

Beata Piątkowska-Jakubas

**ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE I KLINICZNE
OKREŚLANIA IMMUNOFENOTYPÓW KOMÓREK
BLASTYCZNYCH DOROSŁYCH Z OSTRYMI
BIAŁACZKAMI.**

Praca doktorska

z Kliniki Hematologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie

Kierownik Kliniki: dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

Promotor : dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095260

Kraków 1994

Wyrażam serdeczne podziękowanie mojemu Promotorowi

dr hab.med. ALEKSANDROWI B.SKOTNICKIEMU

**za przekonanie mnie do hematologii, stworzenie warunków
dla powstania tej pracy oraz życzliwą opiekę i pomoc w
trakcie jej przygotowywania**

Beata Piątkowska-Jakubas

Spis treści :

Wstęp.....	str. 1
Cel pracy.....	str. 6
Materiał i metodyka.....	str. 7
Wyniki.....	str. 12
Omówienie wyników.....	str. 39
Dyskusja.....	str. 43
Wnioski.....	str. 47
Streszczenie.....	str. 48
Piśmiennictwo.....	str. 49
Aneks.....	str. 63

SPIS TABEL:

Tabela 1a	Zestawienie stosowanych przeciwciał monoklonalnych	str. 9
Tabela 1	Ekspresja poszczególnych markerów powierzchniowych blastów w grupach chorych z AML i ALL	str.14
Tabela 2	Zestawienie podtypów immunofenotypowych ostrych białaczek mieloblastycznych (AML) w grupie 75 chorych, ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL) w grupie 39 chorych i 4 chorych z ostrą białaczką niezróżnicowanokomórkową (AUL) z ich klasyfikacją wg FAB	str.16
Tabela 3	Zestawienie 15 przypadków weryfikacji w oparciu o badanie immunofenotypowe rozpoznania opartego o klasyfikacje FAB.....	str.17
Tabela 4	Ekspresja markerów powierzchniowych w poszczególnych typach FAB w grupach chorych z AML	str. 18
Tabela 5	Ekspresja markerów powierzchniowych w poszczególnych typach FAB w grupach chorych z ALL	str. 19
Tabela 6	Ekspresja markerów powierzchniowych w podtypach immunofenotypowych w grupie chorych z ALL=39	str.20
Tabela 7	Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów w typowych immunofenotypach blastów leczonych chorych z AML z wstępnymi wartościami morfologii / L,Hb, Pt/ i aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi	str.22
Tabela 8	Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów w typowych immunofenotypach blastów z odsetkiem uzyskanych remisji całkowitych w grupie leczonych chorych z AML	str.23
Tabela 9	Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów CD w typowych immunofenotypach blastów leczonych chorych z ALL z wstępnymi wartościami morfologii / L,Hb,Pt/ i aktywnością dehydrogenazy mleczanowej w surowicy	str. 24
Tabela 10	Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów CD w typowych immunofenotypach blastów z odsetkiem uzyskanych remisji całkowitych w grupie leczonych chorych z ALL ...	str.25
Tabela 11	Zestawienie 37 przypadków chorych z ostrymi białaczkami o nietypowych fenotypach blastów: klasyfikacja immunofenotypowa i wg FAB	str. 34
Tabela 12	Porównanie charakterystyki laboratoryjnej i klinicznej w grupach chorych z AML o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów.....	str.35
Tabela 13	Porównanie parametrów klinicznych i laboratoryjnych w grupach chorych z ALL o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów.	str.36

SPIS RYCIN :

RYC. 1	Ekspresja poszczególnych markerów powierzchniowych w immunofenotypach blastów w grupach chorych z AML i ALL	str.13
RYC.2, 2a, 2b	Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w zależności od obecności lub braku poszczególnych markerów CD w typowych immunofenotypach leczonych chorych z AML (p- wg log rank test).....	str.26 27 28
RYC. 3,3a,3b,3c	Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w zależności od obecności lub braku poszczególnych markerów CD w typowych immunofenotypach leczonych chorych z ALL (p- wg log rank test).....	str.29 30 31 32
RYC. 4	Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w grupach leczonych chorych z AML o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów (krzywe wg Kaplana- Meiera, p-wg testu log rank).....	str. 37
RYC.5	Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w grupach leczonych chorych z ALL o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów (krzywe wg Kaplana- Meiera, p-wg testu log rank).....	str. 38

WSTĘP

Współczesna diagnostyka laboratoryjna ostrych białaczek obejmuje ocenę morfologiczną komórek blastycznych szpiku lub krwi obwodowej, badanie cytochemiczne oraz określenie immunofenotypu tych komórek przy pomocy przeciwciał monoklonalnych. W oparciu o ocenę morfologiczną komórek blastycznych wprowadzono powszechnie do dziś stosowaną klasyfikację ostrych białaczek limfoblastycznych i mieloblastycznych FAB (French, British, American) (Bennett i wsp. 1976, 1982) zmodyfikowaną i rozszerzaną później o charakterystykę cytochemiczną komórek blastycznych (Bennett i wsp. 1985, Catovsky i wsp. 1991). Zastosowane w tej klasyfikacji kryteria (przy uwzględnieniu badań cytochemicznych) pozwalają na sklasyfikowanie około 82- 85% ostrych białaczek, w których występują wyraźne cechy morfologicznego i cytochemicznego zróżnicowania limfoidalnego lub mieloidalnego (Hołowiecki i wsp. 1973, Radwańska i wsp. 1982, Hirt i wsp. 1982, Hołowiecki J. 1991). Badania cytochemiczne komórek blastycznych, których zasady wprowadził Löffler w 1972r. wiążą się z subiektywną oceną wyników, co więcej w procesie transformacji blastycznej komórek pewne cechy enzymatyczne mogą nie występować (np. reakcja PAS wykrywająca glikogen może być ujemna w 30% białaczek limfoblastycznych).

Doskonalenie kryteriów rozpoznawczych przez wprowadzenie metody wykrywania fosfatazy kwaśnej i końcowej transferazy dezoksynukleotydowej (TdT) w limfocytach, receptorów dla erytrocytów barana (rozety E) i myszy, receptorów Fc, powierzchniowych immunoglobulin umożliwiło określenie subpopulacji blastów linii limfoidalnej (Catovsky i wsp. 1978, Gupta i wsp. 1976, Hirt i wsp. 1982, Thiel i wsp. 1984). Metody te pozwalają jednak na identyfikację podtypów w 30-50% ostrych białaczek limfoblastycznych (Hirt i wsp. 1982, Thiel i wsp. 1984, Thiel i wsp. 1987).

Wykrycie przeciwciał monoklonalnych (MoP) (Koehler i Milstein, 1975) rozszerzyło możliwości poznawania patomechanizmu białaczek i okazało się przydatne do diagnostyki (Andrade i wsp. 1988, Moldenhauer i wsp. 1986, Robak i wsp. 1985). Klasyfikacji MoP dokonał międzynarodowy zespół specjalistów w trakcie 5 konferencji roboczych (International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens): Paryż 1982, Boston 1984, Oxford 1986, Wiedeń 1989, Boston 1993 (Bernard i wsp. 1984, Nadler i wsp. 1986, Knapp i wsp. 1989, Schlossman i wsp. 1994). Immunofenotypowa klasyfikacja ostrych białaczek wiąże się z występowaniem na powierzchni komórek blastycznych (i/ lub w cytoplazmie)

determinant lub receptorów związanych z poszczególnymi fazami dojrzewania i różnicowania się danej linii . Wykazanie obecności i odpowiedniego zestawu determinant na powierzchni komórek pozwala na określenie linii z jakiej pochodzi badana komórka oraz jaki jest jej stopień dojrzałości. Określanie immunofenotypu blastów i teza ,że białaczki stanowią klonalny rozrost transformowanych komórek, których różnicowanie zostało zatrzymane na pewnym etapie rozwoju , pozwoliły na określenie hipotetycznego modelu różnicowania prawidłowych komórek krwiotwórczych. Jednakże zaburzona ekspresja genów w czasie leukemogenezy, "nieśmiertelność" rzadko występujących pierwotnych komórek hemopoetycznych z jednoczesną obecnością markerów limfo- i mieloidalnych , asynchroniczne występowanie markerów na komórkach blastycznych (zbyt wczesna utrata lub przetrwanie jednego z markerów) stanowią o tym, że nie można stawiać znaku równości pomiędzy fenotypem blastów białaczkowych i fenotypem odpowiadających im etapem zróżnicowania i dojrzałości komórek prawidłowej hemopoezy (Greaves 1982, Nadler i wsp. 1984, Reinherz i wsp. 1980 ,Freedman i wsp. 1987, Foon i wsp. 1986, Terstappen i Loken 1990).

Uważa się, że obecność markerów na powierzchni lub w cytoplazmie komórek jest wynikiem aktywacji lub ekspresji mechanizmów genetycznych związanych z regulacją proliferacji i różnicowania komórek blastycznych. Rozwój i coraz większa powszechność badań cytogenetycznych pozwalających na stwierdzenie swoistych lub względnie swoistych aberracji chromosomalnych w komórkach blastycznych oraz obserwacje ich korelacji z obecnością (lub brakiem) markerów powierzchniowych stały się podstawą stworzenia klasyfikacji roboczej ostrych białaczek MIC (Morphology, Immunology, Cytogenetics) (First, Second, Third, Fourth MIC Cooperative Study Group 1986,1988,1990). Jednakże w toku badań dużych grup chorych z ostrymi białaczkami wyodrębniono tylko nieliczne immunofenotypy blastów ściśle związane z występowaniem w tych komórkach swoistych aberracji chromosomalnych (Kita i wsp. 1992, Tatsumi i wsp. 1992, Hurwitz i wsp. 1992, Reading i wsp. 1993). Ponadto badania cytogenetyczne są nie tylko drogie ale i czasochłonne stąd nie mogą być traktowane jako część rutynowej diagnostyki przed wdrożeniem leczenia antyproliferacyjnego.

Badanie immunofenotypowe komórek blastycznych zostało wprowadzone wpięrw do diagnostyki ostrych białaczek limfoblastycznych, ponieważ klasyfikacja FAB nie pozwalała na wyodrębnienie z tej heterogennej grupy białaczek podtypów immunologicznych (proB, common, preB, B, preT, T), natomiast badania kliniczne udowodniły praktyczną wartość takiego podziału ze względu na zróżnicowany przebieg choroby i prognozowanie w tych grupach. (Foon i wsp.1982,

Chen i wsp. 1983, Foon i Todd 1986, Foon i wsp. 1986, Clark i wsp. 1986, Pinkel 1987, Campana i wsp. 1987, Sobol i wsp. 1987, Hoelzer i wsp. 1988, Urbano-Ispizua i wsp. 1990, Potter 1992).

Zmodyfikowany podział FAB dotyczący ostrych białaczek mieloblastycznych pozwala doświadczonej osobie na określenie podtypu (M1-M6) w przypadku blastów o wyraźnych cechach morfologicznych i cytochemicznych, stąd przydatność badania immunofenotypowego w diagnostyce tej grupy białaczek była i jest ciągle przedmiotem kontrowersji.

W 1991r. grupa FAB zdefiniowała w oparciu o badanie immunofenotypowe typ tzw. białaczki niezróżnicowanej lub nieznacznie zróżnicowanej mieloidalnie (AML-M0). Ten podtyp białaczki można rozpoznać wówczas kiedy badania morfologiczne i cytochemiczne nie wykazują cech zróżnicowania komórek blastycznych, natomiast wykrywa się na ich powierzchni wczesne markery mieloidalne i nie stwierdza się markerów limfoidalnych (Bennett i wsp. 1991). Zdaniem innych autorów konieczne jest także wykazanie obecności w tych komórkach mieloperoksydazy (MPO) w mikroskopie elektronowym lub immunocytochemicznie (Van't Veer i wsp. 1992). W materiale analizowanym przez grupę FAB podtyp AML-M0 stanowił 2-3% chorych z ostrą białaczką mieloblastyczną. Badanie immunofenotypowe umożliwiło także rozpoznawanie ostrej białaczki megakarioblastycznej (włączonej do klasyfikacji FAB jako podtyp AML-M7) oraz białaczki wywodzącej się z wczesnych komórek erytoidalnych (early erythroblastic leukemia) (Bain i wsp. 1990).

Wielu autorów podkreśla związek pomiędzy występowaniem w immunofenotypie blastów chorych z białaczką mieloblastyczną markerów wczesnych etapów rozwoju szeregu mieloidalnego (CD34, HLA-DR) a niekorzystnym rokowaniem w tej grupie chorych (Borowitz i wsp. 1989, Campos i wsp. 1989, Geller i wsp. 1990, Solary i wsp. 1992, Lee i wsp. 1992, Te Boekhorst i wsp. 1993). Oceniano także znaczenie prognostyczne markerów powierzchniowych związanych z bardziej zróżnicowanymi postaciami białaczek mieloidalnych (CD14, C15). Istnieje szereg prac potwierdzających ich korzystny wpływ na osiągnięcie całkowitych remisji hematologicznych i czas przeżycia (Campos i wsp. 1989, Schwarzingier i wsp. 1990, Hołowiecki i wsp. 1986, 1989).

Osobne zagadnienie stanowi rozpoznawanie proliferacji z "nietypowym," mieszanym fenotypem blastów, które Gale i Ben Bassat a za nimi i inni autorzy proponują nazywać hybrydami (Ben-Bassat i Gale 1984, Mirro i wsp. 1985, Mirro jr 1989, Gale i Ben-Bassat 1987, Maitreya i wsp. 1989). Fenotypy komórek blastycznych tej grupy białaczek nie są spotykane w prawidłowych komórkach krwiotwórczych, chociaż pojawiły się nieliczne doniesienia o występowaniu w

prawidłowych komórkach mieloidalnych markerów komórek limfoidalnych: TdT(Bradstock i wsp.1986) ,CD7(Van Dongen i wsp 1985, Kurtzberg i wsp. 1989), CD2, CD19 (Uckun i wsp.1989) a także CD7 na komórkach linii B (Grumayer i wsp. 1991),co zmieniło poglądy o istnieniu specyficzności niektórych markerów.

Diagnostyka tych przypadków stanowiących według różnych autorów od 1- 50% wszystkich ostrych białaczek oparta jest przede wszystkim o ocenę immunofenotypu komórek białaczkowych, niekiedy ich morfologię oraz ostatnio analizę dwu lub wieloparametrową w cytofluorymetrze przepływowym. Wykorzystuje się do tego celu MoP znakowane bezpośrednio różnymi fluorochromami,co umożliwia wykazanie jednoczesnej ekspresji markerów należących do dwóch różnych linii komórkowych.

Patogenezę występowania mieszanych immunofenotypów próbuje się wytłumaczyć przy użyciu 2 terminów tzw." zdrady "określonej linii komórkowej (ang. lineage infidelity) oraz tzw." przemieszania" linii komórkowych (ang. lineage promiscuity).Pierwszy z terminów sugeruje, że jednoczesna obecność markerów dwóch linii komórkowych jest związana z patologiczną ekspresją lub derepresją genu (bądź genów) w trakcie transformacji nowotworowej komórki, co znajduje potwierdzenie w badaniach cytogenetycznych (Smith i wsp. 1983, Mc. Culloch i wsp.1987). Natomiast drugi z terminów oznacza , że w prawidłowym szpiku pewne markery uznawane za "specyficzne liniowo" występują przejściowo na komórce wieloczynnościowej i we wczesnych etapach różnicowania innych linii , jeżeli więc białaczka wywodzi się z transformowanej w tym czasie(przed zdefiniowaniem linii) komórki może mieć fenotyp mieszany(Greaves i Chan 1986, Greaves i wsp.1986).

W obrębie tej grupy białaczek wyróżnia się: białaczki dwufenotypowe (w anglojęzycznym piśmiennictwie: mixed, chimeric) , w których stwierdza się jedną populację komórek wykazujących jednoczesną obecność markerów charakterystycznych dla linii mielo i limfoidalnej , dwuliniowe (dwuklonalne) - z równoczesną obecnością dwóch różnych fenotypowo populacji blastów oraz białaczki z komórek blastycznych przyporządkowanych określonej linii komórkowej wykazujących jednak dodatkowo obecność jednego z markerów należących do innej linii komórkowej (w piśmiennictwie anglojęzycznym określa się je odpowiednio: LY+AML - koekspresja markera limfoidalnego i MY+ALL- koekspresja antygeny mieloidalnego).Niektórzy autorzy nie wyróżniają podgrupy białaczek z koekspresją określając je również mianem dwufenotypowych (Perentesis i wsp.1983, Mirro i wsp. 1985, Drexler i wsp. 1986, Campos i wsp.1987, Schmitt-Graff i wsp. 1988, Del Vecchio i wsp. 1989, Kaplan i wsp. 1989, Akashi i wsp.1990, Gerhartz i Schmetzer 1990, Sulak i wsp. 1990, Drexler i wsp.1991,

Hanson i wsp. 1993). Kliniczne znaczenie dwufenotypowości komórek białaczkowych nie zostało jak dotąd ostatecznie określone (Ferrara i wsp. 1990, Pui i wsp. 1990, Ball i wsp. 1991, Drexler i wsp. 1993).

Duże rozbieżności wyników dotyczących występowania białaczek mieszanych tłumaczy się przede wszystkim brakiem jednolitej definicji i standaryzacji metod diagnostycznych (np. stosowanie MoP o różnej aktywności, przyjmowanie różnych kryteriów oceny wyników dodatnich), fałszywą ich interpretacją (np. domieszka populacji prawidłowych limfocytów w przypadku oceny w cytofluorymetrze przepływowym interpretowana jako dwufenotypowość).

Badanie immunofenotypowe pozwala także na ujawnienie zmiany (ang. switch) markerów komórek białaczkowych u chorych w okresie nawrotu po uprzednim uzyskaniu remisji np. z mieloidalnych na limfoidalne (Stass i wsp. 1984, 1986, Gagnon i wsp. 1989, Campana i wsp. 1990).

Podstawowymi metodami służącymi do oceny immunofenotypu komórek blastycznych są : immunofluorescencja oparta o znakowanie komórek w zawiesinie i ocenę fluorescencji w fazowym mikroskopie fluorescencyjnym lub przy pomocy cytofluorometrii przepływowej oraz immunocytochemia. Ocenie metodą immunocytochemiczną poddany jest preparat uzyskany z cytowirówki , przeciwciało monoklonalne znakowane jest enzymem a reakcję markeru powierzchniowego z przeciwciałem uwidacznia się wykorzystując barwną reakcję enzymu z substratem. Jako enzymów używa się peroksydazy lub kompleksu alkalicznej fosfatazy tzw. APAAP (Mason i wsp. 1975, Sandhans i wsp. 1984, Erber i wsp. 1986, Hanson i wsp. 1987) . Należy podkreślić , że zaletą metod immunocytochemicznych jest możliwość równoczesnej oceny markerów powierzchniowych i cytoplazmatycznych oraz cytomorfologii komórek (Stella-Hołowiecka i wsp. 1992). Wadami są natomiast stosunkowo skomplikowana procedura i długi czas badania (łącznie z oceną mikroskopową).

Ocena immunofenotypu w cytofluorymetrze przepływowym pozwala na szybką i obiektywną analizę zawiesiny kilku tysięcy komórek, a dane uzyskane podczas pomiarów analizowane są przez odpowiedni program komputerowy . Istotne znaczenie dla uzyskania wiarygodnych i porównywalnych wyników ma kalibracja aparatu oraz właściwe wyróżnienie analizowanej populacji komórek blastycznych. Stosowane obecnie cytofluometry przepływowe wyposażone są w elektroniczne urządzenia tzw. bramki umożliwiające oddzielenie badanych komórek na histogramie lub na obrazie złożonym ze skupień punktów (komórek rozdzielonych na podstawie ich wielkości i ziarnistości)

CEL PRACY

Celem pracy jest :

1. Określenie przydatności badania immunofenotypów blastów w diagnostyce i leczeniu chorych z ostrymi białaczkami w oparciu o materiał własny Kliniki Hematologii w Krakowie w latach 1990-1993.
2. Porównanie klasyfikacji cytomorfologicznej FAB i klasyfikacji immunofenotypowej w diagnostyce ostrych białaczek limfoidalnych i mieloidalnych.
3. Charakterystyka laboratoryjna i kliniczna ostrych białaczek o nietypowych immunofenotypach.

MATERIAŁ I METODYKA

Do analizy włączono 120 kolejnych dorosłych chorych z ostrymi białaczkami hospitalizowanych w Klinice Hematologii Akademii Medycznej, później Collegium Medicum UJ w Krakowie w latach 1990-1993. W grupie tej znalazło się 68 mężczyzn w wieku 17-75 r.ż. i 52 kobiety w wieku 15-76r.ż.

We wszystkich przypadkach były to białaczki pierwotne a rozpoznanie ustalone zostało po raz pierwszy.

