

Jacek ROLIŃSKI, Maria ADAMCZYK-CIOCH,
Anna DMOSZYŃSKA, Wojciech LEGIEĆ

Pilotowe wyniki oceny resztkowej choroby białaczkowej u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną typu common

Preliminary Results of Evaluation of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukaemia

WPROWADZENIE

Komórki znacznej części (ponad 50%) chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną B komórkową wykazują ekspresję antygenu CD 19 (marker komórek B) (1, 6) oraz antygenu CD 10 (CALLA – *common acute lymphoblastic leukaemia antigen*), który charakteryzuje niedojrzałe komórki limfoidalne (4, 6). Komórki CD 10⁺/CD 19⁺ występują również w niewielkim odsetku w prawidłowym szpiku, stanowią ok. 3,5% wszystkich komórek szpiku. Wśród populacji limfocytów B CD 19⁺ komórki CD 10⁺/CD 19⁺ stanowią ok. 40% (5). Niewielki odsetek tych komórek w prawidłowym szpiku oraz zwiększoną ilość komórek o wyżej wymienionym fenotypie u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną w okresie „całkowitej remisji” hematologicznej można wykryć wykorzystując cytometr przepływowy. Wykrycie komórek CD 10⁺/CD 19⁺ (które mogą być komórkami blastycznymi) w zwiększonym odsetku (w porównaniu z prawidłowym szpikiem) ma ogromne znaczenie w wyborze odpowiedniego sposobu leczenia, często decyduje o transplantacji szpiku u tych chorych. Obecnie prezentujemy wstępne wyniki monitorowania resztkowej choroby białaczkowej u 7 chorych z CD 10⁺ (CALLA) ostrą białaczką limfoblastyczną z użyciem cytometru przepływowego (Cytron Absolut-Ortho Diagnostic Systems). Wszyscy chorzy w chwili rozpoznania wykazywali silną ekspresję antygenu CD 10 (CALLA) na komórkach blastycznych.

W pracy tej przedstawiono próbę poszukiwania komórek CD 10⁺ w szpiku wyżej wymienionych chorych z chwilą uzyskania całkowitej remisji hematologicznej (jednym z kryteriów było obniżenie odsetka komórek blastycznych poniżej 5% w ocenie morfologicznej). Z uwagi na możliwość ekspresji antygenu CD 10 również na linii granulocytarnej w celu znalezienia interesujących nas komórek blastycznych zastosowaliśmy podwójne znakowanie komórek z użyciem przeciwciał monoklonalnych CD 10 (FITC) i CD 19 (PE), co ma stanowić dowód obecności antygenu CD 10 (CALLA) na limfocytach B (CD 19⁺). Badania zostały wykonane na komórkach pochodzących ze szpiku, gdyż według naszych wcześniejszych, nie opublikowanych doświadczeń, odsetek resztkowych komórek białaczkowych jest znacznie wyższy w szpiku w porównaniu z krwią obwodową.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 7 chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną typu common (4 mężczyzn i 3 kobiety) w wieku od 19 do 46 lat. U wszystkich pacjentów rozpoznanie zostało postawione na podstawie ogólnie przyjętych kryteriów z badaniami immunofenotypu wyłącznie. Wszyscy pacjenci byli w okresie I całkowitej remisji. Badania przeprowadzono w czasie od 2 do 41 miesięcy od chwili uzyskania całkowitej remisji. Czas trwania całkowitej remisji i typ ostrej białaczki według FAB przedstawiono w tab. 1. Parametry hematologiczne chorych w chwili badania obrazuje tab. 2.

