

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

MAGDALENA KOKTYSZ, ANNA DMOSZYŃSKA

*Fenotypy ostrych białaczek*

---

Immunophenotype of acute leukemias

WSTĘP

Postęp jaki dokonał się w ciągu ostatnich 20 lat w technice cytometrii przepływowej oraz dostępność coraz nowych przeciwciał monoklonalnych spowodował, że ocena immunofenotypu stała się jedną z podstawowych metod w diagnostyce hematologicznej, szczególnie w przypadku ostrych białaczek. Swoją wysoką pozycję w diagnostyce, monitorowaniu terapii i ocenie choroby resztkowej (*minimal residual disease*) ostrych białaczek cytometria przepływowa zawdzięcza takim cechom jak: określenie przynależności liniowej i stopnia dojrzałości komórki nowotworowej (CD — *clusters of differentiation*), różnicowanie klonu komórek nowotworowych od ich prawidłowych odpowiedników występujących w hematopoezie (w powiązaniu z badaniami cytogenetycznymi), określenie heterogenności i tzw. „aberracji immunologicznych” komórek nowotworowych oraz ilościowa ocena prawidłowych i patologicznych komórek występujących w hematopoezie [27].

Z uwagi na skomplikowaną technikę badania cytometrycznego, dostępność dużej liczby przeciwciał monoklonalnych oraz heterogenność immunologiczną w grupie ostrych białaczek, koniecznym stało się wprowadzenie jednolitej klasyfikacji immunologicznej opartej na standardowych schematach diagnostycznych umożliwiających pełną powtarzalność badań immunofenotypu w różnych laboratoriach. Z inicjatywy grupy naukowców tworzących organizacje o nazwach: *Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis* oraz *European Group for the Immunological Characterization of Leukemia* (EGIL) ustalono jednolity protokół dotyczący technicznych i merytorycznych aspektów oceny immunofenotypu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego w tym w szczególności ostrych białaczek [2, 27].

## PODSTAWOWE ANTYGENY W OCENIE FENOTYPU OSTRYCH BIAŁACZEK I INNYCH CHORÓB ROZROSTOWYCH UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Zasadą cytometrii jest ocena jednego lub kilku antygenów powierzchniowych (s) lub cytoplazmatycznych (cy) komórki znajdującej się w zawiesinie. Antygeny powierzchniowe i cytoplazmatyczne mogą być różnicowane na podstawie porównania fluorescencji przed i po „permeabilizacji” [27]. Patologiczna subpopulacja komórek może być zidentyfikowana przy pomocy kombinacji następujących cech: klonalnego charakteru populacji komórek (np. selektywna ekspresja łańcucha lekkiego kappa lub lambda), jednolitej lub nieprawidłowej charakterystyki parametrów rozproszenia światła laserowego na obrazie cytogramu, heterogenności fenotypowej komórek o podobnych parametrach rozproszenia światła laserowego, znacznej przewagi ekspresji danego antygeny, często charakterystycznego dla postaci niedojrzałych oraz występowaniu tzw. aberracji fenotypów [23, 27]. Nową tendencją jest tzw. „bramka immunologiczna” (*gate*) tj. identyfikacja grupy komórek posiadających ten sam antygen, a dopiero potem ich charakterystyka pod względem wielkości i ziarnistości komórki. W następnej kolejności ocenia się przynależność liniową, stopień dojrzałości i heterogenność wybranej przy pomocy „bramki immunologicznej” grupy komórek [27].

Podstawowym problemem w ocenie immunologicznej ostrych białaczek (biorąc również pod uwagę koszty badania) jest ustalenie minimalnego, podstawowego zestawu przeciwciał do stosowania w rutynowej ich diagnostyce dla potrzeb klinicznych. Wybór tych przeciwciał musi być oparty na ich wysokim stopniu specyficzności dla jednej linii komórkowej, a jednocześnie szerokim spektrum reaktywności tych przeciwciał z różnymi grupami komórek. Z uwagi na to, że specyficzność liniowa poszczególnych markerów antygenowych nie jest absolutna, konieczne jest stosowanie 3–5 markerów dla każdej z podstawowych w hematopoezie linii komórkowych. Większość antygenów powierzchniowych nie może być uznana za liniowo specyficzne (*lineage specific*), a jedynie za obecne na komórkach danej linii (*lineage associated*), wobec czego bardzo ważne staje się badanie ekspresji antygenów cytoplazmatycznych [29].

Grupa EGIL proponuje klasyfikację ostrych białaczek metodą dwustopniową [2]: Pierwszy etap to różnicowanie między linią mieloidalną oraz limfoidalną B- lub T- (antygeny o szerokim spektrum oraz antygeny niespecyficzne liniowo), drugi etap to szczegółowa klasyfikacja w obrębie linii mieloidalnej lub limfoidalnej B lub T przy pomocy antygenów specyficznych liniowo związanych z określonym stadium dojrzałości komórki. Standardowy zestaw przeciwciał pozwala zakwalifikować „liniowo” ok. 98% przypadków ostrych białaczek. Zestawy antygenów oznaczane w dwustopniowej klasyfikacji ostrych białaczek przedstawiono w tabeli I.