Badanie cytomorfologiczne, cytochemiczne i immunofenotypowe przeprowadzone zostało u wszystkich chorych w chwili przyjęcia do Kliniki przed wprowadzeniem leczenia antyproliferacyjnego.

Materiałem badanym był szpik chorego, a w 3 przypadkach krew obwodowa zawierająca nie mniej niż 80% komórek blastycznych, pobrane rutynowo celem ustalenia rozpoznania.

Szpik kostny pobierano z talerza kości biodrowej typową igłą punkcyjną w objętości 5ml i natychmiast po pobraniu wstrzykiwano do probówki szklanej z 0,9% NaCl i heparyną i dokładnie mieszano wstrząsając. Otrzymaną zawiesinę szpiku nawarstwiano ostrożnie na Lymphoprep (Nyegaard and Co AS Oslo) i wirowano przez 30 min przy 1500obr/sek. Zawiesinę komórek znajdujących się w interfazie aspirowano pipetą i przemywano w PBS (buforowana sól fizjologiczna) o pH = 7.35. Otrzymaną po odciążeniu supernatantu zawiesinę komórek rozdzielano w ilości 50µl do szeregu oznaczonych probówek, zawierających z wyjątkiem pierwszej kontrolnej kolejne przeciwciała monoklonalne dla linii szpikowej i limfoidalnej (zestaw ujęty w tabeli 1a). Inkubację zawiesiny komórek z przeciwciałami monoklonalnymi prowadzono w temp. 4 st. C przez 30 min, a następnie przemywano dwukrotnie w PBS i wirowano. Po odciążeniu supernatantu do kolejnych probówek dodawano surowicę króliczą zawierającą przeciwciała dla mysich immunoglobulin IgG znakowane fluoresceiną (Dakopatts, F 313) w objętości 20µl, ponownie inkubowano w temp. 4st. C przez 30min, a następnie przemywano dwukrotnie w PBS i wirowano. Otrzymaną po odciążeniu supernatantu zawiesinę komórek rozcieńczano w PBS (0,25ml) i analizowano w cytofluorymetrze przepływowym FACScan firmy Becton Dickinson (oprogramowanie komputerowe firmy Becton Dickinson). Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina komórek z przeciwciałami dla mysich immunoglobulin znakowanych fluoresceiną.

Analizę cytofluorymetryczną rozpoczynano od wydzielenia elektroniczną bramką (Paint -A- Gate software Becton Dickinson) populacji (chmury) komórek blastycznych widocznych na wykresie analizy dwuparametrycznej przedstawiającej rozkład komórek uwzględniający ich wielkość i ziarnistość (charakterystyka FSC- forward scatter, SSC- side scatter). Możliwość nieprecyzyjnego ustawienia bramki eliminował fakt wysokiego odsetka komórek blastycznych w analizowanym materiale. Na kolejnych histogramach oceniano odsetek komórek wykazujących ekspresję danych markerów powierzchniowych. Każdorazowo analizowano od 5000-10000 komórek. Komórki, wybarwione metodą immunofluorescencji pośredniej, wykazywały intensywność fluorescencji wyższą niż próbka kontrolna w przypadku obecności danego markera. Za dodatni wynik przyjmowano wartość 20 % komórek blastycznych wykazujących fluorescencję wyższą niż kontrola.

Kryteria rozpoznawania nietypowych immunofenotypów

Fenotyp komórek blastycznych określano jako wykazujący koekspresję My + ALL lub Ly +AML w przypadku gdy na histogramie widoczna była jedna chmura blastów, na których wykazano następnie ekspresję markerów pozwalających określić ich przynależność liniową oraz dodatkowo ekspresję jednego markera specyficznego dla innej linii komórkowej, przy czym sumaryczny odsetek komórek wykazujących te markery był wyższy niż 100%. W przypadku niższej ekspresji poszczególnych markerów (sumaryczny odsetek < 100%) istnienie koekspresji potwierdzano przy pomocy przeciwciał znakowanych bezpośrednio dwoma różnymi fluorochromami (fikoerytryna i fluoresceina), a analizę przeprowadzano przy pomocy programu komputerowego pozwalającego na interpretację barwną. Dwufenotypowość rozpoznawano w przypadku ekspresji na tych samych komórkach markerów charakterystycznych zarówno dla szeregu limfo- jak i mieloidalnego.

Dwuklonalność rozpoznawano w przypadku istnienia dwóch dających się wydzielić bramkami chmur komórek, analizowanych oddzielnie i wykazujących dwa różne immunofenotypy.

Analizę przy użyciu cytofluorymetru przepływowego wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Collegium Medicum UJ w Krakowie.

Kierownik Zakładu : Prof. dr hab. med. Marek Zembala

Tabela 1a

Zestawienie stosowanych przeciwciał monoklonalnych

Klasa	Kod	Producent	Opis
HLA-DR	BMA021	Behringwerke	MHC II klasa
CD 34	BMA050	Behringwerke	komórka stem
CD9	LAAp24	Heintel	prekursor linii limfoidalnej
CD 33	Anti-Leu-M9	Becton Dickinson	mieloblast - metamielocyt
CDw65	BMA0210	Behringwerke	promielocyt-granulocyt, monocyt
CD14	BMA 0211	Behringwerke	monocyty , makrofagi
CD 11c	Anti-Leu-5	Becton Dickinson	monocyty, makrofagi
CD 19	BMA 0130	Behringwerke	pan -B
CD22	BMA 0131	Behringwerke	dojrzałe limfocyty B
CD10	BMA 0150	Behringwerke	antygen common -ALL
	Anti-slg	Becton Dickinson	powierzchniowe Ig
	Anti-Kappa	Becton Dickinson	łańcuchy lekkie kappa
	Anti-Lambda	Becton Dickinson	łańcuchy lekkie lambda
CD2	BMA 0111	Behringwerke	pan-T
CD3	BMA 030	Behringwerke	dojrzałe limfocyty T
CD7	BMA 0112	Behringwerke	pan - T
CD4	BMA041	Behringwerke	limfocyty T pomocnicze
CD8	BMA081	Behringwerke	limfocyty T supresorowe
	Glicophorin A	Behringwerke	szereg erytoblastyczny
CDw41	D.Gp IIb IIIa	Dako	płytki, megakarioblasty

Kryteria klasyfikacji immunofenotypowej białaczek w oparciu o zastosowany zestaw przeciwciał monoklonalnych:

AUL- (acute undifferentiated leukemia) -ostra białaczka niezróżnicowanokomórkowa

Ekspresja markerów : HLA-DR i/ lub CD 34

ALL - (acute lymphoblastic leukemia) -ostra białaczka limfoblastyczna

Szereg ontogenetyczny limfocyta B:

podtyp:	ekspresja markerów
null - ALL	HLA-DR, CD9
pro B- ALL	HLA-DR, CD9, CD19
common- ALL	HLA-DR, CD19, CD 10,
pre B- ALL	HLA-DR, CD 19, CD 22
B - ALL	HLA-DR , CD19, CD22, powierzchniowe Ig G, IgA, IgM , kappa, lambda

Szereg ontogenetyczny limfocyta T:

pre T-ALL	CD7, CD2,
T-ALL	CD7, CD2, CD3 , CD4 lub CD8

AML-(acute myeloblastic leukemia) - ostra białaczka mieloblastyczna

typ mieloblastyczny	HLA-DR, CD34, CD 33, CDw65
typ promielocytowy	HLA-DR, CD34, CD33, CDw65
typ mielomonoblastyczny	HLA-DR, CD 34, CD33, CDw65 CD 11c, CD 14
typ erytroblastyczny	obecność glikoforyny A (Gcph A)
typ megakarioblastyczny	obecność CDw41

Typ promielocytowy (wg FAB-M3)i monocytowy (wg FAB -M5) rozpoznawano w oparciu o bardzo wysokie ekspresje odpowiednio CDw65 oraz CD14 lub CD11c.

Nie wyróżniano typu AML-MO z uwagi na brak możliwości oznaczania MPO w komórkach blastycznych w mikroskopie elektronowym ani też metodami immunocytochemicznymi..

Ocena cytomorfologiczna i cytochemiczna

Preparaty do oceny cytomorfologicznej w mikroskopie optycznym barwiono metodą May- Grönwalda - Giemsa. Na podstawie morfologii komórek szpiku i mielogramu ustalano rozpoznanie zgodnie z kryteriami klasyfikacji ostrych białaczek FAB (1985).

Badania cytochemiczne obejmowały w każdym przypadku :

- oznaczenie aktywności peroksydazowej / POX/ wg Grahama-Knolla
 - barwienie polisacharydów metodą PAS wg. Mc Manusa
 - badanie aktywności esterazy nieswoistej alfa-naftyli wg Wachsteina -Wolfa
- Wyniki podawano w % komórek blastycznych wykazujących dodatnią reakcję cytochemiczną (drobnoziarnistą, gruboziarnistą i blokową).

Cykle chemioterapii stosowane w indukcji remisji (AML-63, ALL-23 chorych):

W grupie 55 chorych z AML zastosowano cykl 3+7 ,3+10 (adriblastyna 45mg/m² przez 3 dni, cytosar 100mg/m² przez 7 lub 10 dni, w typach mielomonoblastycznym i monoblastycznym dodatkowo vepesid 100mg/m²), u 8 chorych HiCOAP (1dz. vincrystyna 1,6mg/m² przez 5 dni cyclophosphamid 350mg/m² i cytosar 100mg/m² co 12 h oraz encorton 60mg/m²). W II indukcji stosowano cykl 3+7(10), HiCOAP , lub Mitoxantron 12mg/m² przez 3 dni i cytosar 100mg/m² przez 5 lub 6 dni.

Chorzy z ALL(37 pacjentów) otrzymywali w indukcji w dniach 1,8,15, 22 vincrystynę 2mg/dobę i adriblastynę 45mg/m², encorton 60mg/m² przez 28 dni , oraz L-asparaginazę 10tys.j w dniach 15,19,22,26,29. Chorzy z podtypem preT otrzymywali : 1-3 dnia adriblastynę 45mg/m² 1-5 dnia cytosar 100mg/m², w dniach 1,8,15,22 vincrystynę 2mg/dobę, encorton 60mg/dobę przez 28 dni. W II indukcjiu chorych z ALL powtarzano powyższe leczenie.

Analiza statystyczna

Istotność statystyczną dla porównania średnich pomiędzy grupami obliczano według testu t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych. W tabelach stosowano dla średnich arytmetycznych oznaczenie $\bar{x}$, dla odchylenia standardowego STD, dla liczby chorych N lub n. Istotność prognostyczną obecności lub braku poszczególnych markerów oceniano wykorzystując test nieparametryczny Chi-kwadrat. Obliczenia prawdopodobieństwa przeżycia dokonano w oparciu o metodę tablic Kaplana - Meiera . Czas przeżycia oznaczał okres od momentu rozpoznania ostrej białaczki do zgonu pozostającego w związku z białaczką, a w przypadku chorych żyjących (5 chorych) przyjmowano za cenzurę aktualny czas przeżycia. Porównania krzywych przeżywalności dokonano w oparciu o test log rank z poprawką Yate'sa.

WYNIKI

Określono immunofenotypy komórek blastycznych 120 kolejnych dorosłych chorych przyjmowanych do Kliniki Hematologii w Krakowie z rejonu Polski południowo-wschodniej.

Ostre białaczki pochodzące z układu mieloidalnego stwierdzono u 75 (62,%) chorych, z układu limfoidalnego u 39 (32,5%) chorych. Badanie cytochemiczne i immunofenotypowe nie pozwoliło na precyzyjne ustalenie typu ostrej białaczki w 4 (3,3%) przypadkach, które zakwalifikowano do grupy białaczek nieodróżnicowano-komórkowych (AUL). W dwóch przypadkach stwierdzono białaczki z fenotypem mieszanym, nie pozwalające na zaliczenie ich do jednej z wyżej wymienionych grup. Jednym z nich była białaczka dwufenotypowa mielo- limfoblastyczna (AML/ ALL-B), drugim białaczka dwuklonalna (AML+ AUL), z jednoczesną (synchroniczną) proliferacją komórek mieloblastycznych i nieodróżnicowanych. Zostały one włączone do zestawienia białaczek o nietypowych fenotypach blastów.

Średnie wieku chorych w poszczególnych grupach były zbliżone i wynosiły odpowiednio: u chorych z AML - 42 l., w grupie ALL - 39,2 l. i w grupie AUL - 44,5 l. Stosunek ilości kobiet i mężczyzn w badanych grupach był podobny.

I Charakterystyka immunofenotypowa blastów w grupach chorych z ostrymi białaczkami limfoidalnymi i mieloidalnymi.

Analizowano występowanie poszczególnych markerów powierzchniowych w immunofenotypach blastów w grupach chorych z ostrymi białaczkami limfoidalnymi ALL (N= 39) i mieloidalnymi AML (N=75). Obliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe dla odsetka blastów wykazujących ekspresję poszczególnych markerów powierzchniowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 1 i na rycinie 1.

W grupie chorych z AUL (N=4) blasty wykazywały jedynie obecność markerów: HLA-DR - średnio 58% (STD 66 %) oraz CD34 - średnio 27,5 % (STD 25%), ekspresję pozostałych markerów CD stwierdzono na mniej niż 1% blastów.

RYC.1

Ekspresja poszczególnych markerów powierzchniowych w

immunofenotypach blastów w grupach chorych z AML i ALL

AML N = 75
ALL N = 39

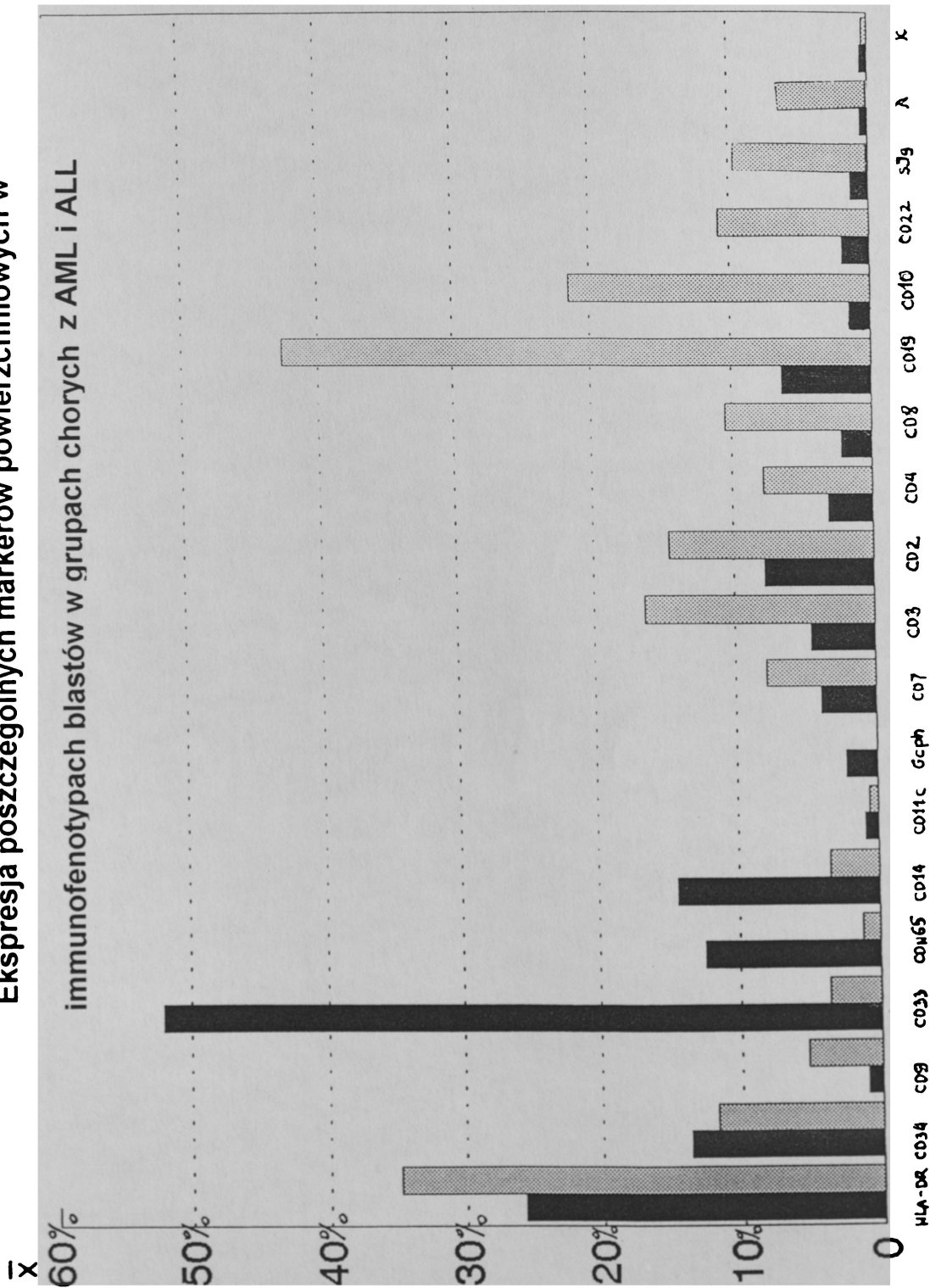


Tabela 1

Ekspresja poszczególnych markerów powierzchniowych
blastów w grupach chorych z AML i ALL

MARKER	ALL n=39 $\bar{X}$ %	STD	AML n=75 $\bar{X}$ %	STD
HLADR	34.7	29.2	25.7	22.7
CD34	11.8	21.5	13.7	20.4
CD9	5.3	18.7	1.0	4.4
CD7	8.7	18.0	4.1	8.0
CD3	16.4	20.1	4.6	6.8
CD2	14.6	19.4	7.8	9.8
CD4	7.8	13.1	3.2	5.7
CD8	10.5	21.9	2.2	3.6
CD19	42.8	31.8	6.4	10.4
CD10	21.5	42.0	1.5	3.2
CD22	10.8	22.0	2.0	5.8
SIg	8.8	2.7	1.3	2.8
lambda	5.8	11.6	0.5	1.6
kappa	0.4	1.1	0.5	1.5
CD33	3.7	8.3	52.0	30.5
CDw65	1.2	3.9	12.5	19.4
CD14	3.5	6.0	14.4	19.3
CD11c	0.6	1.4	0.9	9.3
Gcph	0.03	0.2	2.2	9.4

Najwyższe średnie ekspresje markerów zaznaczono pogrubioną kreską.

II Porównanie klasyfikacji immunofenotypowej ostrych białaczek z ich podziałem według FAB.

W tabeli 2 zestawiono grupy chorych z AML (75), ALL (39) oraz AUL (4) klasyfikowane na podstawie immunofenotypów komórek blastycznych z oceną ich typu według kryteriów FAB. W tabeli 3 przedstawiono 15 przypadków, w których wstępne rozpoznanie ustalone w oparciu o klasyfikację FAB zostało zweryfikowane po przeprowadzeniu badania immunofenotypów komórek blastycznych. Analizowano ekspresję markerów powierzchniowych w grupach chorych z określonymi wg FAB podtypami. Tabele 4 i 5 przedstawiają wyniki: średni odsetek blastów wykazujących ekspresję danych markerów powierzchniowych w grupach chorych z AML M1-M6 oraz ALL L1- L3.

Tabela 2

Zestawienie podtypów immunofenotypowych ostrych białaczek mieloblastycznych (AML) w grupie 75 chorych, ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL) w grupie 39 chorych i białaczki niezróżnicowanokomórkowej (AUL) w grupie 4 chorych z ich klasyfikacją wg FAB.