Tab. 1. Charakterystyka kliniczna chorych
The clinical characteristics of patients

Pacjent (nr)	Czas trwania CR (w miesiącach)	Typ białaczki wg FAB	Leczenie podtrzymujące w chwili badania
1	41	L1	nie
2	12	L1	nie
3	2	L1	tak
4	14	L1	tak
5	2	L2	tak
6	16	L2	nie
7	10	L2	tak

Tab. 2. Parametry hematologiczne pacjentów w momencie badania
The haematological characteristics of patients during study

Pacjent (nr)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Liczba leukocytów $\times 10^3/\mu$	Limfocytoza $\times 10^3/\mu$	Liczba blastów w szpiku (%)
1	14,0	40,1	4,5	1,6	5
2	14,7	43,5	6,8	1,6	1
3	14,9	43,2	4,7	1,7	5
4	15,6	50,6	6,3	1,3	4
5	15,5	48,0	5,4	1,4	3
6	14,4	45,4	6,6	1,3	3
7	13,3	38,5	3,9	1,4	2

W badaniach immunofenotypu komórek szpiku użyto przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami: izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) i fykoerytryną (PE) firmy Ortho Diagnostic Systems. Znakowanie komórek przeprowadzono w pełnym heparynizowanym szpiku używając następującego zestawu przeciwciał monoklonalnych:

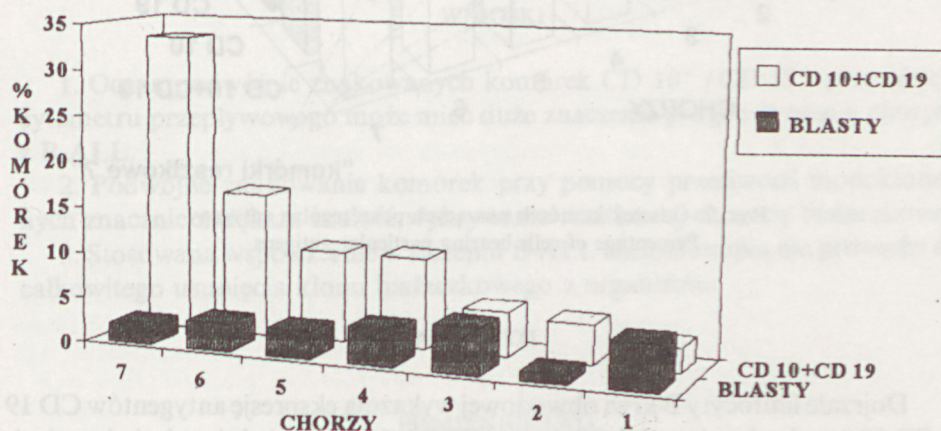
- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1) IgG2a (FITC) negative control, | 1) IG2a (PE) negative control, |
| 2) CD 45 (FITC), | 2) CD 14 (PE), |
| 3) CD 3 (FITC), | 3) CD 19 (PE), |
| 4) CD 10 (FITC), | 4) CD 19 (PE), |
| 5) CD 34 (FITC), | 5) CD 19 (PE). |

Przeciwciała monoklonalne (10 μ l) inkubowano w temp. 4°C przez 30 min. ze 100 μ l szpiku. Następnie lizowano erytrocyty przy użyciu 2 ml płynu lizującego (Lysing Solution-Ortho Diagnostic

Systems). Lizę przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez okres 10 min. Po zakończeniu lizy szpik wirowano w temp. 2-8°C przez 5 min. w 400 xg. Następnie aspirowano supernatant, a komórki zawieszano w 1 ml PBS z dodatkiem 1% surowicy cielęcej i 0,1% azydki sodu. Analizę znakowanych przeciwciałami monoklonalnymi komórek przeprowadzono w cytometrze przepływowym Ortho Cytron Absolute (Ortho Diagnostic Systems) przy użyciu programu komputerowego ABS.