Na uwagę zasługuje należący do antygenów pan-mieloidalnych CD117, określane w literaturze również jako molekula c-kit, która odgrywa rolę w dojrzewaniu komórek białaczkowych [20]. Ekspresję CD117 wykazuje ok. 68% [20], wg innych autorów ok. 74% [9] ostrych białaczek szpikowych, natomiast nie występuje on wcale w ostrych białaczkach limfoblastycznych. Opisuje się dodatnią korelację tego antygeny z eks-

Tabela I. Podstawowe antygeny w ocenie fenotypu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego

Antygeny o szerokim spectrum	
Pan-mieloidalne	MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117
Pan-B-komórkowe	cyCD79 $\alpha$ , cyCD22, CD19
Pan-T-komórkowe	cyCD3, CD7, CD2, CD5
Antygeny niespecyficzne liniowo, związane z „niedojrzałością” lub aktywacją	
TdT, CD34, HLA-DR, CDw90	
Antygeny specyficzne liniowo, związane z określonym stadium dojrzałości	
Komórki mieloidalne	CD14, CD15, CD11c, glikoforyna A, CD41, CD61, CD64, anti-lysozymy
Limfocyty B	CD10, CD20, CD23, CD24, cyIgM, sIg
Limfocyty T	CD1a, sCD3, CD4, CD8, anty-TCR $\alpha/\beta$ , anty-TCR $\gamma/\delta$
Komórki NK	CD16, CD56, CD57

presją na blastach CD34 [9, 20], a także CD45RA [9]. Korelacja dodatkowej ekspresji CD117 z typem białaczki wg FAB nie jest jednoznacznie ustalona: jedni autorzy podkreślają związek tego antygeny z określonym morfologicznie typem ostrej białaczki szpikowej [20], inni stwierdzają jedynie związek CD117 z młodszymi monoblastami (silna ekspresja w AML-M5a w przeciwieństwie do AML-M5b) [9].

Jednym z ostatnio dołączonych do tej klasyfikacji antygenów jest CDw90 będący białkiem przyłączonym do fosfatydyloinozytolu błony komórkowej, który odzwierciedla stan proliferacji komórek białaczkowych, nie zaś ich niedojrzałość. CDw90 jest obecny na komórkach macierzystych wielopotencjalnych szpiku, zaś ekspresja na blastach pre-B-ALL jest częściej związana z nieprawidłowościami kariotypu, niż z linią B-komórkową [32]. CDw90 jest również często spotykany na blastach wtórnych (nie powstałych *de novo*) ostrych białaczek szpikowych [17].

Grupa EGIL [2] przyjęła ogólną zasadę, w której uznaje się dany antygen za marker „pozytywny” jeśli występuje on na co najmniej 20% komórek blastycznych. Wyjątkiem od tej zasady są antygeny o wysokiej specyficzności tj. MPO, CD3, CD79 $\alpha$ , TdT, których odsetek już powyżej 10% na komórkach blastycznych uznawany jest za marker dodatni [19, 27]. Należy podkreślić, że klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek metodą cytometrii przepływowej umożliwia precyzyjne określenie i podział na grupy (które korelują z klasyfikacją FAB), jedynie ostrych białaczek limfoblastycznych [19], natomiast w przypadku ostrych białaczek szpikowych, z uwagi na ich dużą heterogenność, możliwe jest jednoznaczne określenie tylko 3 typów białaczek odpowiadających MLA-M0, M6 i M7 wg FAB [2, 27]. W związku z tym, w diagnostyce ostrych białaczek szpikowych podstawę stanowi nadal ocena morfologiczno-cytochemiczna [3, 29].

Tabela II. Klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek

<b>Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL):</b>	
B-komórkowa:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B-I (pro-B) ALL</li> <li>• B-II (common) ALL</li> <li>• B-III (pre-B) ALL</li> <li>• B-IV (mature -B) ALL</li> </ul>
T-komórkowa:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-I (pro-T) ALL</li> <li>• T-II (pre T) ALL</li> <li>• T-III (cortical ) ALL</li> <li>• T-IV (mature -T) ALL:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- T-<math>\alpha</math> / <math>\beta</math> ,</li> <li>- T-<math>\gamma</math> / <math>\delta</math></li> </ul> </li> </ul>
ALL z ekspresją 1 lub 2 markerów mieloidalnych (My + ALL)	
<b>Ostra białaczka szpikowa (AML):</b>	
<p>A. Mieloblastyczna, bez cech zróżnicowania (M0-AML wg FAB)</p> <p>B. Mielomonocytoa: (M1- M5 wg FAB)</p> <p>C. Erytroleukemia (M6 wg FAB : typ niedojrzały i dojrzały)</p> <p>D. Megakariocytowa (M7 wg FAB)</p> <p>E. TdT + AML</p> <p>F. AML z ekspresją 1 lub 2 markerów limfoidalnych (Ly + AML)</p>	
<b>Ostre białaczki bi-fenotypowe</b>	
<b>Ostre białaczki niezróżnicowane (CD34+, HLA-DR+, CD38+,CD7+)</b>	

W tabeli II przedstawiono obecną klasyfikację immunologiczną ostrych białaczek zaproponowaną przez EGIL [2].

### OSTRA BIAŁACZKA SZPIKOWA (AML)

Blasty w ostrej białaczce szpikowej posiadają ekspresję jednego lub dwu wymienionych w tabeli I antygenów pan-mieloidalnych. Za najbardziej specyficzny marker linii mieloidalnej uznaje się mieloperoksydazę (MPO) [2]. Nguyen i wsp. [24] stwierdzili nawet większą czułość oceny MPO metodą cytometrii niż klasycznie metodą reakcji cytochemicznych. Ekspresja MPO może być jednak nieobecna w AML typu M6 i M7 wg FAB oraz w niektórych przypadkach AML typu M5 [27]. Jak wcześniej wspomniano, jedyne białaczki mające „patognomiczny” immunofenotyp to MLA — M0, M6 i M7 wg FAB [27]. Należy pamiętać, że w literaturze opisuje się zjawisko przylegania płytek do komórek blastycznych, co daje fałszywie dodatnią ekspresję CD41 (antygeny charakterystycznego dla AML-M7) w białaczkach nie-megakariocytowych [19].