AML **N = 75** **(%)**
F A B

podtyp immunofenotypowy	N	M1	M2	M3	M4	M5	M6	L1
mieloblastyczny	44	25(57)	18(41)	0	1(2)	0	0	0
promielocytowy	0	0	0	0	0	0	0	0
mielomonoblastyczny	25	3(12)	1(4)	0	20(80)	0	0	1 (4)
monoblastyczny	1	0	0	0	0	1(100)	0	0
erytroblastyczny	5	0	0	0	0	0	5(100)	0
megakarioblastyczny	0	0	0	0	0	0	0	0

ALL **N = 39** **(%)**

podtyp immunofenotypowy	N	L1	L2	L3
pro - B i null	3	2 (66,6)	1 (34,6)	0
common	11	10(90,9)	1(9,1)	0
pre- B	3	0	3(100)	0
B	12	4(33,3)	6(50)	2 (16,7)
pre -T	2	2(100)	0	0
T	8	8 (100)	0	0

AUL **N=4** **(%)**

	N	typ M1	wg FAB L1
białaczka niezróżnicowano-komórkowa (HLA-DR+, CD34+)	4	2 (50)	2 (50)

Tabela 3

Zestawienie 15 przypadków weryfikacji w oparciu o badanie immunofenotypowe rozpoznania ustalonego wg FAB:

N	typ wg FAB	cytochemia	podtyp immunofenotypowy
3	M1	POX (+) Esteraza (-)	mielomonoblastyczny
3	M1	POX (+) Esteraza (-)	mielomonoblastyczny z koekspresją CD2
1	M1	POX (-) PAS(-) Esteraza (-)	białaczka dwuklonalna AML + AUL
1	M1	POX (+) PAS (-)	białaczka dwufenotypowa AML/ ALL B
1	M2	POX(+) Esteraza (-)	mielomonoblastyczny
1	M4	POX (+) Esteraza(-)	mieloblastyczny
2	M 1	POX (-) PAS(-)	A UL
2	L1	POX(-) PAS(-)	AUL
1	L1	POX(-) PAS dyfuzyjna	mielomonoblastyczna z koekspresją CD19

Tabela 4

Ekspresja markerów powierzchniowych w poszczególnych
typach FAB w grupach chorych z AML

MARKER	$\bar{x}\%$ AML-1 n=28	$\bar{x}\%$ AML-2 n=19	$\bar{x}\%$ AML-4 n=21	$\bar{x}\%$ AML-5 n=1	$\bar{x}\%$ AML-6 n=5
HLADR	20.4	22.6	43.3	28.5	28.9
CD34	16.3	10.5	11.5	0.0	0.5
CD9	2.9	0.2	0.0	0.0	0.0
CD7	1.2	5.7	3.0	0.0	4.8
CD3	6.2	3.1	4.3	0.0	0.0
CD2	9.0	5.0	7.7	9.3	8.8
CD4	4.4	2.0	1.9	0.0	4.3
CD8	2.4	1.7	2.1	0.0	5.6
CD19	9.4	2.9	7.0	6.4	8.2
CD10	3.1	2.4	6.1	0.0	0.0
CD22	4.7	0.1	1.2	0.0	0.0
SIg	1.6	2.9	0.9	0.0	0.0
lambda	0.7	0.3	0.4	0.0	0.0
kappa	0.8	0.3	0.2	0.0	0.0
CD33	49.6	49.3	53.7	95.5	16.2
CDw65	9.4	16.5	14.7	15.6	10.8
CD14	6.9	13.0	30.0	93.4	12.0
CD11c	1.7	0.2	0.0	16.5	0.0
Gcph	3.2	0.1	0.3	0.0	27.7

Najwyższe średnie ekspresje markerów zaznaczono pogrubioną kreską.

Tabela 5

Ekspresja markerów powierzchniowych w poszczególnych typach FAB w grupach chorych z ALL

	$\bar{x} \%$	$\bar{x} \%$	$\bar{x} \%$
MARKER	ALL-1 n=26	ALL-2 n=11	ALL-3 n=2
HLADR	28.8	44.2	17.5
CD34	13.1	18.4	0.4
CD9	1.7	17.2	0.0
CD7	10.2	3.8	0.0
CD3	17.2	11.1	4.1
CD2	13.5	14.5	6.5
CD4	8.0	6.6	1.5
CD8	12.3	3.3	1.8
CD19	36.0	44.4	79.1
CD10	24.2	18.2	23.6
CD22	7.7	25.4	62.8
SIg	1.4	0.7	23.1
lambda	2.8	11.1	40.1
kappa	0.5	0.3	0.6
CD33	7.0	1.0	15.9
CDw65	2.2	0.2	0.3
CD14	5.8	2.8	0.2
CD11c	0.5	0.7	0.2
Gcph	0.1	0.0	0.0

Najwyższe średnie ekspresje markerów zaznaczono pogrubioną kreską.

III Ekspresja markerów powierzchniowych w grupach chorych z ALL według klasyfikacji immunofenotypowej (tabela 6).

Tabela 6

Ekspresja markerów powierzchniowych w podtypach immunofenotypowych w grupie chorych z ALL N=39

MARKER	ALL proB (+null) n=3 $\bar{X}$ %	ALL common n=11 $\bar{X}$ %	ALL preB n=3 $\bar{X}$ %	ALL B n=12 $\bar{X}$ %	ALL preT n=2 $\bar{X}$ %	ALL T n=8 $\bar{X}$ %
HLADR	53.4	31.4	58.3	44.6	2.1	16.9
CD34	0.0	11.0	0.0	19.6	1.8	12.8
CD9	45.0	0.0	21.6	7.5	0.0	0.9
CD7	1.0	1.9	0.0	4.9	67.6	15.1
CD3	16.2	9.5	0.0	15.4	4.8	31.6
CD2	12.7	4.4	6.6	18.4	35.3	26.3
CD4	8.9	2.6	7.6	4.6	12.4	31.0
CD8	3.5	2.9	1.1	8.0	8.8	41.1
CD19	23.0	61.1	42.0	59.9	18.0	18.2
CD10	0.0	72.2	8.2	4.5	0.0	0.0
CD22	0.0	2.2	0.9	30.4	2.6	2.9
SIg	0.0	0.8	0.0	26.5	2.1	2.1
lambda	0.0	0.3	0.5	16.0	0.0	1.4
kappa	0.0	0.4	0.9	0.2	0.0	1.0
CD33	5.8	3.0	0.1	3.5	1.3	6.2
CDw65	0.0	0.5	0.0	1.5	0.3	2.9
CD14	3.2	4.6	0.0	2.2	0.0	6.4
CD11c	0.0	0.7	0.0	1.1	0.0	0.1
Gcph	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

Najwyższe średnie ekspresje markerów zaznaczono pogrubioną kreską.

IV Korelacja obecności lub braku danych markerów powierzchniowych w immunofenotypach blastów chorych z AML i ALL z wstępnymi wartościami morfologii krwi, aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy, odsetkiem całkowitych remisji hematologicznych oraz czasem przeżycia.

Analizowano jedynie chorych z typowymi immunofenotypami blastów, którzy otrzymali pełne leczenie indukujące remisję hematologiczną. Grupa chorych z AML liczyła 42 chorych, grupa chorych z ALL- 23 chorych. Obecność markera oznacza przyjętą w ocenie wartość powyżej 20% blastów dodatnich. Dla każdej z grup oznaczonych HLA-DR lub CD / + / (obecność markera) i / - / (jego brak) obliczono : średnie wartości leukocytozy ($L \times 10^9/l$), hemoglobiny ($Hb \text{ mmol/l}$), płytek krwi ($Pt \times 10^9/l$), aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi ($LDH \text{ U/l}$) oznaczonych u chorych w chwili rozpoznania oraz liczbę i odsetek chorych, którzy uzyskali całkowitą remisję hematologiczną (% CR). Podano także liczbę chorych bez remisji (NR). Wyniki w grupie chorych z AML przedstawiono w tabelach 7,8, w grupie chorych z ALL w tabelach 9,10. Prawdopodobieństwo czasu przeżycia w zależności od występowania lub braku poszczególnych markerów przedstawiają krzywe Kaplana-Meiera : na kolejnych rycinach 2, 2a, 2b - dla chorych z AML, na rycinach 3, 3a, 3b, 3c- dla chorych z ALL.

Tabela 7

Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów w typowych immunofenotypach blastów leczonych chorych z AML z wstępnymi wartościami morfologii / L, Hb, Pt / i aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi

AML	N	$\bar{L} \times 10^9/L$	$\bar{Hb} \text{ mmol/L}$	$\bar{Pt} \times 10^9/L$	$\bar{LDH} \text{ U/L}$
HLADR+	18	54.6	6.86	47.56	647
HLADR-	24	42.7	7.43	29.79	475
CD34+	9	36.8	7.28	25.67	596
CD34-	33	50.8	7.16	40.60	535
CD33+	35	51.0	7.33	40.40	568
CD33-	7	38.8	6.47	22.20	451
CDw65+	10	41.5	7.64	72.50 *	665
CDw65-	32	49.8	7.05	26.44	512
CD14+	9	23.9 **	6.68	34.30	460
CD14-	33	54.3	7.32	38.30	572
CD11c+	1	43.0	7.20	27.00	508
CD11c-	41	47.9	7.19	37.60	549

* - $p < 0.05$

** - $p < 0.01$

*** - $p < 0.001$

Tabela 8

Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów w typowych immunofenotypach blastów z odsetkiem uzyskanych remisji całkowitych w grupie leczonych chorych z AML.

AML	N	bez rm.-NR	remisja-CR	% remisji	chi2
HLADR+	18	16	2	11.1	1.0
HLADR-	24	22	2	8.3	
CD34+	9	8	1	11.1	1.0
CD34-	33	30	3	9.1	
CD33+	35	31	4	11.4	0.81
CD33-	7	7	0	0.0	
CDw65+	10	10	0	0.0	0.58
CDw65-	32	28	4	12.5	
CD14+	9	9	0	0.0	0.65
CD14-	33	29	4	12.1	
CD11c+	1	1	0	0.0	1.00
CD11c-	41	37	4	9.8	

Tabela 9

Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów CD w typowych immunofenotypach blastów leczonych chorych z ALL z wstępnymi wartościami morfologii / L, Hb, Pt / i aktywnością dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi

		$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
ALL	N	L $\times 10^9/L$	Hb mmol/L	Pt $\times 10^9/L$	LDH U/L
CD34+	7	23.4	8.24	33.8	558
CD34-	16	48.8	7.87	28.4	402
CD9+	3	2.47 ***	6.67	57.3	316
CD9-	20	46.84	8.10	26.0	469
CD2+	9	57.9	7.90	15.8	322
CD2-	14	30.2	7.92	39.2	531
CD3+	5	69.8	8.44	30.6	299
CD3-	18	33.1	7.76	29.9	491
CD7+	3	64.5	8.96	59.0	655
CD7-	20	37.5	7.75	26.2	418
CD19+	15	39.0	7.79	23.4	400
CD19-	8	44.9	8.13	42.6	541
CD10+	6	14.0	7.78	28.2	665
CD10-	17	50.6	7.95	30.8	372
CD22+	7	45.2	8.04	20.8	398
CD22-	16	39.2	7.85	34.1	471

*** $p < 0.001$

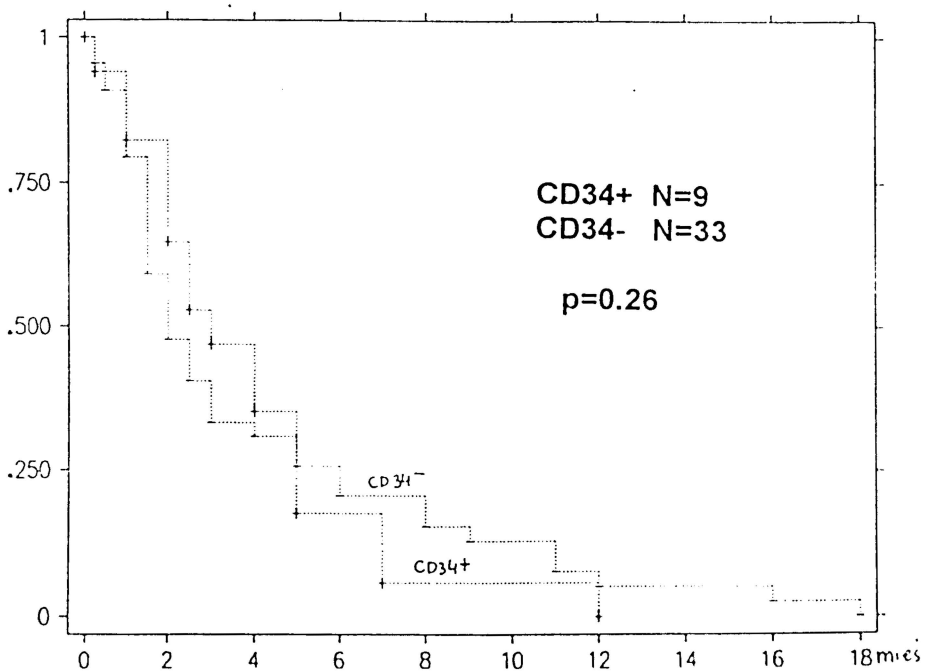
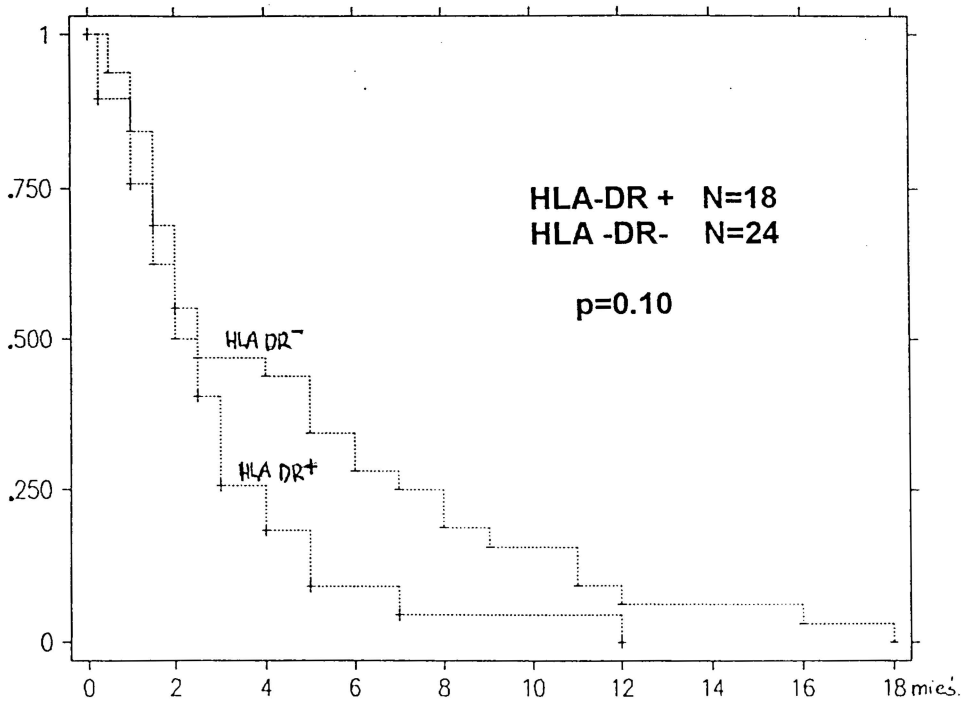
Tabela 10

Korelacja występowania lub braku poszczególnych markerów CD w typowych immunofenotypach blastów z odsetkiem uzyskanych remisji całkowitych w grupie leczonych chorych z ALL

ALL	N	bez rm.-NR	remisja-CR	% remisji	chi2
CD34+	7	4	3	42.9	0.72
CD34-	16	12	4	25.0	
CD9+	3	2	1	33.3	1.00
CD9-	20	14	6	30.0	
CD2+	9	8	1	11.1	0.25
CD2-	14	8	6	42.9	
CD3+	5	4	1	20.0	0.98
CD3-	18	12	6	33.3	
CD7+	3	2	1	33.3	1.00
CD7-	20	14	6	30.0	
CD19+	15	12	3	20.0	0.31
CD19-	8	4	4	50.0	
CD10+	6	3	3	50.0	0.48
CD10-	17	13	4	23.5	
CD22+	7	5	2	28.6	1.00
CD22-	16	11	5	31.3	

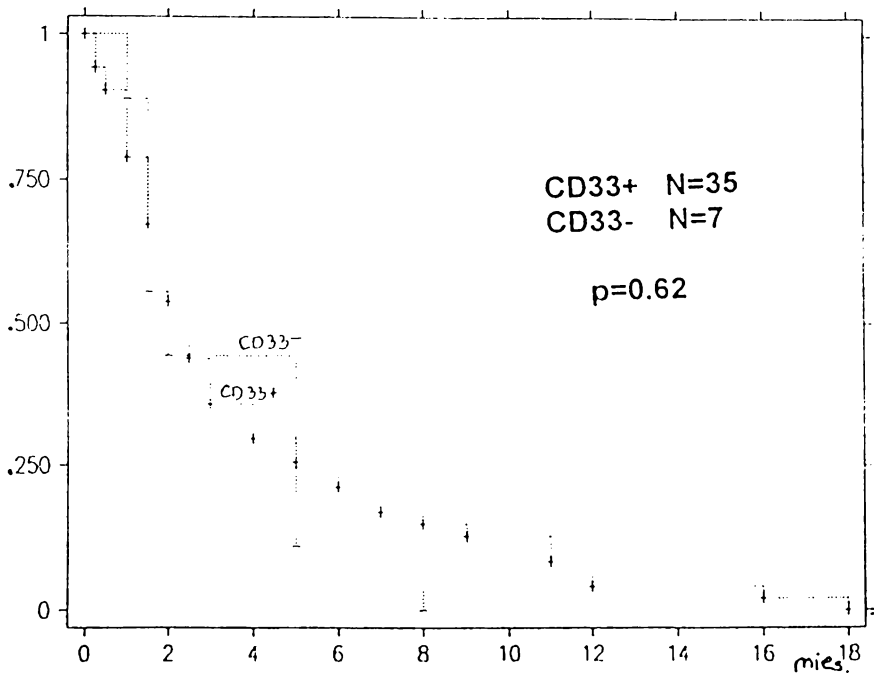
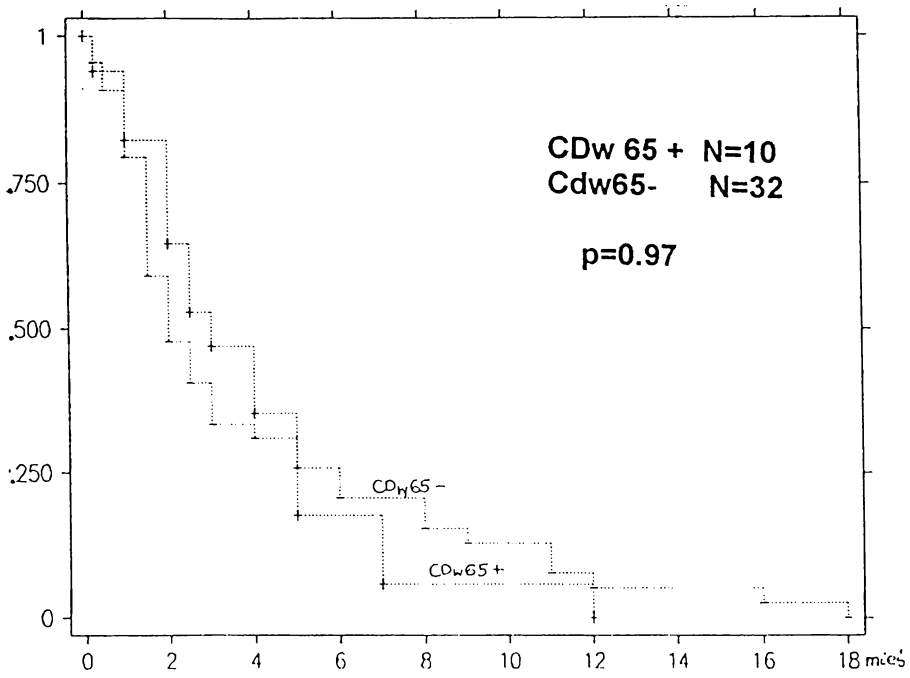
RYC.2

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z AML / p- wg log rank test/.