WYNIKI

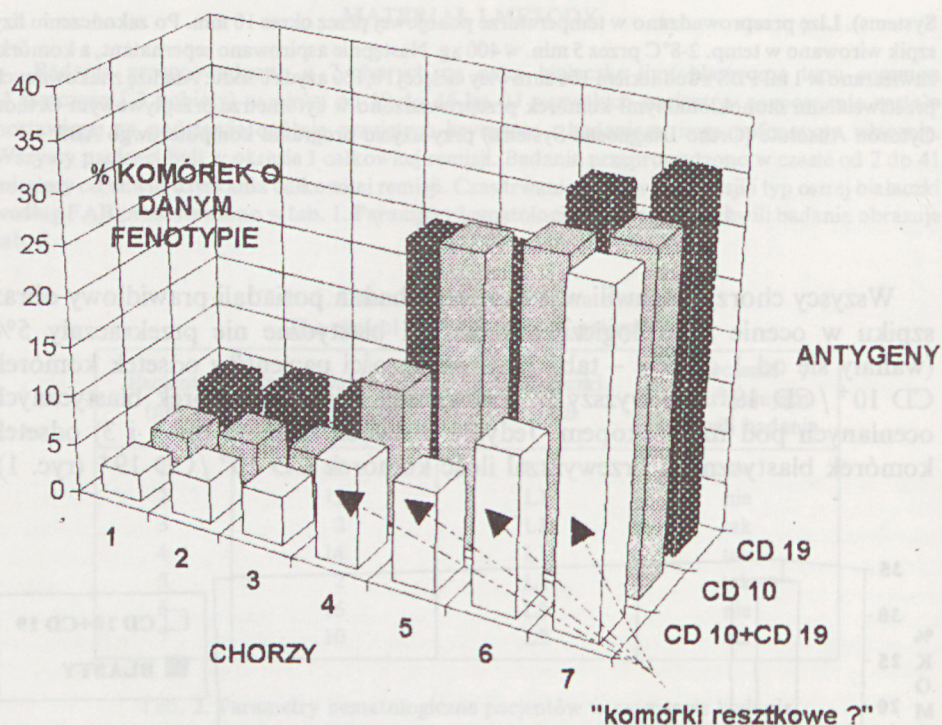
Wszyscy chorzy w chwili wykonywania badań posiadali prawidłowy obraz szpiku w ocenie morfologicznej. Komórki blastyczne nie przekraczały 5% (wahały się od 1 do 5% – tab. 2). U większości pacjentów odsetek komórek CD 10⁺/CD 19⁺ był wyższy w porównaniu z liczbą komórek blastycznych ocenianych pod mikroskopem. Jedynie u dwóch chorych (nr 1 i 3) odsetek komórek blastycznych przewyższał ilość komórek CD 10⁺/CD 19⁺ (ryc. 1).



Ryc. 1. Porównanie odsetka blastów i komórek o fenotypie CD 10⁺ CD 19⁺
Comparison of blast percentage and cell with CD 10⁺ CD 19⁺ phenotype

U siedmiu chorych wykazano obecność komórek CD 10⁺/CD 19⁺ w ilości od 2,7 do 33%, co stanowiło od 40 do 100% limfocytów B CD 19⁺ stwierdzanych u tych pacjentów (ryc. 2).

Odsetek limfocytów B CD 19⁺ znakowanych jednym przeciwciałem wahał się od 4,6% do 35,5% i u wszystkich chorych był wyższy w porównaniu z odsetkiem komórek CD 10⁺/CD 19⁺, podobnie jak odsetek komórek CD 10⁺, który wynosił od 3,0 do 33,2% (ryc. 2). Tylko u jednego chorego (nr 5) ilość komórek CD 10⁺ była większa od liczby komórek CD 10⁺/CD 19⁺. Odsetek komórek CD 34⁺/CD 19⁺ u wszystkich chorych był bardzo niewielki i nie przekraczał 0,3%.



Ryc. 2. Odsetek komórek noszących poszczególne antygeny
Percentage of cells bearing particular antigens

DYSKUSJA

Dojrzałe limfocyty B krwi obwodowej wykazują ekspresję antygenów CD 19 i CD 20 przy braku ekspresji CD 10 (3) i CD 34 (8) w przeciwieństwie do komórek B w prawidłowym szpiku, gdzie można znaleźć niewielką ilość (ok. 0,6%) komórek CD 19⁺/CD 10⁺/CD 34⁺ oraz jeszcze mniejszą populację (tylko 0,1%) komórek CD 19⁺/CD 10⁻/CD 34⁺ (5). Może to być wykorzystane do poszukiwania limfocytów o wyżej wymienionym fenotypie u chorych z B-ALL. Również limfocyty CD 10⁺/CD 19⁺ występują w niewielkim odsetku, ok. 3,5% komórek prawidłowego szpiku, i mogą stanowić punkt odniesienia do oceny resztkowej choroby białaczkowej u chorych z B-ALL typu common. Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają stwierdzić, że u większości badanych pacjentów odsetek komórek CD 10⁺/CD 19⁺ był podwyższony, natomiast odsetek komórek znakowanych tylko anti- CD 10⁺ u trzech chorych był niski i nie przekraczał 6%, u pozostałych czterech był wyższy od 14%. Zaznaczyć należy jednak, że w dostępnej literaturze nie znaleziono norm wiekowych dla wyżej wymienionych subpopulacji limfocytów w prawidłowym szpiku. Według