Cechą charakterystyczną dla AML-M3 jest fenotyp blastów: HLA-DR- CD34-, jednak w literaturze nie jest on uznawany za całkowicie „patognomiczny” dla białaczki promielocytowej, gdyż opisano go również w innych białaczkach np. AML-M2 [2, 19]. W wariantcie AML-M3 z obecnością drobnych ziarnistości w promielocytach,

charakterystyczna jest wysoka ekspresja CD34, co w powiązaniu z parametrami rozproszenia światła lasera pozwala odróżnić ten rodzaj białaczki z wariantem klasycznym AML–M3. Na blastach AML–M3 opisuje się również częstą koekspresję CD9, natomiast rzadko obecność CD11b [16].

Scott i wsp. [28] opisują rzadki fenotyp białaczki CD33+56+16–DR–34+/-11a+ z blastami o morfologii promielocyta. Autorzy ci sugerują, że białaczka taka mogła powstać z transformacji komórki prekursorowej dla linii mieloidalnej i limfocytów NK oraz podkreślają, że często jest ona klasyfikowana jako AML–M3 i należy wówczas do grupy białaczek opornych na retynoidy. Szczególnie ważne staje się tutaj badanie genetyczne, które wykazuje brak charakterystycznej translokacji t [15, 17].

Dużą trudność w klasyfikacji AML stanowi brak do chwili obecnej jednoznaczniego markera linii monocytoidalnej pozwalającego odróżnić białaczki z domieszką komórek tej linii [2]. Antygen CD14 nie można uznać za taki marker, gdyż znane są przypadki AML–M5 bez ekspresji CD14 [19]. Grupa EGIL rozpoczęła badania nad przeciwciałem określanym jako anty–lizozym, będącym prawdopodobnym markerem linii monocytoidalnej. Jednak obecnie nie wiadomo jeszcze na jakim etapie rozwoju komórek tej linii marker ten pojawia się [2]. Największą ekspresję lizozymu w cytoplazmie (z użyciem techniki permeabilizacji) opisano w AML–M5a. Obecnie w diagnostyce AML–M4 i AML–M5 wg FAB wykorzystuje się charakterystyczną koekspresję CD14 i CD64 występującą w obu tych typach białaczki [27].

Przy ocenie immunofenotypu AML pamiętać należy również o braku „wczesnego” markera linii erytroidalnej, gdyż glikoforynaA występuje jedynie na dojrzałych erytroblastach [2]. Należy również podkreślić, że pan–mieloidalny antygen CD13, może wystąpić jedynie w cytoplazmie komórki, bez ekspresji na jej powierzchni [27]. W przypadkach białaczek CD13 (–) i/lub CD33 (–) konieczne staje się oznaczenie CD65, ewentualnie CD15 i/lub CD11c [19]. Ekspresja antygenów CD34 lub CD7 na blastach ostrych białaczek szpikowych jest związana z niedojrzałością komórki, nie zaś jej przynależnością liniową [27].

Na uwagę zasługuje immunodiagnostyka białaczki niezróżnicowanej (*acute undifferentiated leukemia* — AUL) oraz minimalnie zróżnicowanej (*acute minimally differentiated* — AML–M0). W przypadku AUL pochodzenie „liniowe” komórek nie jest ustalone, zaś na blastach tej białaczki są obecne wyłącznie markery niespecyficzne liniowo związane z niedojrzałością lub aktywacją komórki, tj. HLA–DR, TdT, CD34, niekiedy również CD7 lub CD9. Natomiast blasty w AML–M0 mają morfologię limfoblasta typu L1 lub L2 oraz posiadają ekspresję jednego lub dwóch antygenów mieloidalnych — zazwyczaj CD13 i/lub CD33 (inne, tj. anty–MPO, CD15, CD11b są rzadziej obecne). Antygeny niespecyficzne liniowo, tj. TdT, CD34, CD7 mogą być również obecne. CD117 jako antygen „wczesny” linii mieloidalnej jest również pomocny w diagnostyce, gdyż opisywano białaczki szpikowe z wyłączną ekspresją tego markera. Bernier i wsp. zaproponowali schemat diagnostyczny różnicujący AUL i AML–M0 [3]. W tabeli III przedstawiono obecną klasyfikację immunologiczną AML [2].

Ekspresję antygenów limfoidalnych na blastach ostrych białaczek szpikowych ocenia się w literaturze na 10%–30% [13], a nawet według innych autorów na 40%–60%

Tabela III. Klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek szpikowych (AML)

<p style="text-align: center;"><b>Mieloblastyczna, bez cech zróżnicowania (M0–AML wg FAB)</b></p> <p>– anti–MPO+, CD13+, CD33+, CDw65+, i/lub CD117+, – brak reakcji cytochemicznej MPO – ujemne markery limfoidalne z wyj. CD7 i/lub TdT</p>
<p style="text-align: center;"><b>Mielomonocytowa: (M1– M5 wg FAB)</b></p> <p>– anti–MPO+, CD13+, CD33+, CDw65+, i/lub CD117+</p>
<p style="text-align: center;"><b>Erytroleukemia (M6 wg FAB)</b></p> <p>– typ niedojrzały (wczesny): niemożliwy do klasyfikacji immunologicznej – typ dojrzały: anti–glycophorinA+</p>
<p style="text-align: center;"><b>Megakariocytowa (M7 wg FAB)</b></p> <p>– CD41 i/ lub CD61 (cytoplazmatyczne–cy lub powierzchniowe–s) TdT + AML</p>
<p style="text-align: center;"><b>AML z ekspresją 1 lub 2 markerów limfoidalnych (Ly + AML)</b></p>