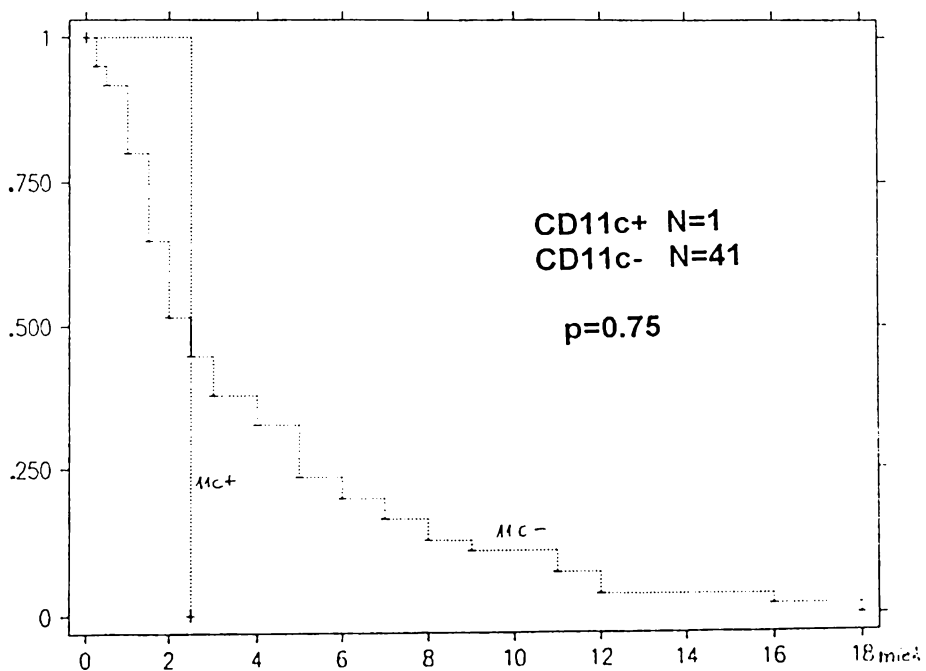
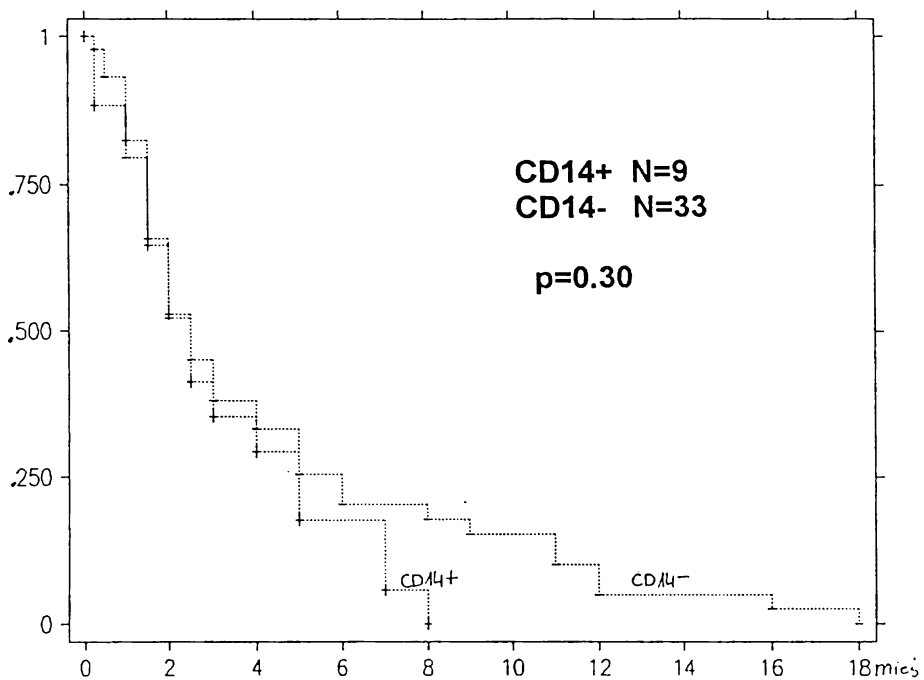
RYC. 2a

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z AML / p - wg log rank test/.



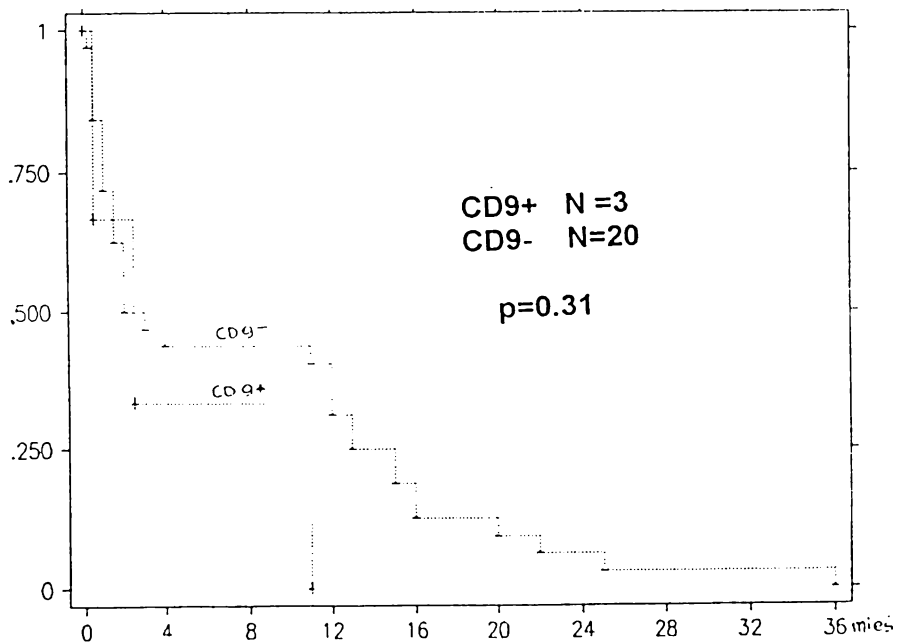
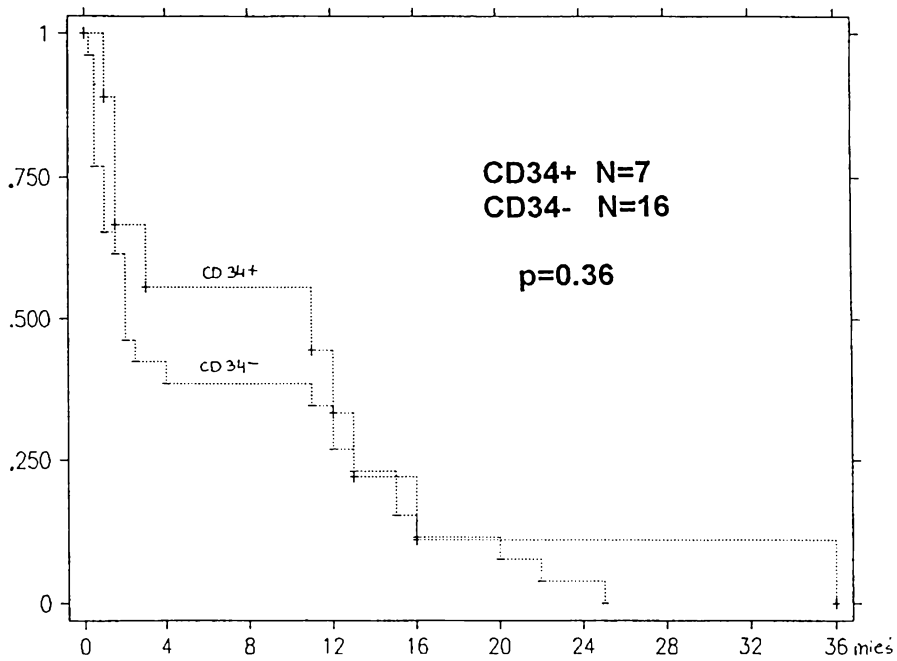
RYC. 2b

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z AML / p- wg log rank test/



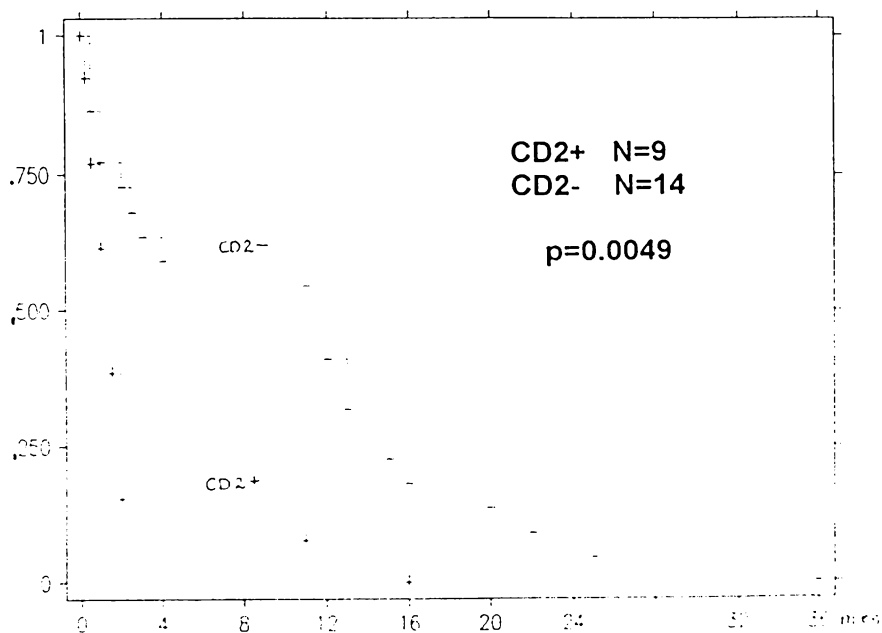
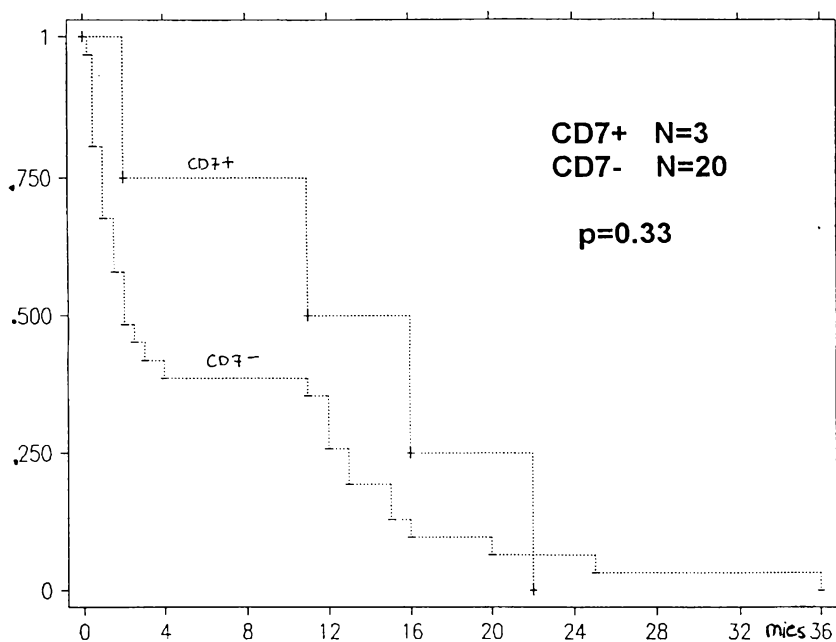
RYC. 3

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z ALL / p- wg testu log rank/



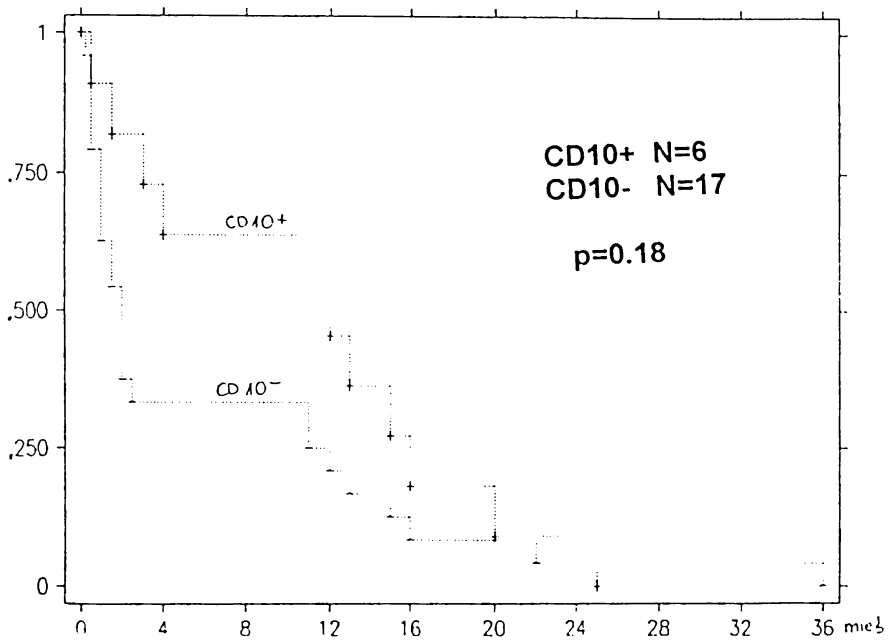
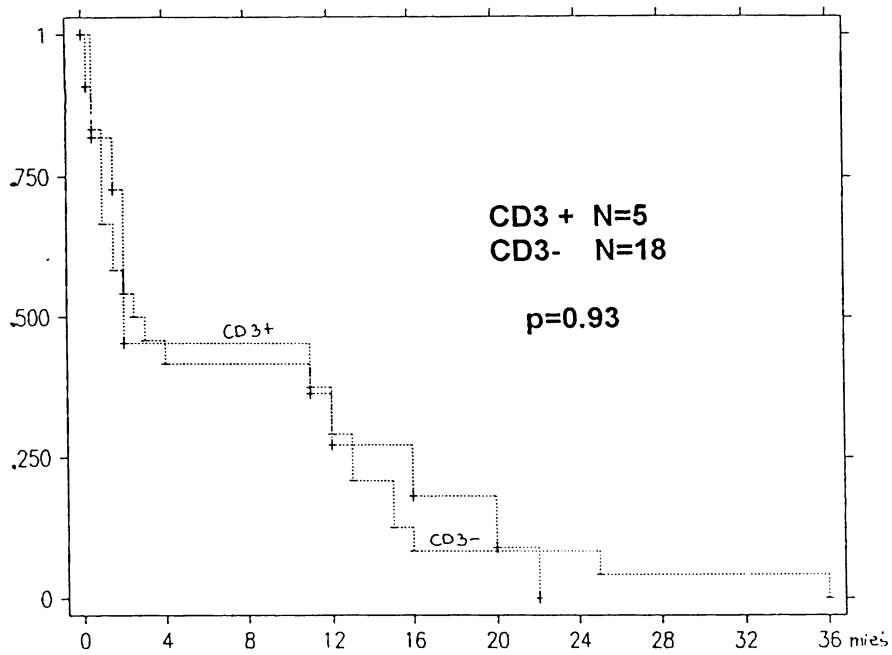
RYC. 3a

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z ALL / p- podano wg log rank test/



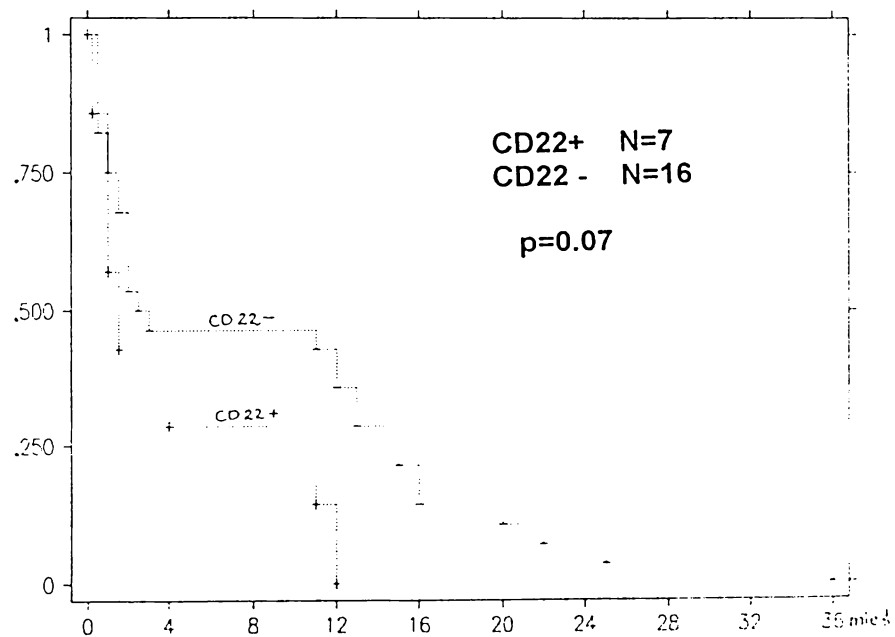
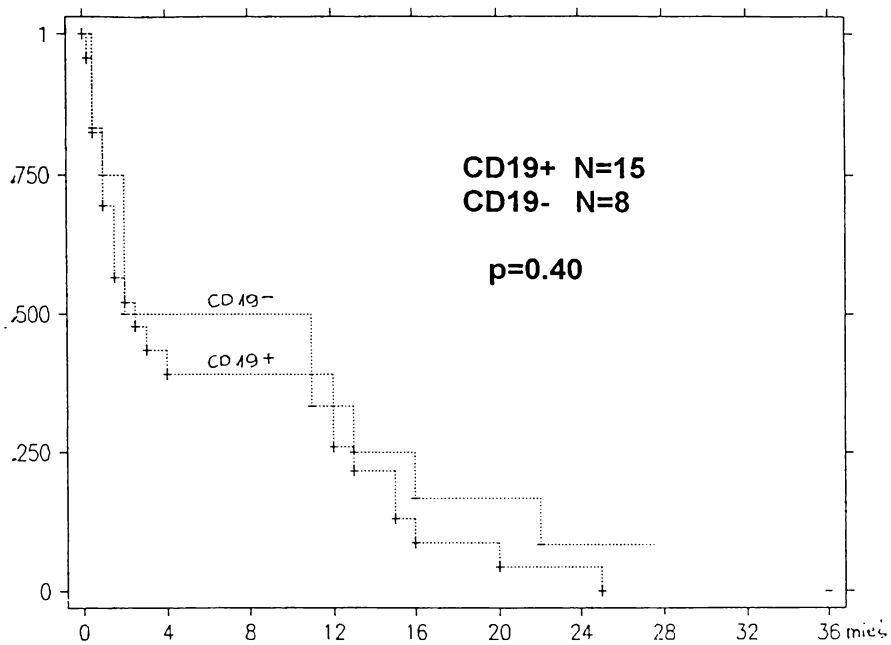
RYC. 3b

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z ALL / p- podano wg log rank test/



RYC. 3 c

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia
w zależności od obecności lub braku poszczególnych
markerów CD w typowych immunofenotypach
leczonych chorych z ALL / p-podano wg testu log rank/.



V Porównanie parametrów laboratoryjnych i charakterystyki klinicznej w grupach chorych z ostrymi białaczkami o nietypowych i typowych immunofenotypach komórek blastycznych.

W tabeli 11 przedstawiono 37 przypadków chorych z nietypowymi immunofenotypami blastów : ich podtypy według oceny immunofenotypowej oraz według klasyfikacji FAB. W tabelach 12 i 13 porównano parametry laboratoryjne i kliniczne dotyczące leczonych chorych z typowymi immunofenotypami (42 z AML i 23 z ALL) i leczonych chorych wykazujących nietypowe immunofenotypy (21 z AML i 14 z ALL) z wyłączeniem 2 przypadków (białaczki dwufenotypowej i dwuklonalnej). Porównanie dotyczy ustalonych w momencie rozpoznania średnich wartości : erytrocytów , leukocytów i płytek krwi, odsetka komórek blastycznych w krwi obwodowej (leukogramie) i szpiku, aktywności LDH i poziomu albumin w surowicy , rozległości skazy krwotocznej (podanej według skali WHO), liczby cykli chemioterapii koniecznych do uzyskania całkowitej lub częściowej remisji hematologicznej, oraz średnich i median czasów przeżycia. U chorych z ALL oceniono także odsetek chorych z zajęciem śródpiersia i centralnego systemu nerwowego (CSN).