Ryan i wsp. (7) odsetek komórek CD 10⁺ w prawidłowym szpiku u osób dorosłych wynosi od 2,9% do 6,1% i jest o wiele mniejszy w porównaniu z odsetkiem tych komórek u dzieci (27,4% do 40%). U dwóch z czterech chorych (50%) z wysokim odsetkiem CD 10⁺ i CD 10⁺/CD 19⁺ wystąpił nawrót w okresie od 2 miesięcy do 9 miesięcy od uzyskania całkowitej remisji. Natomiast u pozostałych chorych remisja utrzymuje się nadal.

Podsumowując uważamy, że ocena limfocytów CD 10⁺/CD 19⁺ w cytometrze przepływowym wydaje się być wartościową metodą poszukiwania resztkowej choroby białaczkowej u chorych z B-ALL typu common pod warunkiem opracowania norm dla tej subpopulacji dla różnych grup wiekowych. Istotne jest również zbadanie odpowiedzi prawidłowych limfocytów B na leki cytostatyczne, gdyż zwiększenie ilości komórek CD 10⁺/CD 19⁺ w szpiku pacjentów otrzymujących chemioterapię może być wynikiem szybszego różnicowania się komórek macierzystych CD 34⁺ pod wpływem tych leków.

WNIOSKI

1. Ocena podwójnie znakowanych komórek CD 10⁺/CD 19⁺ przy użyciu cytometru przepływowego może mieć duże znaczenie prognostyczne u chorych z B-ALL.

2. Podwójne znakowanie komórek przy pomocy przeciwciał monoklonalnych znacznie zwiększa czułość wykrywania resztkowej choroby białaczkowej.

3. Stosowana współcześnie w leczeniu B-ALL chemioterapia nie prowadzi do całkowitego usunięcia klonu białaczkowego z organizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson K. C., Bates M. P., Slaughenhoupt B. L., Pinkus G. S., Schlossman S. F., Nadler L. M.: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*, 63, 1424, 1984.
2. Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C., Fackler M. J., Schwartz J. F., Shaper J. H.: Antigen analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133, 157, 1984.
3. Greaves M. F., Hariri G., Newman R. A., Southerland D. R., Ritter M. A., Ritz J.: Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 61, 628, 1983.
4. Greaves M., Delia D., Janosy G., Rapson N., Chessels J., Woods M., Prentice G.: Acute lymphoblastic leukaemia associated antigen. IV Expression on non-leukaemic lymphoid cells. *Leuk. Res.* 4, 15, 1980.
5. Loken M. R., Shah V. O., Dattilio K. L., Civin C. I.: Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70, 1316, 1987.

6. Nadler L. M., Korsmeyer S. J., Anderson K. C., Slaughenhaupt B., Park E., Jensen J., Coral F., Mayer R. J., Sallen S. E., Ritz J., Schlossman S. F.: B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin Invest.* 74, 332, 1984.
7. Ryan D., Kossover S., Mitchell S., Frantz Ch., Hennessy L., Cohen H.: Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood*, 68, 417, 1986.
8. Stashenko P., Nadler L. M., Hardy R., Schlossman S. F.: Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.* 125, 1678, 1980.

SUMMARY

In order to evaluate the minimal residual disease in B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) bone marrow aspirates obtained from seven patients during clinico-haematological remission have been analysed by means of flow cytometry. Blasts of all patients expressed antigen CD 10 (CALLA) during diagnosis time. All patients achieve complete remission. Morphologically normal lymphocytes were double-stained with CD 10 (FITC) and CD 19 (PE) monoclonal antibodies. All seven patients were positive for CD 10⁺ CD 19⁺ cells from 2.7% to 33% of lymphocytes. Evaluation of CD 10 (FITC)/CD 19 (PE) double-stained cells by flow cytometry may be of value in the prognostic of B-ALL.