[4, 5, 19, 33]. Najczęstszym antygenem limfoidalnym w AML, opisywanym przez większość autorów jest CD7 (16%–17% przypadków AML) [4, 5, 19]. Następnymi w kolejności częstości występowania są antygeny CD2 i CD19 — 10%–15% przypadków AML [4, 5] lub według innych autorów 7%–9% przypadków AML [19]. Inne antygeny jak CD3, CD5, CD10 są znacznie rzadsze (poniżej 5%–10% przypadków AML) [19].

Obecność niektórych markerów limfoidalnych koreluje z typem białaczki wg FAB, tj. obserwowano częstsze występowanie CD2 i CD9 w AML–M3, CD20 w AML–M5, natomiast CD5 w AML–M5a [16, 19]. Często koekspresja taka jest związana z charakterystycznymi aberracjami chromosomalnymi np. charakterystyczna koekspresja CD19+/CD34+, a także CD45RA, CD54 i CD56 występują w AML t [8, 21], natomiast CD2 w AML t (15,17) [14, 19, 27]. Biorąc pod uwagę poszczególne typy białaczek, ekspresję antygenów limfoidalnych wykazują najczęściej podtypy AML–M4 i M5, zaś najrzadziej AML–M3 [19].

Wartość prognostyczna tej ekspresji jest dyskutowana [19]. W niektórych pracach nie znaleziono żadnego związku z rokowaniem białaczki [4]. Inne natomiast wskazują na gorsze rokowanie związane z obecnością CD7 [12, 13] oraz CD2 i CD19 [30], w jeszcze innych pracach natomiast wymienia się CD2 i CD19 jako czynniki lepszego rokowania [19]. Khalidi i wsp. [19] podsumowują, że występowanie antygenów limfoidalnych w AML może być raczej pomocne w późniejszej diagnostyce choroby reszkowej niż służyć jako marker prognostyczny. W tabeli IV przedstawiono immunologiczną charakterystykę poszczególnych typów AML wg FAB [27].

Podsumowując należy stwierdzić, że diagnostyka immunofenotypu ostrych białaczek szpikowych jest szczególnie trudna z uwagi na: heterogenny profil ekspresji antygenów mieloidalnych (nie tylko u różnych chorych, ale także w obrębie populacji bla-

Tabela IV. Charakterystyka immunologiczna poszczególnych rodzajów ostrych białaczek szpikowych

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
MPO	+/-	+	+	-	+	-/+*	-	-
CD2	-				+/-			
CD7	-/+	-/+	-	-	-	-/+	-	-
CD11c	-/+	-/+	-/+	-	+/-	+/-	-/+	-/+
CD13	+/-	+	+	+	+	+*	-/+	+/-
CD14	-	-	-	-	+/-	+/-*	-	-
CD15	-	+/-	+/-	-/+	+/-	+!	-/+	-
CD19	-	-***	-***	-	-	-	-	-
CD33	+/-	+/-	+/-	+	+	+	-/+	+/-
CD34	+/-	+/-	+/-	-	-#	-	-	-
CD38	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD41	-	-	-	-	-	-	-	+
CD56		+/-	+/-					
CD61	-	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	-	+/-	+	+		
CDw65	-/+	+/-	+/-	-/+	+	+/-	+/-	+/-
CD68	-	-	-	+	+/-	+	-	-
CD71	-/+	-/+	-/+	-/+	-	-	+	-
CD117	+/-	+/-	+/-	-/+	+/-	-/+**	+	+
HLA-DR	+/-	+	+	-	+	+	-/+	+/-
TdT	-/+	-/+	-/+	-	-	-	-	-

stów u jednego chorego), liczne aberracje ekspresji antygenów oraz asynchronię profilu antygenowego i parametrów rozproszenia światła lasera (tzw. *light scatter*) [23, 33]. Z uwagi na powyższe cechy fenotypu AML oraz opisywane zjawisko zachodzenia na siebie (tzw. *overlap*) ekspresji antygenów występujących u większości typów AML, immunodiagnostyka typów ostrych białaczek szpikowych bez wsparcia mielogramu i badania cytochemicznego ma ograniczone znaczenie praktyczne.

#### OSTRA BIAŁACZKA LIMFOBLASTYCZNA (ALL)

Ostra białaczka limfoblastyczna charakteryzuje się ekspresją co najmniej dwóch antygenów linii B-komórkowej (w tym także w cytoplazmie np. CD79 $\alpha$  i CD22) (B-ALL) lub powierzchniową /cytoplazmatyczną ekspresją antygeny T-komórkowego CD3 (T-ALL). Antygeny CD2 i/lub CD7 nie wystarczają do określenia linii T-komórkowej, z wyjątkiem typu „korowego” T-ALL, gdzie ekspresja CD1a wystarczy do rozpoznania tej białaczki [2, 27]. Antygeny nie-mieloidalne występują na komórkach blastycznych w sposób homogeny [33], dlatego diagnostyka immunofenotypu ALL jest łatwiejsza od AML. Klasyfikację immunologiczną ALL przedstawiono w tabeli V [2].