Wszyscy chorzy z nietypowymi immunofenotypami blastów zmarli, w grupie chorych z typowymi immunofenotypami żyje 4 chorych z AML i 1 z ALL- przyjęto dla nich aktualny czas przeżycia . Na rycinie 4 przedstawiono krzywe prawdopodobieństwa czasów przeżycia w grupach chorych z AML o typowych i nietypowych immunofenotypach, na rycinie 5 w odpowiednich grupach chorych z ALL wraz z wartością testu log rank (wartość p)

Tabela 11

Zestawienie 37 przypadków chorych z ostrymi białaczkami o nietypowych fenotypach blastów : klasyfikacja immunofenotypowa i wg FAB :

immunofenotyp	N	Ekspresja dodatkowego markera CD x %	podtyp immunofenotypowy	N	FAB	N
ALL HLA-DR/ -/	8	brak	common-ALL B-ALL	6 2	L1 L2	6 2
ALL-T +CD19	4	22 %	pre T-ALL T- ALL	1 3	L1	4
ALL+CD33	2	30,9%	T- ALL common -ALL	1 1	L1	2
AML+ CD19	10	28,9%	mieloblastyczny mielomonoblastyczny	6 4	M1 M4 L1	6 3 1
AML+CD2	8	29,3%	mieloblastyczny mielomonoblastyczny erytoblastyczny	2 5 1	M1 M4 M1 M6	2 2 3 1
AML+ CD7	3	55,3%	mieloblastyczny mielomonoblastyczny	2 1	M1 M4	2 1
AML+ AUL HLA-DR,CD34 + HLADR,CD34,CD33	1		białaczka dwuklonalna mieloblastyczna + niezróżnicowanokomórkowa	1	M1	1
AML / ALL B CD34,CD33/ CD19,CD22	1		białaczka dwufenotypowa mieloblastyczna/ limfo- blastyczna B-komórkowa	1	M1	1

Tabela 12

Porównanie charakterystyki laboratoryjnej i klinicznej
w grupach chorych z AML o typowych i nietypowych
immunofenotypach blastów

Charakterystyka laboratoryjna i kliniczna.	AML typowe n=42 $\bar{X}$	AML+CD2 n=8 $\bar{X}$	AML+CD7 n=3 $\bar{X}$	AML +CD19 n=10 $\bar{X}$
Erytrocyty $\times 10^{12}/l$	3.2	3.2	2.5	3.0
Leukocytoza $\times 10^9/l$	60.9	63.2	21.7	65.6
Płytki krwi $\times 10^9/l$	35.5	74.4	57.3	36.3
% blastów w leukogramie	55.5	57.5	83.3*	62.0
% blastów w szpiku	86.5	88.8	93.3	89.0
LDH IU/l w surowicy	552.6	494.7	376.7	521.7
Albuminy g/l w surowicy	32.8	37.4*	33.7	35.8
Skaza węzł. klas. WHO	1.5	1.0	1.7	1.6
Liczba cykli indukujących	1.2	1.4	1.0	1.8*
CR % (liczba chorych)	9.5 (4)	0.0 (0)	0.0 (0)	20.0 (2)
CR + PR % (liczba chorych)	28.6 (12)	25.0 (2)	0.0 (0)	70.0** (7)
Czas przeżycia w miesiącach mediana	1.50	2.00	1.00	10.0
Średnia $\bar{X}$ w miesiącach	2.38	2.25	1.67	8.2***

* - $p < 0.05$

** - $p < 0.01$

*** - $p < 0.001$

Tabela 13

Porównanie parametrów klinicznych i laboratoryjnych w grupach chorych z ALL o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów

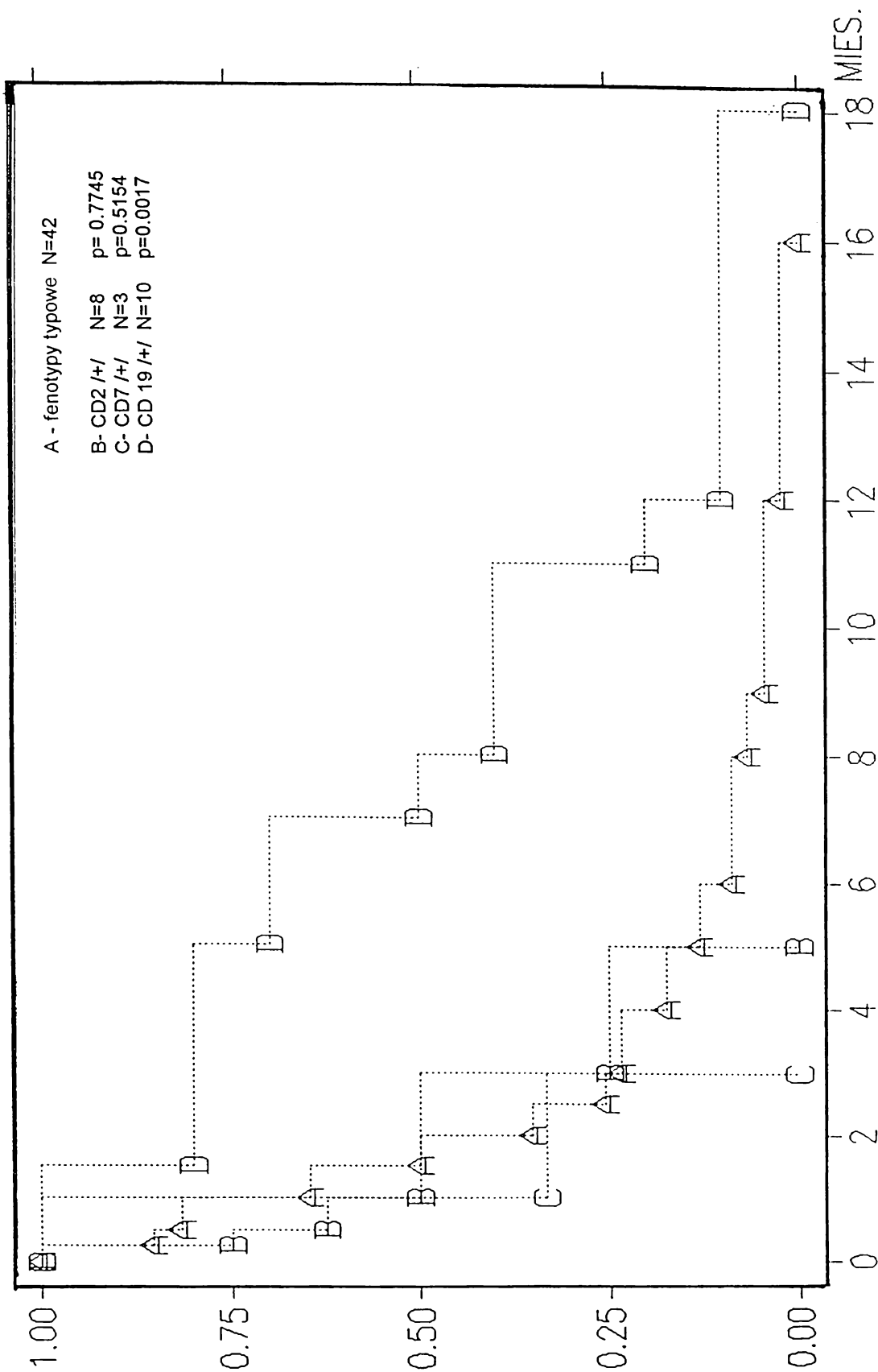
Charakterystyka laboratoryjna i kliniczna	ALL-B komórkowe typowe $\bar{x}$ n= 18	ALL HLADR/-/ $\bar{x}$ n=8	ALL CD33/+/ $\bar{x}$ n=2	ALL-T, pre-T typowe $\bar{x}$ n=5	ALL-T, preT CD 19/+/ $\bar{x}$ n=4
Erytrocyty $\times 10^{12}/l$	3.2	3.5	2.7	3.35	3.4
Leukocytoza $\times 10^9/l$	47.7	24.2	11.5	39.3	9.6 **
Płytki krwi $\times 10^9/l$	34.4	53.7	14.5	36.2	12.5*
% blastów w leukogramie	60.8	63.9	60.0	55.0	63.5
% blastów w szpiku	90.4	89.4	95.0	90.0	82.5
LDH IU/L w surowicy	425.9	418.5	815.0	395.0	2042.5 *
Albuminy g/L w surowicy	37.5	36.1	32.0	36.0	35.8
Skaza krwotoczna wg.WHO	1.3	0.9	1.0	1.3	1.3
zajęcie śródpiersia (%chorych)	0	0	0	40	25
zajęcie CSN (%chorych)	0	0	0	20	25
Liczba cykli indukujących	1.4	1.25	1.5	1.3	1.5
CR % (liczba chorych)	28 (5)	50.0 (4)	0.0 (0)	40 (2)	0.0 (0)
CR + PR % (liczba chorych)	50 (9)	62.5 (5)	0.0 (0)	40 (2)	0.0 (0)
Czas przeżycia w miesiącach- mediana	2.5	8. 0	2.0	2.8	4
średnia $\bar{X}$ w miesiącach	7.18	10.88	2.5	7.8	5.00

* - $p < 0.05$

** - $p < 0.01$

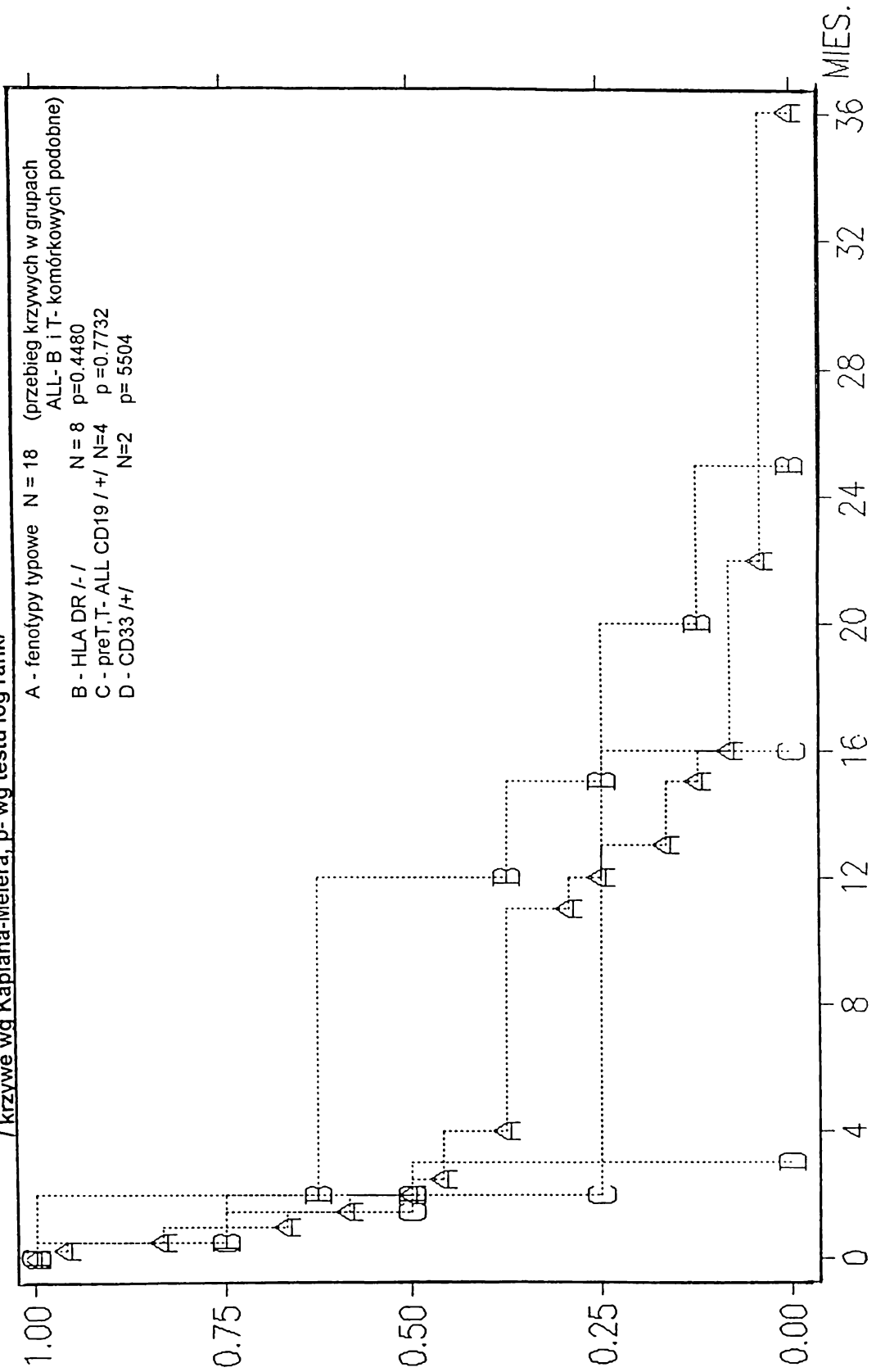
*** - $p < 0.001$

RYC. 4 Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w grupach leczonych chorych z AML o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów / krzywe wg Kaplana- Meiera, p - wg testu log rank/



RYC. 5

Porównanie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w grupach leczonych chorych z ALL o typowych i nietypowych immunofenotypach blastów / krzywe wg Kaplan-Meiera, p- wg testu log rank/



OMÓWIENIE WYNIKÓW

Ad I

W immunofenotypach blastów badanych 75 chorych z AML najwyższą średnią ekspresję wykazywały markery powierzchniowe : HLA-DR (25,7% STD 22.7%), CD33 (52% STD 30,5%), natomiast w grupie 39 chorych z ALL: HLA-DR (34,7% STD 29,2%) , CD19 (42,8% STD 31,8%), CD10 (21,5% STD 42%) . Średnia ekspresja markerów limfoidalnych w grupie chorych z AML była niska i wynosiła od 7,8% -0,5% , najwyższą z nich dotyczyła CD7 (4,1% STD 8%), CD2 (7,8% STD 9,8%), CD19 (6,4% STD 10,4%), co wiąże się z występowaniem tych markerów w przypadkach immunofenotypów z koekspresją Ly+ AML. Średnia ekspresja markerów mieloidalnych w grupie 39 chorych z ALL wynosiła od 3,7% -0.03%, najwyższą wykazywał CD 33 (3,7% STD 8,3%), co wiąże się z jego występowaniem w przypadkach koekspresji My+ ALL.

W immunofenotypach blastów 4 chorych z AUL występowała jedynie ekspresja markerów HLA-DR (średnio 58%) i CD34 (średnio 27,5%).

Ad II

W grupie chorych z AML w ocenie immunofenotypów podtyp mieloblastyczny stwierdzony w 44 przypadkach - wg klasyfikacji FAB został określony jako M1 (57%) , M2 (41%) oraz M4(2%). Podtyp mielomonoblastyczny stwierdzony w 25 przypadkach -wg klasyfikacji FAB określono w większości jako M4 (80%) i M1 (12%). Podtyp erytroblastyczny stwierdzono w 5 przypadkach - wszystkie odpowiadały wg FAB - M6, podtyp monoblastyczny- 1przypadek odpowiadał typowi M5. W badanej grupie chorych nie stwierdzono przypadku białaczki promielocytowej ani też megakarioblastycznej.

W grupie chorych z ALL podtyp common- ALL(11chorych) określony został wg FAB w większości jako L 1 (90,1%), podtyp B-ALL (12chorych) jako L2 i L1 (50%, 33,3%) , a tylko w 16,7% jako L3, podtyp null i proB (3 chorych) jako L1 i L2, podtyp preB -ALL (3chorych) jako L2 (100%), podtypy pre-T i T- ALL (10 chorych) określono jako L1 (100%). W grupie chorych z AUL 2 chorych określono jako M1 , 2 jako L1 wg FAB.

Znamiennej ekspresję markerów w poszczególnych typach AML klasyfikowanych wg FAB stwierdzono w przypadku : HLA-DR w typach M1, M2, M4 , M5, M6 , CD 33 w : M1, M2, M4, M5, CD14 w: M4, M5 , oraz glikoforyny w

typie M 6. W przypadku chorych z ALL znamiennej ekspresję markerów stwierdzono w przypadku : HLA-DR w typach L1, L2, CD19 i CD10 w L1, L2, L3 , CD22 w L2, L3 oraz slg i lambda w L3.

Spośród grupy 120 chorych w 15 przypadkach określenie immunofenotypu komórek blastycznych doprowadziło do weryfikacji wstępnego rozpoznania ustalonego w oparciu o kryteria FAB. W 6 przypadkach były to białaczki o nietypowych fenotypach : 3 mielomonoblastyczne z koekspresją CD2 , które nie wykazywały reakcji na niespecyficzną esterazę , 1 mielomonoblastyczna z koekspresją CD19 wykazująca jedynie dyfuzyjną reakcję PAS (określona jako L1), oraz białaczki dwufenotypowa i dwuklonalna , w oparciu o morfologię komórek zakwalifikowane jako typ M 1 wg FAB. Białaczki nieodróżniewanokomórkowe (AUL) głównie w oparciu o morfologię komórek zostały określone wg FAB w 2 przypadkach jako typ M 1, w 2 jako L1. Białaczki mielomonoblastyczne (4 przypadki) z uwagi na brak reakcji na niespecyficzną esterazę określono wg FAB jako M 1 , M 2. W 1 przypadku białaczka określona wg FAB (ze względu na morfologię komórek jako M 4) została określona jako mieloblastyczna.

Ad III

Analiza immunofenotypów badanych chorych z ALL potwierdziła wysoką ekspresję markerów powierzchniowych określających przynależność liniową i stopień zróżnicowania komórek blastycznych w odpowiednich podtypach. Znamiennej ekspresję wykazywały markery powierzchniowe HLA-DR i CD 19 we wszystkich podtypach ALL z linii B komórkowej ,CD 9 w pro B , null i pre B-ALL, CD10 w common ALL, CD22 i slg w B-ALL , CD7 w preT-ALL, CD2 w preT i T-ALL , CD3, CD4, CD8 w T-ALL.

Ad IV

W grupach leczonych chorych z AML i ALL oraz typowymi immunofenotypami blastów nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy badanymi parametrami, wartościami morfologii krwi i aktywnością LDH w surowicy w momencie rozpoznania, a obecnością lub brakiem poszczególnych markerów powierzchniowych.

Jedynie w grupie chorych z AML zauważono niższą średnią liczbę leukocytów w przypadku obecności CD14 ($23,9 \times 10^9$ vs $54,3 \times 10^9/l$ $p < 0.01$), wyższą średnią liczbę płytek w przypadku obecności CDw65 ($72,5 \times 10^9/l$ vs $26,44 \times 10^9/l$ $p < 0.05$), natomiast w grupie chorych z ALL w przypadku obecności markera CD 9

niższą średnią liczbę leukocytów ($2,47 \times 10^9/l$ vs $46,8 \times 10^9/l$ $<0,001$).

W badanych grupach chorych z AML i ALL obecność lub brak poszczególnych markerów powierzchniowych w immunofenotypach blastów nie wykazywały związku (brak znamienności w teście Chi kwadrat) z odsetkiem uzyskiwanych remisji. W ocenie prawdopodobieństwa czasu przeżycia w grupie chorych z ALL zauważono związek braku markera CD2 z korzystniejszym rokowaniem (test log rank $p=0.0049$).

Ad V

Spośród grupy 120 chorych wyodrębniono grupę 37 chorych (31%), których komórki blastyczne wykazywały nietypowe immunofenotypy. W 8 przypadkach był to brak (lub utrata) markera, w 27 koekspresje markerów spoza dających się określić linii komórkowych, w 1 przypadku proliferacja dwufenotypowa, w 1 dwuklonalna. W grupie chorych z AML występowały: koekspresja markera linii B-komórkowej CD19 w 13,3% oraz markerów linii T-komórkowej CD2 w 10,2% i CD7 w 4%. Koekspresje tych markerów związane były z wyjątkiem 1 przypadku z immunofenotypem mieloblastycznym i mielomonoblastycznym. Najwyższą średnią ekspresję wykazywał marker CD7 (55.3%)

Natomiast w grupie chorych z ALL występowały: koekspresja markera CD19 w 40% białaczek linii B, brak HLA-DR w 27,5% białaczek linii B, oraz koekspresja markera linii mieloidalnej CD33 w 5,1% ALL. Nietypowe immunofenotypy związane były (z wyjątkiem 2 przypadków) z common i T-komórkowymi ALL. W grupie chorych z ALL marker CD33 wykazywał wyższą średnią ekspresję (30,9%) niż CD19 w T-komórkowej ALL (22%).

Oceniane parametry laboratoryjne i kliniczne w grupach chorych z nietypowymi fenotypami (z wyłączeniem białaczki dwufenotypowej i dwuklonalnej) nie różniły się znamienne w porównaniu z grupami chorych o typowych immunofenotypach. Jedynie w przypadku koekspresji CD19 w preT i T-ALL chorzy wykazywali wyższą aktywność dehydrogenazy mleczanowej w surowicy (średnio 2042.5U/L vs 395U/L), niższe wartości leukocytów (średnio $9,6 \times 10^9/l$ vs $39,3 \times 10^9/l$) i płytek krwi (średnio $12,5 \times 10^9/l$ vs $36,2 \times 10^9/l$) w porównaniu z grupą chorych z preT i T-ALL bez koekspresji, w przypadku koekspresji CD7 w AML chorzy wykazywali wyższy odsetek blastów w leukogramie (83.3% vs 55.5%).

W grupie chorych z nietypowymi fenotypami w AML najwięcej remisji całkowitych i częściowych (CR+ PR) (70% vs 28.6%) oraz najdłuższy średni czas przeżycia (8.2 mies. vs 2.38 mies.) zaobserwowano w przypadku koekspresji

CD19, przy czym prawie każdy chory otrzymał 2 cykle indukujące remisję (średnio 1,8). Przebieg krzywej prawdopodobieństwa czasu przeżycia w tej grupie pacjentów jest korzystniejszy niż w grupie chorych z typowymi immunofenotypami (test log rank $p=0.0017$). W grupie chorych z koekspresją CD2 jedynie 25% chorych uzyskało PR, żaden z chorych z koekspresją CD7 nie uzyskał CR lub PR. Średni czas przeżycia w grupie chorych z koekspresjami CD2 i CD7 był zbliżony w stosunku do czasu przeżycia w grupie chorych z typowymi immunofenotypami. Analiza przebiegu krzywych prawdopodobieństwa przeżycia w grupach chorych z koekspresjami CD2 i CD7 oraz w grupie chorych z typowymi immunofenotypami nie wykazała istotnych różnic w teście log rank, natomiast porównanie przebiegu krzywych w poszczególnych przedziałach czasowych wskazuje na gorsze rokowanie w grupach z koekspresjami CD2 i CD7.

