CD19 znakowane izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) (izotyp IgG1; f-ma Ortho Diagnostic Systems);
- Anty-CD19 znakowane fykoerytryną (PE) (izotyp IgG1; klon 4G7; f-ma Becton-Dickinson);
- Anty-CD3PE (izotyp IgG2a; f-ma Ortho Diagnostic Systems);
- Anty-CD19/CD5 FITC/PE (izotyp IgG1/IgG2; klon J4.119/BL1a; f-ma Ortho Diagnostic Systems);
- Anty-CD79 β FITC (izotyp IgG1; klon SN8; f-ma DAKO).

Komórki jednojądrzaste z heparynizowanych próbek krwi żyłnej i szpiku badano wg. metody podanej w naszych wcześniejszych pracach [2a]. Analizę subpopulacji limfocytów przeprowadzono w dwubarwnym cytometrze przepływowym Cytron Absolute (Ortho Diagnostic Systems) wprowadzając ok. 10.000 komórek do każdej próbki. Wyniki odczytywano stosując program komputerowy Immunocount II.

Populację komórkową uważaliśmy za dodatnią dla danego markeru (CD5 lub CD79 β) jeśli więcej niż 30% komórek nosiło tą cząsteczkę.

WYNIKI

W tabeli II przedstawiono fenotyp immunologiczny limfocytów B we krwi obwodowej i w szpiku w poszczególnych grupach badanych.

1. Odsetki komórek CD19/CD5 dodatnich

- A. W grupie chorych w okresie 0 PBL-B odsetek komórek CD19/CD5 był we krwi obwodowej istotnie wyższy niż w szpiku. Różnica była statystycznie istotna ($p < 0,03$), przy czym wzrost odsetka komórek CD19/CD5 we krwi obwodowej, korelował ze wzrostem tych odsetków w szpiku (współczynnik korelacji Spearmana $R = 0,591$).
- B. Grupa chorych w okresie 1 PBL-B klinicznie i hematologicznie była dość podobna do chorych w okresie 0 PBL-B, chociaż *score* CMG było nieco wyższe (patrz tab. I). U 4 z pięciu badanych w tej grupie odsetek komórek CD19/CD5 był wyższy we krwi obwodowej niż w szpiku średnio o 21,7%. Jednakże w całej grupie różnica między odsetkami komórek CD19/CD5 we krwi i w szpiku nie były statystycznie istotne ($p < 0,5$).
- C. W okresie klinicznym 2 PBL-B było 13 chorych. U 5 z nich odsetek komórek CD19/CD5 był wyższy we krwi obwodowej w porównaniu ze szpikiem średnio o 20,2% komórek (a więc podobnie jak u chorych w okresie 1), ale różnice w całej grupie nie były statystycznie istotne ($p < 0,64$).

D. W grupie chorych w okresie niewydolności szpiku (okres 3 i 4 wg. Rai i wsp.) różnice między odsetkami komórek CD19/CD5 we krwi i w szpiku nie były statystycznie istotne ($p < 0,1$).

2. Odsetki komórek CD79 β /CD19 dodatnich

We wszystkich czterech grupach chorych średni odsetek i mediana odsetka komórek CD79 β /CD19 nie przekraczała 30%. Jednakże we krwi obwodowej u 7 chorych, a w szpiku u 8 chorych odsetek komórek CD79 β /CD19 był wyższy od 30%, i w jednym przypadku w szpiku wynosił 81,7%. W 4 przypadkach podwyższonemu poziomowi komórek CD79 β /CD19 w szpiku nie towarzyszył podwyższony poziom tych komórek we krwi obwodowej. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między odsetkami komórek CD79 β /CD19 dodatnich we krwi i w szpiku.

OMÓWIENIE

Z analizy tabeli II, w której przedstawiono fenotyp immunologiczny limfocytów krwi obwodowej i szpiku u 36 nieleczonych chorych z PBL-B w okresach klinicznych 0-4 wg. klasyfikacji Rai i wsp. wynika, że u większości chorych w okresie 0 PBL-B (u 10 na 14 badanych) i w okresie 1 PBL-B (u 4 na 5 badanych), a także u 38% chorych (u 5 na 13 badanych) w okresie 2 PBL-B odsetek komórek CD19/CD5 dodatnich we krwi obwodowej jest wyższy niż w szpiku. U chorych w okresie 0 PBL-B różnice w odsetkach komórek CD19/CD5 między krwią, a szpikiem są statystycznie istotne ($p < 0,03$). Wyniki te wskazują na nierównomierne rozmieszczenie komórek białaczkowych w tkankach hemopoetycznych i na przewagę tych komórek we krwi obwodowej u chorych we wczesnych okresach klinicznych.

Niedawne badania sekwencji genów kodujących część zmienną łańcuchów ciężkich immunoglobulin (V_H Ig) wykazały, że w ponad połowie przypadków PBL-B występują mutacje somatyczne tych genów. Mutacje genów V_H Ig wskazują na wcześniejszy kontakt komórki B z antygenem, który ma miejsce w ośrodku rozmnażania grudki chłonnej [3]. Można więc przypadki PBL-B podzielić na dwie grupy [3, 4].

- Do grupy pierwszej będą należały przypadki PBL-B, w których występuje ekspansja „naiwnych” lub „dziewiczych” komórek B CD5 dodatnich. Komórki te nie miały kontaktu z antygenem (*antigen-inexperienced*) a ich geny kodujące V_H Ig są niezmutowane. W przypadkach tych często występuje złe rokująca trisomia chromosomu 12 [5].
- Do grupy drugiej zaliczane są przypadki w których białaczkowe komórki wykazują mutacje genów kodujących V_H Ig, a więc są to komórki które przeszły przez ośrodek rozmnażania i są komórkami pamięci. Część z tych przypadków PBL-B może pochodzić z małej subpopulacji komórek IgM, IgD dodatnich znajdujących się we krwi obwodowej [6]. Wydaje się, że populacja komórek pamięci może przemieszczać się do szpiku. Te imigrujące komórki B chociaż spontanicznie nie wytwarzają Ig, to jednak *in vitro* mogą zostać do tego pobudzone [7].