Tabela V. Klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL)

<p><b>B-ALL:</b> (CD19+ i/lub cyCD79α+ i/lub cy/sCD22+; HLA-DR+; TdT+ z wyj. B-IV – TdT-)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• B-I (pro-B-ALL): jak wyżej</li> <li>• B-II (common-ALL): CD10+</li> <li>• B-III (pre-B-ALL): CD10+ i cyIgM+</li> <li>• B-IV (matureB-ALL): cy lub s kappa+ lub lambda+ i/lub slgM+</li> </ul>
<p><b>T-ALL:</b> (cy lub s CD3, TdT+, HLA-DR-, CD34-)</p> <p>- T-I (pro-T-ALL): CD7+</p> <p>- T-II (pre-T-ALL): CD2+, i/lub CD5+ i/lub CD8+</p> <p>- T-III (cortical-ALL): CD1a+ (jeden marker wystarczy!!!)</p> <p>- T-IV (mature-T-ALL): sCD3+, CD1a-</p> <p>-- T-ALL α/β : anti-TCR α/β</p> <p>-- T-ALL γ/δ: anti-TCR γ/δ:</p>
<p><b>ALL z ekspresją antygenów mieloidalnych (My + ALL) –</b></p>

Pamiętać należy, że TdT pozwalający odróżnić ostre białaczki limfoblastyczne od przewlekłych limfoproliferacji nie jest specyficznym markerem dla ALL i występuje on w 15%–20% przypadków ostrych białaczek szpikowych [27, 29]. Opisuje się związek ALL typu L1 i L2 wg FAB z dodatnią ekspresją TdT i brakiem powierzchniowych immunoglobulin sIg (-), natomiast blasty w ALL typu L3 wg FAB mają fenotyp TdT (-) sIg (+) [35]. Antygen CD10 może być obecny także w niektórych przypadkach T-ALL [2]. CD4 nie może być uznany za marker linii T, gdyż jest on obecny na monocytach oraz w stosunkowo wysokim odsetku na blastach niektórych przypadków AML [2, 19]. Opisano również przypadki występowania antygeny CD22 typowego dla linii B-komórkowej, na powierzchni prawidłowych komórek mieloidalnych, jak i na komórkach dendrytycznych [22]. Niska ekspresja CD22 może być także typowa dla części przypadków AML [27].

Koekspresja antygenów mieloidalnych na blastach ALL występuje w ok. 25% przypadków i najczęściej jest to CD13 (ok. 18%). Znacznie rzadziej, tj. poniżej 10% AML, występują przypadki z koekspresją CD33, CD14 i anty-MPO [5].

### ABERRACJE IMMUNOLOGICZNE

Możliwość jednoczesnego oznaczenia kilku (obecnie nawet czterech) antygenów na powierzchni i w cytoplazmie komórki w połączeniu z analizą parametrów rozproszenia światła laserowego (FSC, SSC) pozwoliło na wyodrębnienie przypadków białaczek o nieprawidłowych fenotypach określanych jako „aberracje immunologiczne” [23, 31, 33]. Rodzaje aberracji immunologicznych przedstawiono w tabeli VI [23, 27, 33].



Tabela VI. Rodzaje „aberracji immunologicznych”

1	koekspresja — bez cech białaczki bifenotypowej (My + ALL, Ly + AML)
2	hiperekspresja (wysoki logarytm fluorescencji)
3	fenotyp niepełny (np. AML CD33–, ALL CD2+CD3–CD5–CD7–)
4	fenotyp asynchroniczny (np. koekspresja CD34+/CD15+ lub CD19+ CD10+ CD22+ CD34+)
5	białaczki bi–fenotypowe (jednoczesna ekspresja markerów 2 linii na jednej komórce)
6	białaczki bi–klonalne (2 populacje komórek o różnych markerach liniowych)
7	białaczki mieszano–liniowe (mixed lineage) (obecność markerów 3 różnych linii komórkowych na jednej populacji komórek)
8	nietypowe parametry FSC/SSC światła lasera

Odsetek opisywanych w literaturze przypadków białaczek z występującymi aberracjami fenotypów mieści się w szerokim zakresie 1–50% [26, 31]. Znaczenie kliniczne tych fenotypów jest nadal sprawą kontrowersyjną [4, 19]. Grupa EGIL w celu diagnostyki przypadków białaczek bi–fenotypowych ustaliła specjalny *system score*, tj. system przyznawania określonej liczby punktów za ekspresję na komórkach białaczek antygenów limfoidalnych i mieloidalnych w zależności od stopnia ich specyficzności liniowej. Białaczkę można uznać za bi–fenotypową, jeśli liczba punktów dla linii mieloidalnej wyniesie ponad 2 oraz dla linii limfoidalnej co najmniej 1 punkt. Ustalono również, że stwierdzenie koekspresji dwóch antygenów: limfo– i mieloidalnego na komórce jest możliwe wówczas, gdy suma odsetków komórek z ekspresją pojedynczego antygeny jest wyższa od 120%. Wówczas nie jest konieczne wykonywanie dodatkowego, podwójnego barwienia obu antygenów [2]. *System score* dla białaczek bi–fenotypowych przedstawiono w tabeli VII.