W grupie chorych z ALL o nietypowych fenotypach największy odsetek CR i PR (62.5 %) oraz najdłuższy średni czas przeżycia (10,9 mies) dotyczył przypadków braku markera HLA-DR. W grupach chorych z koekspresją CD19 w preT i T-ALL, oraz koekspresją CD33 żaden z chorych nie uzyskał CR lub PR a czas przeżycia wynosił odpowiednio 5 i 2.5 mies (w grupach z typowymi fenotypami 7.18 i 7.8 mies). Analiza krzywych prawdopodobieństwa czasu przeżycia chorych w porównywanych grupach immunofenotypów nietypowych i typowych nie wykazała istotnych różnic w teście log rank, jednak porównanie przebiegu krzywych w poszczególnych przedziałach czasowych wskazuje, że najkorzystniejsze rokowanie w grupie chorych z nietypowymi fenotypami wykazywali chorzy z brakiem markera HLA-DR.

DYSKUSJA

Badanie immunofenotypowe komórek blastycznych z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych i oceną przy pomocy cytofluorymetrii przepływowej stało się rutynowym badaniem w diagnostyce ostrych białaczek w Klinice Hematologii w Krakowie począwszy od roku 1990. W grupie 120 kolejnych, a więc nie preselekcjonowanych chorych oceniony immunofenotyp komórek blastycznych pozwolił na ustalenie typu ostrej białaczki w 96,7%. W 4 przypadkach badanie immunofenotypowe z zastosowaniem użytego zestawu przeciwciał monoklonalnych nie pozwoliło na określenie przynależności liniowej komórek blastycznych, określono je jako niezróżnicowanokomórkowe AUL. Wydaje się, że w tych przypadkach pomocne byłoby immunocytochemiczne oznaczanie mieloperoksydazy i Tdt w komórkach blastycznych (Storr i wsp. 1990, Del Vecchio i wsp. 1991).

Badanie immunofenotypowe nie może zastąpić w diagnostyce ostrych białaczek oceny jakościowej i ilościowej szpiku, która daje podstawę do rozpoznania proliferacji, żaden bowiem ze stosowanych markerów powierzchniowych nie jest specyficzny dla komórek białaczkowych. Komórki posiadające ekspresję każdego ze stosowanych markerów powierzchniowych obecne są w prawidłowym szpiku kostnym (Janossy i wsp. 1980, Campana i wsp. 1991).

W ocenianej grupie chorych badanie immunofenotypowe było podstawą do wdrożenia chemioterapii odpowiedniej w stosunku do typu histologicznego proliferacji. W 15 przypadkach stanowiących 12,5% ocenianych chorych, badanie immunofenotypu doprowadziło do zmiany wstępnego rozpoznania (ustalonego w oparciu o kryteria klasyfikacji FAB), związanej ze zmianą stosowanego w chemioterapii indukującej zestawu cytostatyków. Ocena komórek blastycznych tych chorych wobec niejasnych lub negatywnych wyników badań cytochemicznych opierała się przede wszystkim na subiektywnej ocenie obrazu morfologicznego. Wartym podkreślenia jest fakt, że w 6 przypadkach byli to chorzy wykazujący nietypowy immunofenotyp blastów (białaczki mielomonoblastyczne z koekspresją CD2 i CD19, oraz o fenotypie mieszanym dwuliniowa i dwuklonalna). Przypadki takiej weryfikacji opisują niektórzy autorzy (Neame i wsp. 1986).

Badanie immunofenotypowe w porównaniu do możliwości badań cytomorfologicznych i cytochemicznych stosowanych w naszej Klinice pozwoliło na wyróżnienie bardziej heterogennej populacji zwłaszcza u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną co ma znaczenie dla sposobu terapii i prognozowania (Hoelzer i wsp. 1988, Gaynor i wsp. 1988, Hussein i wsp. 1988, Linker i wsp. 1991).

Wśród chorych z białaczkami limfoblastycznymi wyróżniono następujące podtypy:

B-ALL (30,7%), common- ALL(28,2%), preTi T -ALL (25,6%), pro-B i null ALL (7,7%), preB ALL (7,7%). Zwraca uwagę stosunkowo wysoki odsetek B-ALL w ocenianej populacji chorych (potwierdzanych obecnością powierzchniowego markera CD22 oraz powierzchniowych immunoglobulin) .Może to budzić podejrzenie fałszywie dodatniego rozpoznawania tego typu ALL i zwraca uwagę na potrzebę rozszerzenia zestawu przeciwciał monoklonalnych o markery specyficzne dla limfocytów B: CD21, CD24 CD 79 (Mason i wsp. 1991).

Ekspresja markerów określających przynależność liniową blastów w ocenianej grupie była najwyższa w przypadku HLA-DR , CD33 (linia mieloidalna) oraz HLA-DR, CD19 i CD10 (linia limfoidalna).

Korelacja klasyfikacji immunofenotypowej z klasyfikacją FAB była większa w odniesieniu do grupy chorych z AML niż ALL ze względu na wspomnianą wyżej heterogenność tej ostatniej. Podtyp mieloblastyczny występował w klasyfikacji FAB jako M1 i M2 , mielomonoblastyczny jako M4 ,monoblastyczny jako M5 oraz erytroblastyczny jako M6. Należy zaznaczyć, że ocena immunofenotypu nie pozwala na arbitralne rozróżnienie typu M1 i M2 , a rozpoznanie białaczki monoblastycznej i promielocytowej nawet w przypadku wysokich ekspresji markerów musi być zawsze połączone z oceną kryteriów wg FAB .W grupie chorych z ALL korelacja widoczna była w odniesieniu do podtypów common , preTi T występujących przede wszystkim jako typ L1. W oparciu o ocenioną grupę immunofenotypów nie można także wyodrębnić markerów charakterystycznych dla poszczególnych typów białaczek w klasyfikacji FAB.

Piśmiennictwo na temat korelacji klasyfikacji immunofenotypowej i FAB nie zawiera jednolitych danych (Foon i wsp. 1982, Neame i wsp. 1986, Drexler i wsp. 1987, Campos i wsp. 1989 , Tucker i wsp, Schwarzingier i wsp. 1990, Urbano-Ispizua i wsp. 1990, Solary i wsp. 1992, Paietta i wsp. 1992).

W obecnej pracy podjęto także próbę oceny związku obecności lub braku poszczególnych markerów powierzchniowych z wybranymi wstępnymi parametrami laboratoryjnymi , odsetkiem uzyskiwanych remisji całkowitych oraz czasem przeżycia leczonych chorych z typowymi immunofenotypami. Oceniono następujące markery: w grupie chorych z AML : HLA-DR, CD34,CD33, CDw65, CD14, CD11c, u chorych z ALL : CD34,CD9, CD7, CD2, CD3, CD19, CD10, CD22. Stwierdzono tylko nieliczne korelacje, które ze względu na małą liczebność grup nie upoważniają do formułowania szerszych wniosków i stanowią jedynie charakterystykę ocenianej populacji. Uzyskane wyniki nie są zgodne z doniesieniami autorów o niekorzystnym wpływie obecności markera CD34 w grupie chorych z AML na osiągnięcie remisji całkowitych i czas przeżycia chorych(Vaughan i wsp.1988,

Borowitz i wsp. 1989, Campos i wsp. 1989, Geller i wsp. 1990, Guinot i wsp. 1991, Lee i wsp. 1992, Solary i wsp. 1992, Casasnovas i wsp. 1994). W stosowanym zestawie przeciwciał dla linii mieloidalnej brak było markerów, które zdaniem różnych autorów mają wpływ na korzystne (CD15) (Hołowiecki i wsp. 1986, Campos i wsp. 1989, Schwarzingier i wsp. 1990) oraz niekorzystne rokowanie (CD13) (Griffin i wsp. 1986, Schwarzingier i wsp. 1990).

W populacji ocenionych chorych koekspresje CD 19, CD2, CD7 występowały w 28% przypadków AML, brak HLA-DR w B- komórkowych ALL, koekspresje CD19 (w T-komórkowych ALL) i CD33 (w obu liniach ALL) stanowiły 35,9% przypadków ALL. Stwierdzono także 2 przypadki immunofenotypów mieszanych: białaczkę dwufenotypową i dwuliniową (1,6% wszystkich ostrych białaczek).

Wśród chorych z AML nietypowe immunofenotypy związane były z typem mieloblastycznym i mielomonoblastycznym, natomiast u chorych z ALL dotyczyły typu common, preT i T. Jest to zgodne z danymi w piśmiennictwie (Sobol i wsp. 1987, Childs i wsp. 1989, Guyotat i wsp. 1989, Urbano-Ispizua A. i wsp. 1990, Schwarzingier I. i wsp. 1990, Geller i wsp. 1990, Lee i wsp. 1992, Cuneo i wsp. 1992, Reading i wsp. 1993).

Dokonano porównania charakterystyki laboratoryjnej i klinicznej w grupach chorych (leczonych chemioterapią) z typowymi i nietypowymi immunofenotypami blastów. Nie znaleziono szczególnych różnic dotyczących wieku i obrazu klinicznego w obu grupach chorych. W przypadku chorych z AML korzystny związek z rokowaniem (częstością CR i PR oraz czasem przeżycia) stwierdzono w przypadkach koekspresji markera CD19. Należy wspomnieć, że w tej grupie chorych stosowano więcej niż 1 cykl indukujący remisję hematologiczną. Podobne dane przedstawił Ball i wsp. 1991, natomiast niekorzystny wpływ koekspresji CD19 na rokowanie stwierdził Solary i wsp. 1992.

W przypadkach koekspresji CD2 i CD7 odsetek remisji był niższy a średni czas przeżycia podobny w porównaniu z chorymi o typowych immunofenotypach blastów. Porównanie przebiegu krzywych Kaplana-Meiera wykazało gorsze rokowanie dla chorych z koekspresją CD2 i CD7 (przy braku znamienności w teście log rank). Istniejące publikacje donoszą zarówno o niekorzystnym (Mirro J. jr i wsp. 1989, Cross i wsp. 1988, Ferrara i wsp. 1990, Jensen i wsp. 1991, Paietta i wsp. 1993), jak i korzystnym (Ball i wsp. 1991) wpływie tych markerów na rokowanie, wreszcie o braku związku z rokowaniem (Cross i wsp. 1988, Lo Coco. i wsp. 1989, Schwarzingier i wsp. 1990, Baer M.R. i wsp. 1991).

W grupie chorych z ALL nietypowe immunofenotypy wykazujące brak markera HLA-DR w linii B-komórkowej związane były z większym odsetkiem

częściowych i całkowitych remisji , oraz dłuższym średnim czasem przeżycia w porównaniu z grupą chorych o typowych immunofenotypach. Natomiast chorzy z koekspresją CD19 i CD33 byli grupą o złym rokowaniu (brak CR lub PR, krótszy średni czas przeżycia , niekorzystne porównanie krzywych Kaplana -Meiera). Obserwacje dotyczące chorych z tymi koekspresjami są podobne w stosunku do przedstawionych przez kilku autorów (Sobol i wsp. 1987, Childs i wsp.1989, Guyotat i wsp.1990, Urbano-Ispizua i wsp. 1990), natomiast brak jest dostatecznych danych na temat znaczenia braku HLA-DR na komórkach blastycznych linii B.

Niejednoznaczne dane w piśmiennictwie na temat znaczenia prognostycznego nietypowych immunofenotypów wynikają jak, już wspomniano we wstępie, z przyjmowania różnych kryteriów dla dodatniej ekspresji markerów oraz braku jednolitych kryteriów rozpoznawania białaczek - hybryd . Ponadto większość publikacji dotyczy nietypowych immunofenotypów w białaczkach dziecięcych, co wynika z większej częstości ich występowania w tej grupie chorych.

Przypadki białaczki dwufenotypowej i dwuklonalnej stwierdzone w ocenianej populacji chorych przedstawione ,w formie opisów kazuistycznych w aneksie ,są rzadko spotykane stąd piśmiennictwo na ich temat jest ubogie (Hanson i wsp.1993).

W przytaczanych publikacjach brak jest jednoznacznych danych na temat sposobu terapii u chorych z nietypowymi immunofenotypami blastów. Sugerowana jest intensywna chemioterapia indukująca remisję, a w przypadku niepowodzenia i konieczności drugiej indukcji, zastosowanie cyklu alternatywnego przewidzianego dla linii , której marker reprezentowany jest w koekspresji . W naszej Klinice chorzy z nietypowymi immunofenotypami , u których podjęto leczenie indukujące remisję nie stanowili grupy objętej odrębnym protokołem chemioterapii. Przedstawione obserwacje mogą jednak skłaniać w przyszłości do zmiany tego postępowania.

WNIOSKI:

1. Określanie immunofenotypów blastów 120 chorych z ostrymi białaczkami pozwoliło na ustalenie typu proliferacji u 96,7% chorych a w 12,5% przypadków umożliwiło weryfikację wstępnego morfologicznego rozpoznania i podjęcie adekwatnej chemioterapii .
- 2 Analiza immunofenotypów blastów pozwoliła na wyodrębnienie grupy chorych (stanowiącej 31% osób), o nietypowych fenotypach białaczek : dotyczyły one 35,9% chorych z ALL i 28% z AML , w 1,7% stwierdzono białaczki mieszane : dwufenotypową i dwuliniową.
3. Oznaczanie immunofenotypów okazało się mieć większe znaczenie diagnostyczne u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną niż mieloblastyczną.
4. Nie stwierdzono znaczenia rokowniczego obecności lub braku jednego z markerów powierzchniowych charakteryzujących dane immunofenotypy w AML : HLA-DR, CD34, CD33, CDw65, CD14, CD11c, w ALL : CD34,CD9, CD7, CD2, sCD3, CD19, CD10, sCD22.
5. Stwierdzenie nietypowych immunofenotypów u analizowanych chorych z ostrymi białaczkami miało zarówno korzystne (koekspresja CD19 w AML, oraz brak markera HLA-DR w B-komórkowych ALL) jak i najczęściej niekorzystne znaczenie rokownicze (koekspresje CD2 , CD7 w AML oraz CD19 w preT i T-komórkowych i CD33 w T i B-komórkowych ALL). Częste ich występowanie , znaczenie rokownicze jak i konieczność indywidualizowania terapii uzasadnia określanie immunofenotypu blastów białaczkowych u pojedynczego chorego w oparciu o zestaw przeciwciał charakterystycznych tak dla szeregu mielo jak i limfoidalnego.

STRESZCZENIE :

Określono immunofenotypy 120 kolejnych chorych z ostrymi białaczkami hospitalizowanych w Klinice Hematologii w latach 1990-93, w tym 68 mężczyzn w wieku od 17-75 lat i 52 kobiety w wieku 15-76 lat.

Ocena immunofenotypów pozwoliła na ustalenie typu ostrej proliferacji u 96,7% chorych. W 62,5% stwierdzono AML, w 32,5% ALL, w 1,7% białaczki mieszane (dwuliniową i dwufenotypową). W 3,3% badanie to nie pozwoliło na ustalenie przynależności liniowej blastów, białaczki te określono jako niezróżnicowane (AUL). Wśród chorych z białaczkami limfoblastycznymi wyróżniono następujące podtypy: B-ALL (30,7%), common-ALL (28,2%), preT i T-ALL (25,6%), pro-B i null ALL (7,7%), pre-B ALL (7,7%).

W oparciu o analizę immunofenotypów zweryfikowano wstępne, morfologiczne rozpoznanie u 12,5% chorych co pozwoliło na wprowadzenie u nich adekwatnej chemioterapii.

Porównując charakterystykę morfologiczną z immunofenotypową stwierdzono większą korelację w typie mieloidalnym niż limfoidalnym.

Nie stwierdzono istotnego znaczenia rokowniczego obecności lub braku poszczególnych markerów powierzchniowych w immunofenotypach blastów chorych z AML (HLA-DR, CD34, CD33, CDw65, CD14, CD11c) i ALL (CD34, CD9, CD7, CD2, CD3, CD19, CD10, CD22) leczonych chemioterapią.

W grupie 31 % chorych stwierdzono występowanie nietypowych immunofenotypów blastów (koekspresję, utratę markera, proliferację dwufenotypową i dwuklonalną). Miały one tak korzystne (AML+ CD19, brak HLA-DR w B-liniowych ALL) jak i niekorzystne (AML+ CD2, AML+CD7, preT, T ALL + CD19, ALL+CD33) znaczenie dla rokowania w ocenianej grupie chorych, co może wpłynąć w przyszłości na podejmowanie decyzji o indywidualizowanej formie terapii.

Piśmiennictwo:

1. Akashi K., Shibuya T., Harada M., Morioka E., Oshima K., Kimura N., Takeshita M., Kurokawa M., Kikuchi M. & Niho Y.: Acute "bilineal-biphenotypic" leukaemia. Br. J. of Haematol., 1990, 74, 402-407.
2. Andrade R.E., Wick M.R., Frizzera G., Gajl-Peczalska K.: Immunophenotyping of hematopoietic malignancies in paraffin sections . Human Pathol., 1988, 19,394-402.
3. Baer M.R., Naughton M.J., Nettleton A.C., Stewart S.J., Barcos M., Block A>M., Brecher M.L., Bloomfield C.D., Stewart C.: Multiparameter flow cytometric analysis of acute myeloid leukemia (AML) cells. Blood, 1991, 78, 447a
4. Bain B., Catovsky D.: Current concerns in haematology 2: Classification of acute leukemia. J. Clin. Pathol. ,1990, 43, 882-887.
5. Ball E.D., Davis R.B., Griffin J.D., Mayer R.J., Davey F., Arthur D.C., Wurster -Hill D., Noll W., El Ghetany T., Allen S.L., Rai K., Lee E.J., Schiffer C.A. & Bloomfield.C.D.: Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. Blood,1991, 10, 2242-2250.
6. Ben -Bassat I., Gale R.P.: Hybrid acute leukemia. Leuk. Res., 1984, 8,929-936.
7. Bennett J.M. , Catovsky D., Daniel M.T.,Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R.,Sultan C :Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia . Ann. Intern . Med. 1985, 103, 620-629.
8. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G. , Gralnick H.R., Sultan M.D. : Proposals for the classification of the acute leukemia (FAB cooperative group) , Br.J.Haematol.,1976,33, 451-458.
9. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R.,Sultan C. : Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). Br.J. Haematol. 1991, 78, 325-329.
- 10.Bennett J.M.: The FAB Classification of the Acute Adult Myeloid Leukemias. W: Adult Leukemias 1 (pod red.C.D. Bloomfield). Martinus Inshoff Publ. Maque ,

Boston, London, 1982 107-125.

11. Bernard A., Boumsell L., Hill C.: Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories. W: Leucocyte Typing: Human Leucocyte Differentiation Antigens Detected by Monoclonal Antibodies (wyd. Bernard A., Boumsell L., Dausset J., Milstein C., Schlossman S.F.) Springer, Berlin, 1984, 9-142.
12. Borowitz M.J., Gockerman J.P., Moore J.O., Civin C.I., Page S.O., Robertson J. and Bigner S.H.: Clinicopathologic and cytogenetic features of CD34 (MY10) - positive acute nonlymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989, 91, 265-270.
13. Bradstock K.F., Kerr A., Kabrol A., Favaloro E.J. & Hewson J.W.: Coexpression of p165 myeloid surface antigen and terminal deoxynucleotidyl transferase ; a comparison of acute myeloid leukemia and normal bone marrow cells. *Am. J. of Hematol.*, 1986, 23, 43-50.
14. Campana D., Coustan-Smith E., Janossy G.: The immunological detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, 1990, 76, 163-171.
15. Campana D., Coustan -Smith E. and Behm F.G.: The definition of remission in acute leukemia with immunologic techniques. *Bone Marrow Transplant.*, 1991, 8, 429-437.
16. Campana D., Thomson J.S., Amlot P., Brown S., Janossy G.: The cytoplasmic expression of CD3 antigen in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J. of Immunol.*, 1987, 138, 648-655.
17. Campos L., Guyotat D., Archimbaud E., Devaux Y., Treille D., Larese A., Maupas J., Gentilhomme O., Ehram A., Fiere D. : Surface marker expression in adult acute myeloid leukemia: correlations with initial characteristics , morphology, and response to therapy. *Br. J. Hematol.*, 1989, 72, 161-166.
18. Campos L., Guyotat D., Gentilhomme O., Trielle D., Fiere D. & Germain D.: Expression of a B-lymphoid differentiation antigen (CD19) on acute non-lymphoblastic leukaemia cells. *Europ. J. of Haematol.*, 1987, 38, 220-224.