W naszym pilotowym doniesieniu [8] sugerowaliśmy, że w niektórych przypadkach PBL-B proliferacja może wychodzić z miejsc pozaszpikowych i szpik zostaje

zajęty później niż krew obwodowa. Sugestia ta opierała się na badaniach 3 chorych z PBL-B w okresie klinicznym 0 i u jednego pacjenta — w okresie 4, u których odsetek komórek B CD5 dodatnich był trzykrotnie wyższy we krwi obwodowej niż w szpiku. Obecne badania przeprowadzone na znacznie większej grupie chorych potwierdzają te wcześniejsze obserwacje. Liso i wsp. [9] u 6 chorych z PBL-B wykryli wyższy odsetek komórek białaczkowych B CD5 i CD23 dodatnich w węzłach chłonnych niż we krwi obwodowej i w szpiku. Również odsetek komórek z trisomią chromosomu 12 był wyższy w węzłach chłonnych niż we krwi obwodowej i w szpiku. Nie można więc wykluczyć, że część przypadków PBL-B wychodzi z pozaszpikowych komórek B. Gromadzenie się białaczkowych komórek w szpiku w późniejszych okresach choroby może wynikać albo z ich tropizmu do środowiska szpikowego, albo z ich proliferacji w tym środowisku.

Za przypadki CD79 β ujemne przyjęliśmy, podobnie jak grupa Catovsky'ego [10] te przypadki PBL-B, w których ekspresja CD79 β występowała na mniejszym od 30% odsetku komórek. Jednakże w przeciwieństwie do grupy Catovsky'ego, która uważa że CD79 β nie występuje u 95% chorych z PBL-B, w naszych badaniach brak ekspresji CD79 β na białaczkowych komórkach we krwi obwodowej stwierdziliśmy u 84% chorych, a w szpiku u 72% chorych. Wydaje się, że u chorych z PBL-B ekspresja CD79 β występuje nieco częściej niż to podaje zespół Catovsky'ego.

PIŚMIENNICTWO

1. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Paternack B.S.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975, 46, 219–234
- 2a. Roliński J., Rupniewska Z.M., Wąsik-Szczepanek E.: Ekspresja cząsteczki CD5 na komórkach B i T we krwi pępowinowej, we krwi dorosłych osób zdrowych i chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną B-komórkową. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1999, 101: 307–314.
2. Jakšić B., Vitale B.: Total tumour mass score (TTM) a new parameter in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 1981, 49: 405–413.
3. Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghioto F., Valetto A., Allen S.L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S.M., Schulman P., Vinciguerra V.P., Rai K.R., Ferrarini M., Chiorazzi N.: IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999, 94, 1840–1847.
4. Chiorazzi N.: Ig V genes in B-CLL — the state of the art VIII International Workshop on CLL; 29–31 October 1999, Paris: str. 20 (Abstract, s. 11).
5. Oscier D.G., Thompsett A., Zhu D., Stevenson F.K.: Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood*, 1997, 89, 4153–4160.
6. Klein U., Rajewsky K., Kuppers R.: Human immunoglobulin M⁺ IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.*, 1998, 188, 1679–1689.
7. Paramithiotis E., Cooper M.D.: Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1997, 94, 208–212.
8. Rupniewska Z.M., Roliński J., Wąsik-Szczepanek E.: Investigation of primary loci involved in neoplastic transformation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol. Pol.*, 1998, 29 (suppl. 1): 40–44.

9. *Liso V, Capalbo S., Lapietra A., Pavone V, Guarini A., Specchia H.G.*: Trisomy 12 is expressed more in lymph nodes in bone marrow and in peripheral blood cells of patients with B-CLL. VIII International Workshop on CLL; 29–31 October 1999, Paris: str 43 (Abstract, PD 57).
10. *Zomas A. P., Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K., Seon B.K., Catovsky D.*: Expression of the immunoglobulin-associated protein B 29 in B cell disorders with the monoclonal antibody SN8 (CD79 β). *Leukemia* 1996, 10, 1966–1970.

SUMMARY

Fourteen untreated patients with B cell–chronic lymphocytic leukaemia in stage Rai 0 and twenty two patients in stage Rai 1–4 were evaluated for population of leukaemic cells (CD19/CD5 positive cells and CD79 β /CD19 negative cells) from the peripheral blood and the bone marrow. B-CLL patients in stage Rai 0 demonstrated higher percentage of CD19/CD5 positive cells in peripheral blood than in the bone marrow (average frequency of CD19/CD5 positive cells in peripheral blood 54.5%, in bone marrow 41.8%). This difference was significant ($p < 0.03$). Instead, these differences have not been observed in the majority of patients in more advanced stages of B-CLL. Foregoing results show that bone marrow becomes occupied later than peripheral blood by CD5 positive B cells, but this detection is possible only in stage 0 of B-CLL. Our results demonstrated that bone marrow is occupied later than peripheral blood by CD5 positive B cells, but this detection is possible only in stage 0 of B-CLL.

Contrary to investigations of Catovsky's team (*Leukemia* 1996, 10: 1966–7), who did not detect expression CD79 β at 95% patients with B-CLL in peripheral blood, we observed such lack of expression in 84% of patients on peripheral blood cells and in 72% of patients on bone marrow cells.