Tabela VII. Białaczki bi–fenotypowe — *system score* linia mieloidalna (> 2 punkty) + linia limfoidalna (1 punkt)

Punkty	Antygeny		
	B–komórkowe	T–komórkowe	mieloidalne
2	CD79 $\alpha$ , cy IgM, cy CD22	CD3 (cy / s), anti-TCR $\alpha$ / $\beta$ , ant-TCR $\gamma$ / $\delta$	anti-MPO anti-lyzozymy ?
1	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13, CD33, CDw65
0,5	TdT, CD24	TdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64, CD117

## WARTOŚCI PROGNOSTYCZNE FENOTYPÓW OSTRYCH BIAŁACZEK

Immunofenotyp białaczki jest jednym z parametrów ocenianych pod kątem wartości prognostycznych. Markery o udowodnionej wartości prognostycznej w AML to CD34, CD13, CD14, CD11b [4, 15]. Antygeny CD34, CD2, CD9 i CD14 są związane z niższym odsetkiem CR, w tym CD34 i CD9 także z krótszym czasem trwania CR w AML [4]. Antygeny CD11b i CD9 są związane zarówno z krótszym okresem CR, jak i krótszym czasem przeżycia w AML [4]. Wartość prognostyczna ekspresji antygenów limfoidalnych w tym CD7 oraz CD13 i CD15 w AML, jak wspomniano wcześniej, jest nadal zagadnieniem kontrowersyjnym — w literaturze dane sprzeczne. Jeden z nowszych antygenów CD98 koreluje z krótszym okresem trwania CR, przy braku związku z innymi klinicznymi parametrami, co powoduje, że jest on niezależnym markerem prognostycznym, związanym z kontrolą wzrostu i przeżycia komórek [25].

### DIAGNOSTYKA CHOROBY RESZTKOWEJ (*MINIMAL RESIDUAL DISEASE — MRD*)

Ważnym problemem klinicznym u chorych z białaczką jest diagnostyka choroby resztkowej. Obecna strategia w wykrywaniu MRD metodą cytometrii jest oparta na fakcie, że markery na komórkach nowotworowych występują w innych kombinacjach niż na zdrowych komórkach szpiku i krwi obwodowej np. koekspresja CD34+/CD56+, którą uważa się za bardzo ważną diagnostycznie [6, 11]. Nietypowe kombinacje antygenów na blastach białaczkowych w szpiku lub krwi obwodowej są czasami charakterystyczne dla komórek innych zdrowych tkanek np. koekspresja TdT+/CD1+ występująca na komórkach grasicy jest typowa dla T-ALL. W niektórych przypadkach intensywność fluorescencji pomaga w zróżnicowaniu populacji blastów. Doświadczenia eksperymentalne z wytworzeniem sztucznej mieszaniny komórek zdrowych i blastycznych dowiodły, że jest możliwa identyfikacja jednej komórki blastycznej w grupie 10.000 komórek [7, 8, 11, 34].

Dotychczas diagnostyka MRD polegała na monitorowaniu odsetka antygenów obecnych na komórkach najliczniejszej i najbardziej charakterystycznej dla danej białaczki subpopulacji blastów [23, 33]. Z uwagi na dużą heterogenność AML, w wielu przypadkach obecnych jest jednocześnie kilka subpopulacji blastów o różnym składzie antygenowym reprezentujących różne stadia rozwojowe klonu komórek białaczkowych. Za nawrót choroby może być odpowiedzialna nawet niewielka podgrupa komórek, która może być wybitnie oporna na chemioterapię, dlatego ocena MRD powinna być oparta na analizie wszystkich subpopulacji blastów [23]. Podkreślić również należy, że dużą trudność w diagnostyce MRD stanowi fakt jednoczesnego występowania „resztkowych” komórek białaczkowych oraz zwiększonego odsetka (szczególnie po chemioterapii lub przeszczepie) prawidłowych komórek prekursorowych, których fenotypy często są do siebie podobne lub nawet identyczne [36]. Kallakury i wsp. [18] stwierdzają częste fałszywie dodatnie wyniki przy ocenie MRD u chorych z ALL z prekursorowych komórek B. W związku z powyższymi faktami, cytometryczna

identyfikacja subpopulacji komórek z fenotypem charakterystycznym dla postaci młodych jest niewystarczająca do monitorowania MRD [36]. Bardziej przydatną metodą jest tutaj metoda PCR [18].

Obecna analiza cytometryczna ma charakter wielowymiarowy, tzn. oparta jest na jednoczesnej ocenie wielu parametrów, w tym parametrów rozproszenia światła lasera, co umożliwia opracowanie „wzorców antygenowych” dla następujących po sobie poszczególnych stadiów rozwojowych komórek w prawidłowej hemopoezie oraz odpowiadających tym „wzorcom” geometrycznych regionów, w których komórki z danym fenotypem są obecne [36, 37]. Wszelkie odchylenia od ustalonej w ten sposób normy np. występowanie fenotypów aberrantnych, świadczą o występowaniu komórek białaczkowych. Blasty białaczkowe charakteryzują się obniżoną ekspresją CD45 i podwyższoną wartością SSC (*side scatter*). Metoda jednoczesnej oceny CD45/SSC jest często stosowana do ich odróżnienia, ale powinna być ona częścią cytometrycznej analizy wielowymiarowej [36].