- 19.Casasnovas R.O., Solary E. , Campos L., Maynadie M., Favre M., Bremend J.-L. Garand R., Bene M.Ch., Faure G. and G.E.I.L.: Prognostic relevance of surface markers in adult de novo acute myeloblastic leukemias: a prospective study of the Groupe d' Etude Immunologique des Leucemies (G.E.I.L.). *Leukemia and Lymphoma*, 1994, 13, suppl.1, 7-10.
- 20.Catovsky D., Cherchi M., Greaves M.F., Janossy G., Pain C., Kay H.E.M.:The acid phosphatase reakction in acute lymphoblastic leukemia . *Lancet* 1978,1, 749-753.
- 21.Catovsky D., Matutes E., Buccheri V., Shetty V, Hanslip J., Yoshida N., Morilla R.A.: A classification of acute leukemia for the 1990s. *Ann. Hematol.*, 1991, 62, 16-21.
- 22.Chen P.M., Chiang H., Chou C.K., Hwang T.S., Chiang B.N., Greaves M.F.: Immunological classification of T-cell acute lymphoblastic leukaemia using monoclonal antibodies. *Immunol. Res.* 1983, 3, 339-347.
- 23.Childs C.C., Hirsch -Ginsberg C., Walters R.S., Andersson B.S., Reuben J., TrujilloJ.M., Cork A., Stass S.A., Freireich E.J. and Zipf T.F.: Myeloid surface antigen-positive acute lymphoblastic leukemia (My+ALL): immunophenotypic , ultrastructural, cytogenetic, and molecular characteristics. *Leukemia*, 1989, 3, 777-783.
- 24.Clark E.A., Einfeld D.: Human B cell surface molecules defined by an international workshop panel of monoclonal antibodies. W: *Leukocyte typing II* (wyd. E.L.Rein-herz, B.F. Haynes, L.M. Nadler, I.D. Bernstein) Springer , Berlin, 1986, 155-167.
- 25.Cross A.H., Goorha R.M., Nuss R., Behm F.G., Murphy S.B.,Kalwinsky D.K., Raimondi S., Kitchingman G.R. and Mirro J.: Acute myeloid leukemia with T-lymphoid features: a distinct biologic and clinical entity . *Blood*, 1988, 72, 579-587.
- 26.Cuneo A., Michaux J.-L., Ferrant A., Hove L.V., Bosly A., Stul M., Cin P.D., van den Berghe H.: Correlation of cytogenetic patterns and clinicobiological features

- in adult acute myeloid leukemia expressing lymphoid markers. *Blood*, 1992, 79, 720-727.
27. Del Vecchio L., Finizio O., Lo Pardo C., Pane N., Schiavone E.M., Vacca C. & Ferrara F.: Co-ordinate expression of T-cell antigens on acute myelogenous leukemia and of myeloid antigens on T-acute lymphoblastic leukemia. Speculation on a highly balanced bilinearity. *Leukemia*, 1991, 5, 815-818.
28. Del Vecchio L., Schiavone E.M., Ferrara F., Pace E., Pardo C.L., Pacetti M., Russo M., Cirillo D. & Vacca C.: Immunodiagnosis of acute leukemia displaying ectopic antigens : proposal for a classification of promiscuous phenotypes. *Am. J. of Hematol.* , 1989, 31, 173-180.
29. Drexler H.G., Menon M., Sagawa K., Tatsumi E., Koshiba H., Koishi T., Minato K., Sugimoto T., Saito M., Morita M., Pauly J.L., Han T., Freeman A.I., Messmore H. & Minowada J.: Phenotyping of malignant hematopoietic cells: analysis of 1200 cases of leukemia-lymphoma. *Blut*, 1986, 52, 99-109.
30. Drexler H.G., Thiel E., Ludwig W.-D.: Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1991, 8, 637-645.
31. Drexler H.G., Thiel E. and Ludwig W.-D.: Acute myeloid leukemias expressing lymphoid -associated antigens: diagnostic and prognostic significance. *Leukemia*, 1993, 4, 489-498.
32. Drexler H.G.: Classification of acute leukemias - a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia* , 1987, 1, 697-705.
33. Erber W.N., Mynheer L.C., Mason D.Y.: APAAP labelling of blood and bone - marrow samples for phenotyping leukemia. *Lancet*, 1986, 1, 761-765.
34. Ferrara F., De Rosa C., Fasanaro A., Mele G., Finizio O., Schiavone E.M., Spada O.A., Rametta V. & Del Vecchio L.: Myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia : clinicohematological correlations and prognostic relevance. *Hematol. and Pathol.* , 1990, 4, 93-98.
35. First MIC Cooperative Study Group . Morphologic, Immunologic and Cytogenetic

- (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemia: report of the workshop held in Leuven, Belgium. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1986,23,189-197.
- 36.Foon K.A, Gale R.P., Todd R.F.: Recent advances in the immunologic classification of leukemia. *Semin. Hematol.*, 1986,4,257-283.
- 37.Foon K.A., Schroff R.W., Gale R.P. : Surface markers on leukemia and lymphoma cells:recent advances. *Blood*, 1982, 60, 1-19.
- 38.Foon K.A., Todd R.F. :Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*, 1986, 68, 1-31.
- 39.Fourth MIC Cooperative Study Group . Meeting Report . Morphologic, Immunologic and Cytogenetic classification of the chronic (mature) B and T lymphoid leukemias.*Cancer Res.*, 1990, 50, 2212.
- 40.Freedman A.S., Nadler L.M.: Cell surface markers in hematologic malignancies.*Semin. Oncol.*, 1987,14,193-212.
- 41.Gagnon G.A., Childs C.C., Le Maistre A., Keating M., Cork A., Trujillo J.M., Nellis K., Freireich E., Stass S.: Molecular heterogeneity in acute leukemia lineage switch. *Blood*, 1989, 74, 2088-2095.
- 42.Gale R.P.& Ben Bassat I. : Hybrid acute leukemia. *Br. J. Hematol.*, 1987, 65, 261-264.
- 43.Gaynor J., Chapman D., Little C., Mc Kenzie S., Miller W., Andreff M., Arlin Z., Berman E., Kempin S., Gee T.and Clarkson B. : A cause -specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia:the Memorial Hospital experience since 1969. *J. Clin. Oncol.*, 1988, 6, 1014-1030.
- 44.Geller R.B., Zahurak M., Hurwitz C.A., Burke P.J., Karp J.E., Piantadosi S. and Civin C.I.: Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (MY10). *Br.J.Hematol.*, 1990, 76, 340-347.

45. Gerhartz H.H. & Schmetzer H. : Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1990, 4, 508-516.
46. Greaves M.F.: "Target" cells ,cellular phenotypes , and lineage fidelity in human leukemia. *J. Cell Physiol.*, 1982, suppl.1, 113-126.
47. Greaves M.F. & Chan L.C.: Mixed lineage leukemia : the implications for hematopoietic differentiation. *Blood* , 1986, 68, 598- 603.
48. Greaves M.F., Chan L.C., Furley A.J.W., Watt S.M. & Molgaard H.V.: Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood*, 1986, 67, 1-11.
49. Grumayer E.R., Griesinger F., Hummell D.S., Brunning R.D. & Kersey J.H.: Identification of novel B-lineage cells in human fetal bone marrow that coexpress CD7. *Blood*, 1991, 77, 64-68.
50. Guinot M., Sanz G.F., Sempere A., Arilla M.G., Jarque I., Gomis F. and Sanz M.A.: Prognostic value of CD34 in de novo acute myeloblastic leukemia. *Br. J. Haematol.*, 1991, 78, 533-534. 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 myeloid leukemia . *Blood*, 1986, 68, 1232-1241.
51. Gupta S., Good R.A., Siegal F.P.: Rosette formation with mouse erythrocytes: A marker for human B and non-T cell lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 25, 319-327.
52. Guyotat D., Campos L., Shi Z.-H., Charrin C., Treille D., Magaud J.-P. and Fiere D.: Myeloid surface antigens in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1990, 4, 664-666.
53. Hanson C.A., Gajl -Peczalska K.J., Parkin J.L., Brunning R.D.: Immunophenotyping of acute myeloid leukemia using monoclonal antibodies and the alkaline phosphatase- antialkaline phosphatase technique. *Blood*, 1987, 83-89.
54. Hanson C.A., Mohamed A., Sheldon S., Ross Ch.W., Schnitzer B. and Stoolman L.M: Acute biphenotypic leukaemia : immunophenotypic and cytogenetic

- analysis. Br.J. of Haematol. , 1993, 84, 49-60.
- 55.Hirt A., Imbach P., Wagner H.P.: Diagnostik der akuten Leukaemie im Kindesalter.Monatsschr. Kinderheilkd. 1982, 130, 866-871.
- 56.Hołowiecki J. : Cytochemia komórek krwi i szpiku . W: Hematologia kliniczna . Tom 1(pod red. K. Janickiego) Wyd. PZWL, Warszawa, 1991, 85-102.
- 57.Hołowiecki J., Lutz D., Callea V., Brugiattelli M., Krzemień S., Stella-Hołowiecka B., Neri A., Ihle R., Schranz V., Graf F., Kelenyi G., Jagoda K., Zintl F., Reves T., Kardos G.,Barceanu S.: Expression of cell differentiation antigen as prognostic factor in acute leukemia in: Modern trends in human leukemia VIII (ed. Neth), Springer- Verlag, 1989,104-108.
- 58.Hołowiecki J., Lutz D., Krzemień S., Stella-Hołowiecka B., Graf F., Kelenyi G., Schranz V., Callea V., Brugiattelli M., Neri A., Magyarlaki T., Ihle R., Jagoda K., Rudzka E. : CD-15 antigen detected by the VIM-D5 monoclonal antibody for prediction of ability to achive complete remission in acute non lymphoblastic leukemia. Acta Haematol., 1986, 76, 16-19.
- 59.Hołowiecki J., Szeruda -Rudzka E., Stella B.: Dobór metod cytochemicznych w diagnostyce ostrych białaczek . Acta Haematol. Pol., 1973, 4, 111-115.
- 60.Hoelzer D., Thiel E., Löffler H., Büchner T., Ganser A., Heil G., Koch P., Freund M., Diedrich H., Ruhl H., Maschmayer G., Lipp T., Nowrousian M.R., Burkert M., Gerecke H., Pralle H., Muller U., Lunscken Ch., Fulle H., Ho A.D., Kuchler R., Busch F.W., Schneider W., Gorg Ch., Emmerich B., Braumann D., Vaupel H.A., von Paleske A., Bartels H., Neiss A, and Messerer D.: Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. Blood, 1988, 71, 123-131.
- 61.Hurwitz C.A., Raimondi S.C., Head D., Krance R., Mirro J. Jr., Kalwinsky D.K., Ayers G.D., and Behm F.G. : Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. Blood,1992, 80, 3182-3188.
- 62.Hussein K.K., Dahlberg S., Head D., Waddel C.C., Dabich L., Weick J.K., Morrison F., Saiki J.H., Metz E., Rivkin S.E., Grever M.R. and Boldt D.: Treatment

of acute lymphoblastic leukemia in adults with intensive induction, consolidation , and maintenance chemotherapy. *Blood*, 1989, 73, 57-63.

63. Janossy G., Bollum F.J., Bradstock K.F. and Ashley J.: Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. *Blood*, 1980, 56, 430-441.
64. Jensen A.W. Hokland M., Jorgensen H., Justesen J. , Ellegaard J., Hokland P.: Solitary expression of CD7 among T-cell antigens in acute myeloid leukemia: Identification of a group of patients with similar T-cell receptor β and δ rearrangements and course of disease suggestive of poor prognosis. *Blood* 1991, 78, 1292-1300.
65. Kaplan S.S., Penchansky L., Stolc V., Contis L. & Krause J.R.: Immunophenotyping in the clasification of acute leukemia in adults. *Cancer*, 1989, 63, 1520-1527.
66. Kita K., Nakase K., Miwa H., Masuya M., Nishii K., Morita N., Takakura N., Otsuji .A., Shirakawa S., Uda T., Nasu K., Kyo T., Dohy H. and Kamada N. : Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8 ;21)(q22;q22) chromosomal abnormality frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood* 1992, 80, 470.
67. Knapp W., Dorken B., Gilks W.R., Rieber E.P. , Schmidt R.E., Stein H., and von dem Borne , A.E.G.K., *Lecocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. Oxford : Oxford University Press (eds) (1989).
68. Kohler G. , Milstein C. : Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256, 495-497.
69. Kurtzberg J., Denning S.M., Nycum L.M., Singer K.H. & Haynes B.F.: Immature human thymocytes can be driven to differentiate into nonlymphoid lineages by cytokines from the thymic epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86, 7575-7579.
70. Lee E.J., Yang J., Leavitt R.D., Testa J.R., Civin C.I., Forrest A. and Schiffer C.A.: The significance of CD34 and TdT determinations in patients with

untreated de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1992, 6, 1203-1209.

71. Linker C.A., Levitt L.J., O' Donnell M., Forman S.J. and Ries C.A.: Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with intensive cyclical chemotherapy: a follow-up report. *Blood*, 1991, 78, 2814-2822.
72. Lo Coco F., De Rossi G., Pasqualetti D., Lopez M., Diverio D., Latagliata R., Fenu S., Mandelli F.: CD7 positive acute myeloid leukaemia: A subtype associated with cell immaturity. *Br. J. Haematol*, 1989, 73, 480-485.
73. Löffler H. : *Cytochemie bei Leukosen : Einleitung und Übersicht* . W: Leukämie, Springer Verlag , Berlin, Heidelberg , New York, 1972.
74. Maitreya V. & Gale R.P. : What is hybrid acute leukemia? *Leuk. Res.* 1989, 13, 725-728.
75. Mason D.Y., Cordell J.L., Tse A.G.D., van Dongen J.J.M., van Noesel C.J.M., Micklem K., Pulford K.A.F., Valensi F., Comans-Bitter W.M., Borst J. and Gatter K.C.: The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J. Immunol.*, 1991, 147, 2474-2482.
76. Mason D.Y., Farrell C., Taylor C.R.: The detection of intracellular antigens in human leukocytes by immunoperoxidase staining .*Br. J. Haematol.* ,1975, 31, 361-370.
77. McCulloch E.A.: Lineage infidelity or lineage promiscuity? *Leukemia*, 1987, 1-235.
78. Mirro J .Jr., Kitchingman G.R. : The morphology , cytochemistry and clinical significance of acute mixed-lineage leukemia. W: Scott C.S., ed. *Leukaemia cytochemistry* . Chichester: Ellis Horwood , 1989, 155-179.
79. Mirro J., Kitchingman , G.R., Williams D.L., Murphy S.B., Zipf T.F. & Stass S.A.: Mixed lineage leukemia: the implications for hematopoietic differentiation. *Blood* , 1986, 68, 597-599.

- 80.Mirro J., Zipf T.F., Pui C.-H., Kitchingman G., Williams D., Melvin S., Murphy S.B.& Stass S.: Acute mixed lineage leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance.Blood, 1985, 66, 1115-1123.
- 81.Mirro J., Zipf T.F., Pui CH., Kitchingman G., Williams D., Melvin S., Murphy S.B., Stass.S. : Acute mixed -lineage leukemia and lineage switch. Clin. Haematol., 1986, 15, 811-827.
- 82.Moldenhauer G., Doerken B., Schwartz R., Pezzutto A., Haemmerling G.J.:Characterization of human B lymphocyte-specific antigen defined by monoclonal antibodies HD6 i HD 39. W: Leukocyte typing II (ed. E.L. Reinherz, B.F.Haynes L.M. Nadler , I.M. Bernstein), Springer , Berlin, 1986, 97-107.
- 83.Nadler L.M., Anderson K.C., Marti G., Bates M., Park E., Daley J.F., Schlosmann S.F.: B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia . A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. J. Clin. Invest. 1984, 74,332-340.
- 84.Nadler L.M.: Bcell/ leukemia panel workshop: summary and comments .W: Leukocyte typing II, (wyd. E.L.Reinherz, B.F.Haynes, L.M.Nadler, I.D. Bernstein) Springer,Berlin,1986, 3-43.
- 85.Neame P.B., Soamboonsrup P., Browman G.P., Meyer R.M., Bengner A., Wilson W.E.C., Walker I.R., Saeed N. and McBride J.A.: Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB -immunologic classification of AML. Blood, 1986, 68, 1355-1362.
- 86.Paietta E., Van Ness B., Bennett J., Racevskis J., Gucalp R., Cassileth P.and Wiernik P.H.: Lymphoid lineage -associated features in acute myeloid leukaemia: phenotypic and genotypic correlations. Br. J. of Haematol., 1992, 82, 324-331.
- 87.Paietta E., Wiernik P.H., Andersen J., Bennett J. and Yunis J.: Acute myeloid leukemia M4 with inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. Blood, 1993, 82, 2595.
- 88.Perentesis J., Ramsay N.K.C., Brunning R., Kersey J.H.& Filipovich A.H.: Biphenotypic leukemia: Immunologic and morphologic evidence for a common

- .lymphoid-myeloid progenitor in humans.J.Pediatr. , 1983, 102, 63-67.
- 89.Pinkel D. : Curing children of leukemia . Cancer, 1987, 59, 1683-1691.
- 90.Potter M.N. : The detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. Blood Rev., 1992, 6, 68-82.
- 91.Pui C.-H., Behm F.G., Singh B., Rivera G.K., Schell M.J., Roberts W.M., Crist W.M.& Mirro J.: Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. Blood, 1990,75, 198-202.
- 92.Radwańska U., Topilko A., Michalewska D., Wachowiak J., Kaftański R.: The diagnostic and prognostic use of cytochemical examinations in children with acute leukemia , evaluated with optic and electron microscope . Mater. Med. Pol.1982, 14, 49-54.
- 93.Reading C.L., Estey E.H., Huh Y.O., Claxton D.F., Sanchez G., Terstappen L.W., O' Brien M.C., Baron S., Deisseroth A.B.: Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. Blood, 1993,3083-3090.
- 94.Reading C.L., Estey E.H., Huh Y.O., Claxton D.F., Sanchez G., Terstappen L.W. M.M., O'Brien M.C., Baron S. and Deisseroth A.B.: Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. Blood, 1993, 81, 3083-3090.
- 95.Reinherz E.L., Schlosmann S.F.: The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell, 1980, 19, 821-827.
- 96.Robak T., Goldman J.M.:Monoclonal antibodies reacting with myeloid cells. Br.J. Haematol., 1985, 61, 1-11.
- 97.Sandhans L.M., Gajl - Peczalska K.J., Brunning R.D.: Immunophenotyping of leukemia : an immunoperoxidase method using air dried smears. Br.J. Haematol., 1984, 56, 131-138.

- 98.Schlossman S.F., Bousmell L., Gilks W., Harlan J.M., Kishimoto T., Morimoto C., Ritz J., Shaw S., Silverstein R.L, Springer T.A., Tedder T.F. , Todd R.F. III eds. 1994, *Lecocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens* . Oxford. Oxford University Press.
- 99.Schmitt-Graff A., Jurgens H., Reifenhause A., Schwamborn D.& Gobel U.: Childhood biphenotypic leukemia: detection of mixed lymphoid and myeloid populations in bone marrow specimens. *Human Pathology*, 1988, 19, 651-656.
- 100.Schwarzinger I., Valent P., Koller U., Marosi C., Schneider B., Haas O., Knapp W., Lechner K., and Bettelheim P. : Prognostic significance of surface marker expression on blasts of patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 1990, 8, 423-430.
- 101.Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, Immunologic and Cytogenetic(MIC) working classification of acute myeloid leukemias. *Br.J. Haematol.*,1988, 68, 487-494.
- 102.Smith L.J., Curtis J.E., Messner H.A., Senn J.S., Furthmayer H.,Mc Culloch E.A.: Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood*, 1983, 61, 1138-1145.
- 103.Sobol R.E., Mick R., Royston I., Davey F.R., Ellison R.R., Newman R., Cuttner J.,Griffin J.D., Collins H., Nelson D.A., Bloomfield C.D. (1987): Clinical importance of myeloid antigen expression in adult lymphoblastic leukemia. *N. Engl.J. of Med.*,316, 1111-1117.
- 104.Solary E., Casasnovas R.O., Campos L., Bene M.C., Faure G., Maingon P., Falken-rodt A., Lenormand B. and Genetet N.: Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+, and CD14+/DR-phenotypes with shorter survival. *Leukemia*, 1992, 6, 393-399.
- 105.Stass S., Mirro J., Melvin S., Pui CH, Murphy S.B., Williams D.: Lineage switch in acute leukemia.*Blood*, 1984, 64, 701-706.
- 106.Stass S.A., Mirro J.Jr.: Lineage heterogeneity in acute leukaemia : mixed lineage-leukaemia and lineage switch.*Clin. Haematol.*, 1986, 15, 811-827.