Ciudad i wsp. [10] wykazali, że obecność resztkowych blastów białaczkowych wpływa na charakterystykę fenotypu populacji prawidłowych komórek prekursorowych tj. wzrost w tej populacji odsetka komórek niedojrzałych o fenotypie CD34+/19+ i CD20-/CD19+ oraz pojawienie się nieprawidłowego „wzorca antygenowego” dojrzewania tych komórek. Ocena tych nieprawidłowości jako metoda diagnostyki choroby resztkowej (szczególnie ocena odsetka komórek CD34+) może służyć jako kryterium — czynnik ryzyka wystąpienia nawrotu choroby i krótszego czasu przeżycia bez objawów choroby. Lucio i wsp. [22] potwierdzili na podstawie badań, że dokładnie określone profile antygenowe subpopulacji komórek B odpowiadające poszczególnym stadiom rozwojowym tych komórek mogą utworzyć rodzaj „wzorca” stanowiącego wartość referencyjną dla oceny choroby resztkowej. Procentowy udział subpopulacji reprezentujących dane stadium rozwojowe limfocyta B w szpiku może być różny zależnie od wieku, przy czym w dzieciństwie przeważa udział subpopulacji o fenotypie „niedojrzałym”, tj.:

- CD19dim/CD34+/TdT+/CD10+/CD22dim/CD45dim/CD38+/CD20- i
- CD19+/CD34-/TdT-/CD10+/CD22dim/CD45+/CD38+/CD20dim [22].

Bardzo ważna w ocenie MRD jest również ilościowa ocena tzw. gęstości poszczególnych markerów (z użyciem *calibration microbeads*) [1].

## PIŚMIENNICTWO

1. Babustkova O., Glasova M., Konikova E., Kuseda J.: Leukemia-associated phenotypes: their characteristics and incidence in acute leukemia. *Neoplasma*, 1996; 43 (6): 367–372.
2. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., van't Veer M.B.: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*, 1995; 9: 1783–1786.
3. Bernier M., Massy M., Deleeuw N., Bron D., Debusscher L., Stryckmans P.: Immunological definition of acute minimally differentiated myeloid leukemia (M0) and acute undifferentiated leukemia (AUL). *Leuk. Lymphoma*, 1995; 18, suppl. 1: 13–17.

4. *Bradstock K., Matthews J., Benson E., Page F., Bishop J.*: Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. *Blood*, 1994; 84, 4: 1220–1225.
5. *Buccheri V., Matutes E., Dyer M., Catovsky D.*: Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia*, 1993; 7: 919–927.
6. *Campana D.*: Applications of cytometry to study acute leukemia: in vitro determination of drug sensitivity and detection of minimal residual disease. *Cytometry*, 1994; 18: 68–74.
7. *Campana D., Coustan-Smith E., Janossy G.*: The immunological detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, 1990; 76: 163–169.
8. *Campana D., Coustan-Smith E.*: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*, 1999 Aug 15; 38 (4): 139–152.
9. *Cascavilla N., Musto P., D'Arena G., Melillo L., Carella AM., Petrilli MP., Sanpaolo G., Carotenuto M.*: CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Hematologica*, 1998 May; 83 (5): 392–397.
10. *Ciudad J., San Miguel J.F., Lopez-Berges MC. et al.*: Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is useful tool to predict relapse in precursor B-ALL. *Br. J. Haematol.*, 1999; 104: 695–705.
11. *Coustan-Smith E., Behm R.G., Hurwitz C.A., Rivera G.K., Campana D.*: N-CAM (CD56) expression by CD34+ malignant myeloblasts has implications for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1993; 7: 853–858.
12. *Del Poeta G., Stasi R., Venditti A. et al.*: Prognostic value of cell marker analysis in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1994; 8: 388–394.
13. *Drexler H.G., Thiel E., Ludwig W.D.*: Acute myeloid leukemias expressing lymphoid-associated antigens: diagnostic incidence and prognostic significance. *Leukemia*, 1993; 7: 489–498.
14. *Ferrara F., Di Noto R., Annunziata M., Copia C., Lo Pardo C., Boccuni P., Sebastio L., Del Vecchio L.*: Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t (8,21) in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 1998 Jul; 102 (2): 444–448.
15. *Griffin J.D., Davis R., Nelson D.A., Davey F.R., Mayer R.J., Schiffer C., McIntyre O.R., Bloomfield C.D.*: Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 1986; 68: 1232.
16. *Guglielmi C., Martinelli M.P., Diverio D., et al.*: Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukemia; correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol*, 1998; Sep, 102 (4): 1035–1041.
17. *Inaba T., Shimazaki C., Sumikuma T. et al.*: Flow cytometric analysis of Thy-1 expression in CD34 positive acute leukemia. *Int. J. Hematol.*, 1997 Oct; 66 (3): 315–323.
18. *Kallakury B.V., Hartmann D.P., Cossman J., Gootenberg J.E., Bagg A.*: Posttherapy surveillance of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Value of polymerase chain reaction and limitations of flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1999 Jun; 111 (6): 759–766.
19. *Khalidi H., Medeiros J., Chang K., Brynes R., Slovak M., Arber D.*: The Immunophenotype of Adult Acute Myeloid Leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1998, 211–220.
20. *Kubota A., Okamura S., Shimoda K., Harada M., Niho Y.*: The c-kit molecule and the surface immunophenotype of human acute leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 1994 Aug; 14 (5–6): 421–428.
21. *Lanza F., Latorraca A., Moretti S., Castagnari B., Ferrari L., Castoldi G.*: Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. *Cytometry*, 1997 Jun 15; 30 (3):134–144.