107. Śtella-Hołowiecka B., Jagoda K., Koehler M., Krzemień S., Hołowiecki J.:
Porównanie klinicznej przydatności immunotypizacji białaczek przy użyciu
metody immunofluorescencyjnej i immunoenzymatycznej APAAP. *Acta Haematol.*
Pol., 1992, 23, 87-94.
108. Storr J., Dolan G., Coustan -Smith E., Barnett D. & Reilly T. : Value of
monoclonal anti-myeloperoxidase (MPO7) for diagnosing acute leukemia. *J. of*
Clin. Pathol., 1990, 43, 847-849.
109. Sulak L.E., Clare C.N., Morale B.A., Hansen K.L. & Montiel M.M.: Biphenotypic
acute leukemia in adults. *Am. J. of Clin. Pathol.* , 1990, 94, 54-58.
110. Tatsumi E., Yoneda N., Kawano S., Yamaguchi N., Yabe H., Nagai K-I, and
Nakayama S. : Expression of CD7 antigen precludes t(8;21)(q22;q22)
chromosome aberration in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 1992, 79, 3091.
111. Te Boekhorst P.A.W., de Leeuw K., Schoester M., Wittebol S., Nooter K.,
Hagemijer A., Löwenberg B. and Sonneveld P. : Predominance of functional
multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute leukemia cells. *Blood*,
1993, 82, 3157-3162.
112. Terstappen L.W.M.M. & Loken M.R.: Myeloid cell differentiation in normal
bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow
cytometry. *Annals of Cell Pathology*, 1990, 2, 229-240.
113. Thiel E. : Biological and clinical significance of immunological cell markers in
leukemia . *Recent Results. Cancer Res.*, 1984, 93, 102-164.
114. Thiel E., Hoelzer D., Doerken B., Loeffler H., Messerer C., Huhn D.: Clinical
relevance of blast cell phenotype as determined with monoclonal antibodies in
acute lymphoblastic leukemia in adults . W: *Haematology and Blood Transfusion*,
Vol.30: *Acute Leukemias* (wyd. T. Buchner , G.Schellong, W.Hiddemann,
D.Urbaniitz , J. Ritter) Springer, Berlin, Heidelberg , 1987, 95-103.
115. Third MIC Cooperative Study Group. Morphologic, Immunologic and
Cytogenetic working classification of the primary myelodysplastic syndromes
and therapy-related myelodysplasias and leukemias. *Cancer Genet. Cytogenet.*,

1988, 32, 1-10.

116. Tucker J., Dorey E., Gregory W.M., Simpson A.P.F., Amess J.A.L., Lister T.A. and Horton M.A. : Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome. *Hematol. Oncol.*, 1990, 8, 47-58.
117. Uckun F.M., Muraguchi A., Ledbetter J.A., Kishimoto T., O'Brien R.T., Rolof J.S., Gajl- Peczalska K., Provisor A. & Koller B.: Biphenotypic leukemic lymphocyte precursors in CD2+, CD19+ acute lymphoblastic leukemia and their putative normal counterparts in human fetal hematopoietic tissues. *Blood*, 1989, 73, 1000-1015.
118. Urbano-Ispizua A., Matutes E., Villamor N., Ribera J.M., Feliu E., Montserrat E., Granena A., Vives-Corrons J.L., Rozman C.: Clinical significance of the presence of myeloid associated antigens in acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J. Haematol.*, 1990, 75, 202-207.
119. Van Dongen J.J.M., Hoojkaas H., Comans- Bitter M., Hahlen K., de Klein A., van Zanen G.E., van't Veer M.B., Abels J. & Benner R.: Human bone marrow cells positive for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), HLA-DR and a T cell marker may represent prothymocytes. *J. of Immunol.*, 1985, 135, 3144-3150.
120. Van't Veer M.R.: The diagnosis of acute leukemia with undifferentiated or minimally differentiated blasts. *Ann. Hematol.*, 1992, 64, 161-165.
121. Vaughan W.P., Civin C.I., Weisenburger D.D., Karp J.E., Graham M.L., Sanger W.G., Grierson H.L., Joshi S.S. and Burke P.J.: Acute leukemia expressing the normal human hemopoietic stem cell membrane glycoprotein CD34(My10). *Leukemia*, 1988, 2, 661-666.

ANEKS:

OPISY KAZUISTYCZNE WYBRANYCH PRZYPADKÓW

Przypadek białaczki dwuklonalnej :

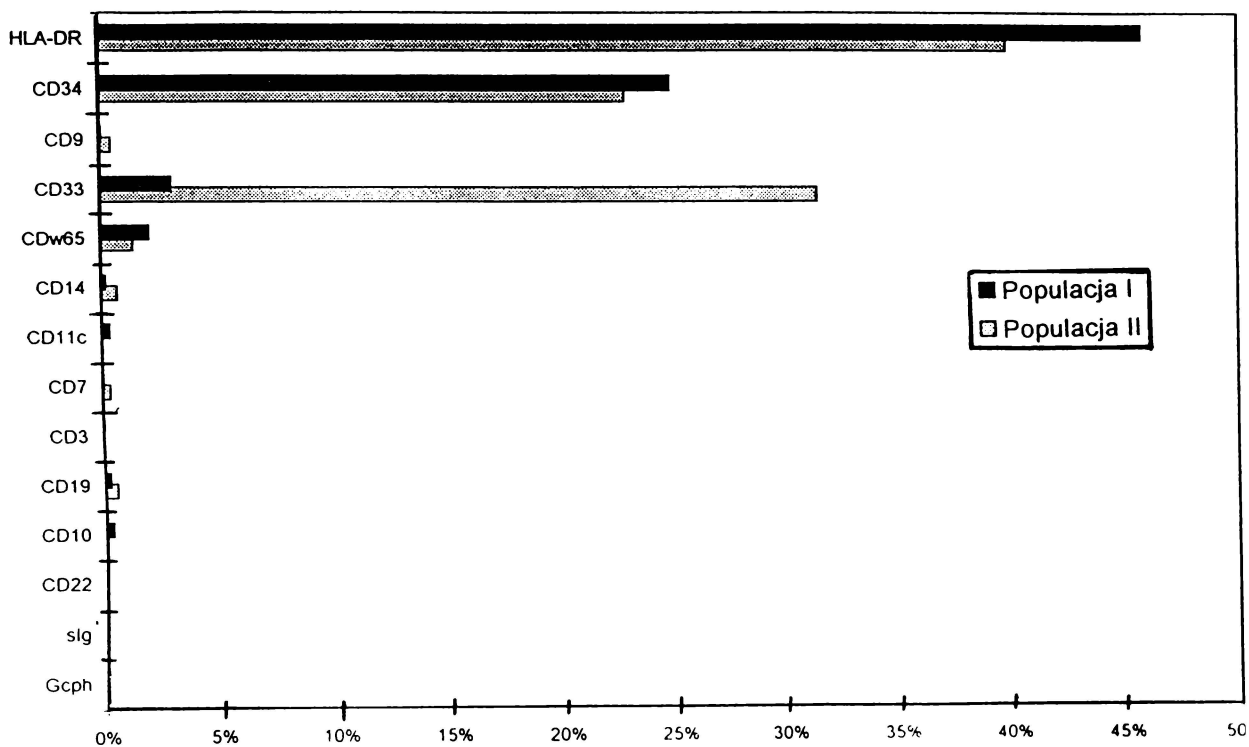
Pacjent P.W . lat 61

Przyjęty do Kliniki z 3 tygodniowym wywiadem osłabienia, podwyższonej ciepłoty ciała , nawracających krwawień z dziąseł i bólów brzucha, bez istotnej przeszłości chorobowej. Ogólny stan chorego bardzo ciężki (w skali Karnofsky'ego 30). Badaniem fizykalnym stwierdzono: na skórze rozległą skazę krwotoczną, krwawienie z dziąseł (wg skali WHO 3) , zmiany grzybicze na śluzówkach jamy ustnej, powiększone pojedyncze węzły chłonne podżuchwowe i pachowe, miernie powiększoną śledzionę , wolny płyn w jamie otrzewnowej. W badaniu radiologicznym ognisko zapalne w prawym płucu i cechy zastojów w krążeniu małym. W badaniach biochemicznych: LDH 630U/l, albuminy 30g/l , mocznik 24mmol/l, kreatynina 230umol/l, kwas moczowy 450umol/l, bilirubina 44umol/l . Wartości morfologii krwi przy przyjęciu: erytrocyty $3,2 \times 10^{12}$ /l, leukocyty 155×10^9 /l (w tym komórki blastyczne 80%), płytki krwi 15×10^9 /l. Szpik obfitokomórkowy, z monoklonalnym naciekiem (95%) komórek blastycznych. Na podstawie morfologii komórek i badania cytochemicznego (jedynie słaba dyfuzyjna reakcja peroksydazowa) rozpoznano typ AML-M1 wg FAB. Badanie immunofenotypu w cytofluorymetrze przepływowym wykazało obecność dwóch populacji komórek blastycznych o fenotypach : HLA-DR (45,9% blastów dodatnich), CD34(25%) oraz HLA-DR (40%), CD34 (23,5%) , CD33(31,6%). Na tej podstawie rozpoznano białaczkę dwuklonalną : z jednoczesną proliferacją populacji komórek nieodróżnicowanych i komórek mieloblastycznych (AUL + AML).

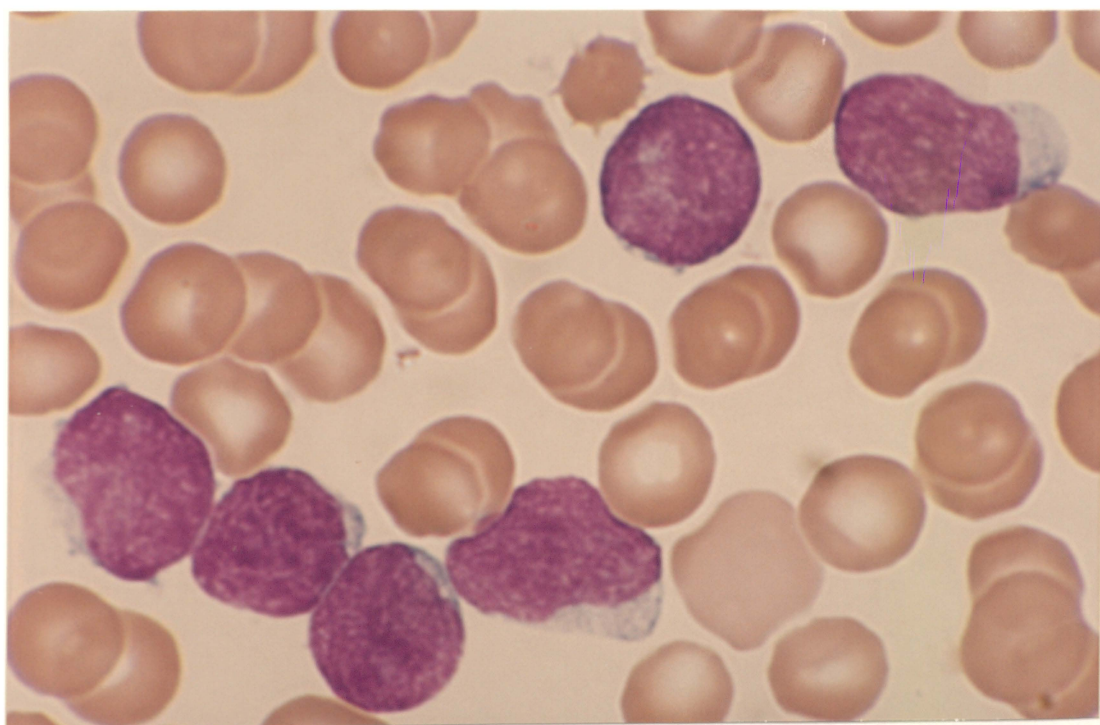
Ze względu na szybko narastające cechy niewydolności nerek (mocznik 34mmol/l, kreatynina 350umol/l , kwas moczowy 650umol/l) , zapalenie płuc oraz postępującą niewydolność krążenia ,pomimo gwałtownie wzrastającej liczby leukocytów (250×10^9 /l) nie podjęto u chorego chemioterapii stosując jedynie leczenie objawowe. Chory zmarł w 6 dobie pobytu w Klinice wśród objawów niewydolności krążeniowo-oddechowej z masywnym obrzękiem płuc. Badanie sekcyjne wykazało wielonarządowe nacieki białaczkowe, uogólnioną skazę krwotoczną , odoskrzelowe włóknikowate zapalenie płuc i obrzęk płuc.

Poniżej przedstawiono charakterystykę immunofenotypową obu klonów komórek blastycznych RYC. I oraz zdjęcie mikroskopowe preparatu szpiku (powiększenie imersyjne) chorego P.W.

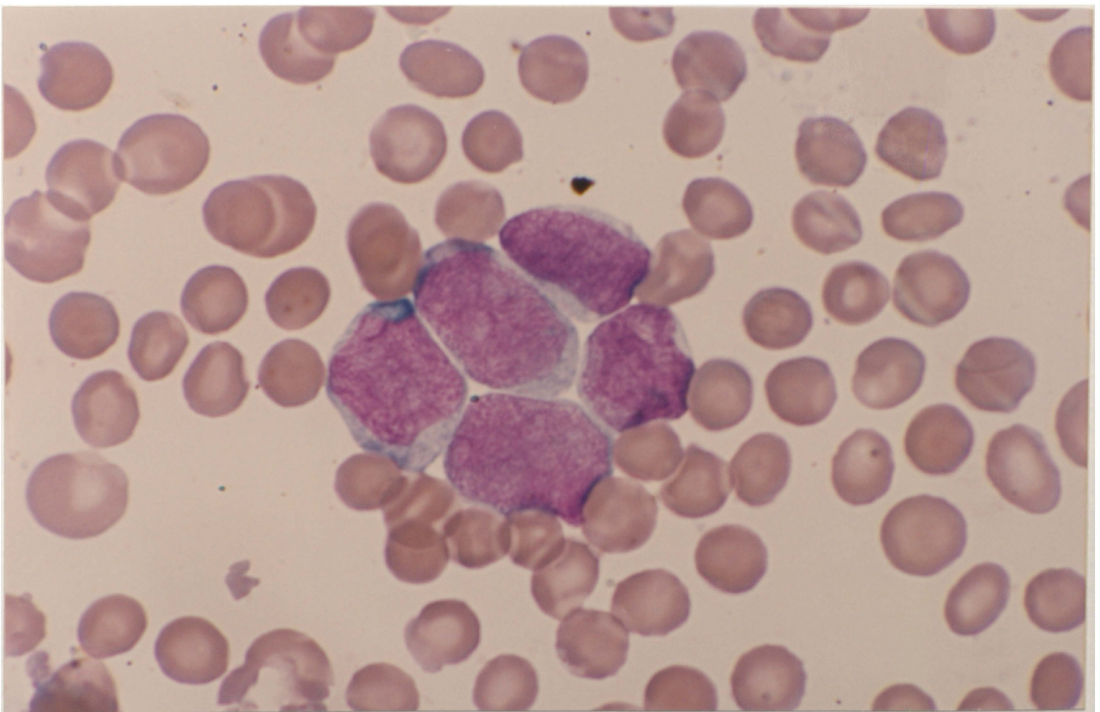
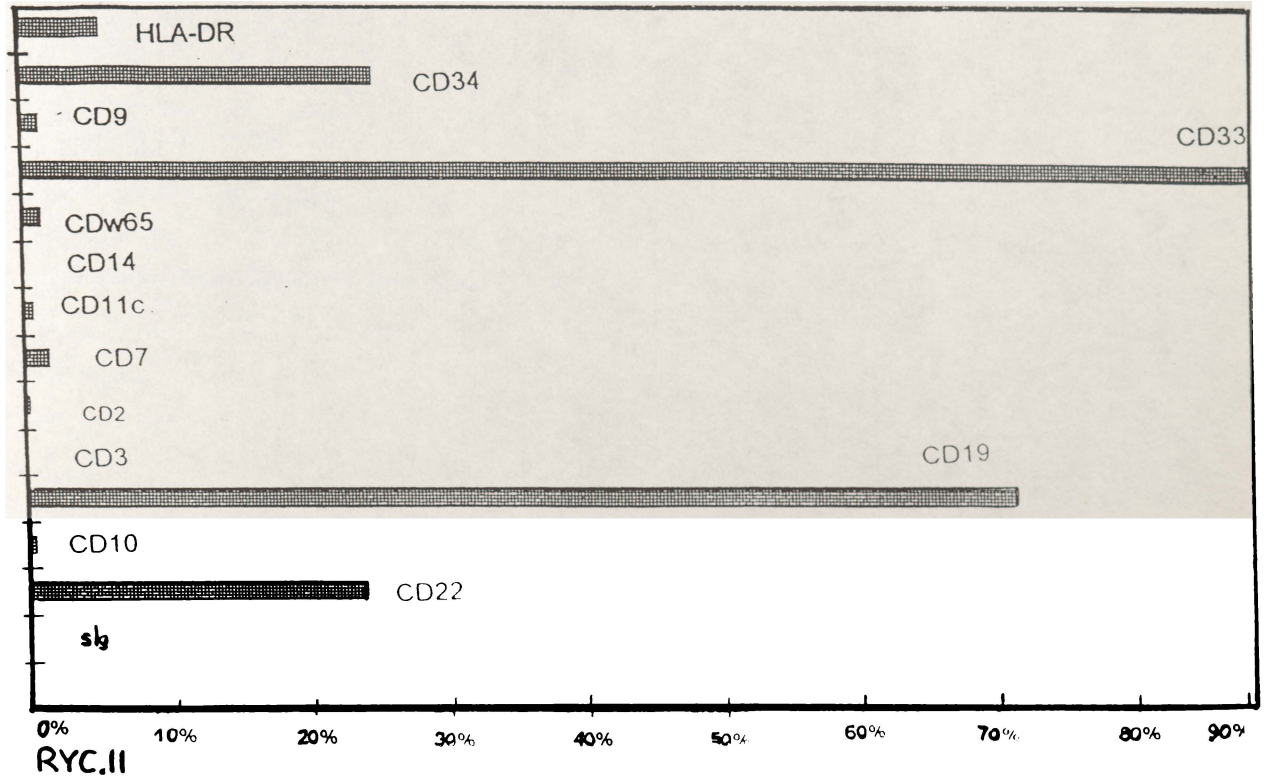
**Przypadek ostrej białaczki dwuklonalnej AML/AUL
u chorego P.S. lat 61**



RYC.I



**Przypadek ostrej białaczki dwufenotypowej AML/ALL-B
u chorej S.L. lat 28**



Przypadek ostrej białaczki limfoblastycznej pre-T z koekspresją markera CD19

Chora B.M. I. 17

Przyjęta do Kliniki z 2 tygodniowym wywiadem podwyższonej ciepłoty ciała, nieżytu górnych dróg oddechowych i niewielkiej duszności. Stan ogólny dość dobry (wg skali Karnofskyego 70). W badaniu fizykalnym stwierdzono bladość powłok, skazę krwotoczną (w skali WHO 2), powiększoną śledzionę (3 cm poniżej lewego łuku żebrowego), drobne węzły chłonne obwodowe. Badanie radiologiczne klatki piersiowej wykazało bardzo znaczne guzowate poszerzenie cienia śródpiersia. Wartości wstępnej morfologii krwi: erytrocyty $2,9 \times 10^{12}/l$, leukocyty $6,2 \times 10^9/l$ (w tym komórki blastyczne 40%), płytki krwi $9 \times 10^6/l$. W badaniach biochemicznych: LDH 1800 U/l, albuminy 30 g/l, mocznik, kreatynina w normie, kwas moczowy 650 $\mu\text{mol}/l$, AspAt 60 U/l, AlAt 45 U/l. Szpik obfitokomórkowy nacieczony monoklonalną populacją komórek blastycznych (90%). Reakcja PAS dodatnia w 10% blastów. Na podstawie morfologii i badania cytochemicznego ustalono typ L 1 wg FAB i wstępne rozpoznanie białaczki T-komórkowej (ze względu na zajęcie śródpiersia). Badanie immunofenotypu w cytofluorymetrze przepływowym wykazało obecność na komórkach blastycznych markerów: HLA-DR (1,05%), CD34 (1,6%), CD9 (2,7%), CD7 (77,6%), CD2 (45,3%), CD3 (5,8%), CD19 (26%), CD10 (0%), CD22 (2,6%), sIg 3,15. Na tej podstawie rozpoznano białaczkę pre-T komórkową z koekspresją markera CD19. Chora otrzymała 2 cykle indukujące w pełnych dawkach (1-3 dnia adriblastyna, 1-5 dnia cytosar, w dniach 1, 8, 15, 22 vincrystyna, sterydy). Uzyskano częściową krótkotrwałą redukcję blastozy w szpiku i krwi obwodowej, połączoną ze wzrostem liczby płytek krwi oraz przejściowe zmniejszenie się masy guza śródpiersia. W 5 miesiącu hospitalizacji nastąpiło gwałtowne powiększenie się śródpiersia i rozsiew białaczkowy do płuc, stan chorej nie pozwalał na podjęcie radio lub chemioterapii. Chora zmarła wśród objawów niewydolności oddechowo-krążeniowej.

Poniżej przedstawiono: zdjęcie wstępnego radiogramu klatki piersiowej, charakterystykę immunofenotypową komórek blastycznych (RYC. III) oraz zdjęcie mikroskopowe preparatu szpiku (powiększenie imersyjne).

Przypadek ostrej białaczki limfoblastycznej pre-T z koekspresją markera CD19 u chorej B.M. I.17.