22. *Lucio P., Parreira A., van den Beemd M.W.M. et al.*: Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor B-ALL. *Leukemia*, 1999; 13: 419-427.
23. *Macedo A., Orfao A., Gonzalez M., Vidriales M.B., Lopez-Berges MC., Martinez A., San Miguel JF.*: Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implication for minimal residual disease studies. *Leukemia*, 1995; 9: 993-998.
24. *Nguyen P.L., Olszak I., Harris N.L., Preffer F.I.*: Myeloperoxidase detection by three-color flow cytometry and enzyme cytochemistry in the classification of acute leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1998 Aug; 110 (2): 163-169.
25. *Nikolova M., Guenova M., Taskov H., Dimitrova E., Staneva M.*: Levels of expression of CAF7 (CD98) have prognostic significance in adult acute leukemia. *Leuk. Res.*, 1998 Jan; 22 (1): 39-47.
26. *Piątkowska-Jakubas B., Pituch-Noworolska A., Skotnicki A., Balana-Nowak A.*: Znaczenie diagnostyczne określenia immunofenotypu blastów u chorych na ostre białaczki. *Acta Haematol. Pol.*, 1996; 27, Nr.1: 33-41.
27. *Rothe G., Schmitz G.*: for the Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*, 1996; 10: 877-895.
28. *Scott A.A., Head D.R., Kopecky K.J. et al.*: HLA-DR-, CD33-, CD56+, CD16- myeloid/natural killer cell acute leukemia: a previously unrecognized form of acute leukemia potentially misdiagnosed as French-American-British acute myeloid leukemia-M3. *Blood*, 1994 Jul 1; 84 (1): 244-255.
29. *Scott C.S., Den Ottolander G.J., Swirsky G., Pangalis A., Vives Corrons JL., De Pasquale A., Van Hove L., Bennet J.M., Namba K., Flandrin G., Lewis S.M., Polliack A.*: Recommended procedures for the classification of acute leukemias. *Leuk. Lymphoma*, 1995; 18, Suppl. 1: 1-12.
30. *Solary E., Casanovas R-O., Campos I. et al.*: Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation with CD19+, CD34+ and CD14+/DR- phenotypes with shorter survival. *Leukemia*, 1992; 6: 393-399
31. *Stella-Hołowiecka B.*: Klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek. Aktualne Problemy Hematologii Klinicznej (Robocze materiały sesji wiosennej 1996 Szkoły Hematologii) — Wykłady, zeszyt 1.
32. *Takahashi T., Mizutani M., Miwa H., et al.*: Frequent expression of human Thy-1 antigen on pre-B cell acute lymphoblastic leukemia with t (9,22). *Int. J. Hematol.*, 1998 Jun; 67 (4): 369-378.
33. *Terstappen L., Safford M., Könemann S., Loken M., Zurlutter K., Büchner T., Hiddemann W., Wörmann B.*: Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia*, 1992; 6: 70-80.
34. *Van Dongen JJM., Hooijkaas H., Hahlen K. et al.*: Detection of minimal residual disease in TdT positive T-cell malignancies by double immunofluorescence staining. w: Minimal residual disease in acute leukemia. Lowenberg P., Hagenbeck J. (eds) Martin Nijhoff Publishers, The Hague, 1984: 67-81.
35. *Vasef M.A., Brynes R.K., Murata-Collins J.L., Arber D.A., Madeiros L.J.*: Surface immunoglobulin light chain-positive acute lymphoblastic leukemia of FAB L1 or L2 type: a report of 6 cases in adults. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1998; Aug, 110 (2): 143-149.
36. *Wells D., Sale G., Shulman H., Myerson D., Bryant E., Gooley T., Loken M.*: Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy and bone marrow transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1998; 110; 84-94.

37. *Weir E.G., Cowan K., LeBeau P., Borowitz M.J.*: A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. *Leukemia*, 1999 Apr; 13 (4): 558-567.

### SUMMARY

Immunophenotyping of acute leukemias by flow cytometry is one of the basic diagnostic method in this disease. Considering their heterogeneity, it has been necessary to introduce uniformed immunological classification, which has been created by researchers from "Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis" and "European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL)". This classification is based on two-step method of evaluation of acute leukemias. First step is to differentiate between myeloid and B or T-lymphoid origin of the cell using antigens of broad spectrum and non line-specific antigens, second step is detailed classification of the myeloid or lymphoid cell using line-specific antigens connected with defined stage of cell differentiation. There are some new antigens included in the routine diagnostic evaluation of acute leukemias: MPO-recognized as most specific myeloid antigen, CD117 as pan-myeloid antigen, cyCD79 $\alpha$  as pan-lymphoid antigen, CD64 and anti-lysozyme as monocytoid antigens. EGIL group established the rule for the antigens to be positive markers if they are expressed on the 20% or more blast cells. Immunological classification of acute leukemias described in this work, enables precise definition and division into groups (which correlate with FAB classification) of acute lymphoblastic leukemias (ALL) only. Concerning acute myeloblastic leukemias (AML), considering their heterogeneity, the above classification enables to define precisely the phenotypes of only three types of AML: AML-M0, AML-M6 and AML-M7. Great difficulty is lack of unequivocal monocytoid marker (some studies of the antibody called anti-lysozyme are conducted). Expression of lymphoid antigens on AML blasts according to different authors is about 10%-30% or 40%-60%, the most frequent antigen is CD7. Concerning ALL, the surface or cytoplasmic expression of: at least two B-cell antigens (B-ALL) or expression of CD3 (T-ALL) is necessary for the diagnosis. Coexpression of myeloid antigens in ALL is estimated as about 25% and the most frequent antigen is CD13. Atypical phenotypes of acute leukemias are defined as "aberrant phenotypes" and include: coexpression and hyperexpression of antigens, incomplete phenotype, asynchronous phenotype, bi-phenotypic, bi-clonal and mixed-cellularity leukemias. EGIL group established special "score system" for evaluation of bi-clonal leukemias. The important target for flow cytometry is diagnosis of minimal residual disease (MRD), which is based on the evaluation of all subpopulations of neoplastic cells, that is cells with aberrant phenotypes.