
Klinika Hematologii. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Anna Dmoszyńska
Zakład Genetyki Medycznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Danuta Rożynkowa

Zofia Monika RUPNIEWSKA, Małgorzata WACH,
Jacek ROLIŃSKI, Halina ANTOSZ, Anna DMOSZYŃSKA,
Ewa WĄSIK, Cezary STĘPNIAK

**Próba różnicowania między szpikowym a pozaszpikowym pochodzeniem
przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej**

An Attempt at Differentiating Between Medullary and Extramedullary Derived B-Cell Chronic
Lymphocytic Leukaemia

WPROWADZENIE

Praca ta jest kontynuacją wcześniejszych badań, w których wykazaliśmy, że u części (4 na 10 badanych) chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną B-komórkową (PBL-B) występują różnice w obrazie powierzchniowych immunoglobulin (SIg) między limfocytami pochodzącymi z krwi obwodowej, szpiku i węzła chłonnego. We krwi obwodowej zwykle występowała monoklonalna populacja limfocytów B, podczas gdy w szpiku lub węzle chłonnym istniała tendencja do poliklonalności. Skłoniło nas to do przyjęcia hipotezy, że różnice te wynikają ze szpikowego lub pozaszpikowego ogniska pierwotnej transformacji białaczkowej. Przy szpikowym pochodzeniu białaczki klon białaczkowy poprzez krew nacieka wtórnie węzły chłonne lub inne struktury limfoidalne, a przy pozaszpikowej białaczkę szpik jest zajęty później, stąd tendencja do poliklonalnego obrazu SIg pomimo monoklonalności we krwi obwodowej (21).

W celu potwierdzenia lub obalenia wysuniętej hipotezy przeprowadzono pełną ocenę fenotypu immunologicznego populacji limfocytów krwi obwodowej i szpiku. Ocena ta obejmowała następujące badania:

- 1) łańcuchów lekkich x i λ na powierzchni limfocytów (SIg x , SIg λ);
- 2) antygenu CD5;
- 3) zdolności tworzenia rozet z erytrocytami myszy (R-EM).

MATERIAŁ

Badaniami objęto 14 chorych z PBL-B.

Rozpoznanie ustalono na podstawie biopsji szpiku, badania morfologicznego krwi obwodowej i badań fenotypu immunologicznego limfocytów krwi obwodowej i szpiku. U większości chorych przeprowadzono także biopsję węzła chłonnego (tab. 1).

W ocenie lokalizacji głównej masy nowotworowej oparto się na kryteriach podanych przez Jakśicia i Vitalego (16), Working Group sponsorowanej przez NCI (8) oraz obserwacjach własnych. Na podstawie wcześniej opublikowanych badań własnych (21) oraz piśmiennictwa, prace pogładowej (22) chorych z PBL-B podzielono na 3 grupy. Charakterystykę tych grup podano w tab. 2.

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

Liczba chorych:	14
Wiek w latach:	39– 68, średnio 52 (7 chorych poniżej 50 r.ż.)
Płeć:	męska
Okres kliniczny przewlekłej białaczki limfatycznej według Rai i wsp. (19)	
	okres 2 — 3 chorych
	okres 3 — 1 chory
	okres 4 — 10 chorych
Czas trwania choroby:	od 2 miesięcy do 6 lat*
	w tym do 2 lat — 10 chorych
	od 2 do 6 lat — 4 chorych
Choroby towarzyszące:	
nawracające infekcje (zwykle w drogach moczowych lub oddechowych) —	14 chorych
przewlekłe lub aktywne zapalenie wątroby po przebytej żółtaczce zakaźnej —	3 chorych
gruźlica płuc —	1 chory
niedokrwistość autoimmunohemolityczna —	2 chorych
Uprzednie leczenie:	
chemoterapia, w skład której wchodziły cykle trójlewkowe (zwykle układ Chlorambucil, Oncovin, Prednison) lub czterolewkowe (zwykle układ Adiamyacin, Cyclophosphamid, Oncovin, Prednison) —	6 chorych
nie leczonych —	8 chorych

* Czas trwania choroby, określany przez pacjentów jako kilkumiesięczny, nie musi być prawdziwy, gdyż zwykle wiążą oni pierwsze objawy choroby dopiero z powiększeniem się obwodowych węzłów chłonnych; brak w naszym materiale pacjentów w okresie 0 lub 1 według klasyfikacji Rai i wsp. (19).

METODY

Fenotyp immunologiczny limfocytów badano w populacji komórek krwi obwodowej i szpiku. W uzyskanych zawiesinach limfocytów wykonywano następujące testy:

1. Testy immunofluorescencyjne służące do określenia odsetków limfocytów noszących na powierzchni łańcuchy lekkie κ lub λ (21).

2. Antygen CD5 badano stosując monoklonalne przeciwciało CD5 sprzężone z FITC firmy „Serotec” i postępowano zgodnie z zaleceniem producenta. Po sprzężeniu komórek z przeciwciałem obliczano odsetek komórek „świejących” w mikroskopie fluorescencyjnym na 1000 komórek.

3. Test określający zdolność limfocytów do tworzenia R-EM wykonywano w modyfikacji własnej w następujący sposób: 50 μ l zawiesiny limfocytów mieszano z 50 μ l płodowej surowicy cielej absorbowanej erytrocytami myszy i 50 μ l 5% zawiesiny erytrocytów myszy. Zawiesinę wirowano przez 2 min. na niskich obrotach (450 \times g) i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez

Tab. 2. Ocena lokalizacji masy komórek nowotworowych
Estimates of location of the main mass of tumour cells

- I — grupa chorych, u których w obrazie klinicznym przeważa zajęcie struktur limfoidalnych jamy brzusznej i/lub masywne zajęcie obwodowych węzłów chłonnych*; w grupie tej istnieje możliwość pozaszpikowej lokalizacji pierwotnego ogniska transformacji nowotworowej
- II — grupa chorych, u których w obrazie klinicznym przeważa zajęcie szpiku bez lub przy współistnieniu niewielkiego stopnia powiększenia obwodowych węzłów chłonnych i śledziony; w grupie tej prawdopodobnie pierwotne ognisko transformacji nowotworowej znajduje się w szpiku
- III — grupa pośrednia — chorzy z dużą masą guza w strukturach limfoidalnych (masywne powiększenie węzłów chłonnych jamy brzusznej i śledziony, czemu zwykle towarzyszy różnego stopnia powiększenie obwodowych węzłów chłonnych) oraz objawami niewydolności szpiku**; w grupie tej pierwotne ognisko transformacji nowotworowej może leżeć zarówno pozaszpikowo (wtórne zajęcie szpiku), jak i w szpiku (wtórne zajęcie pozaszpikowych struktur limfoidalnych)

* „Zajęcie struktur limfoidalnych jamy brzusznej” oznacza występowanie konglomeratów węzłów chłonnych w obrębie jamy brzusznej, widoczne w tomografii komputerowej lub w badaniu ultrasonograficznym. Powiększeniu węzłów chłonnych towarzyszy umiarkowane (do 6 cm poniżej lewego łuku żebrowego) lub znaczne (powyżej 6 cm) powiększenie śledziony. „Masywne zajęcie obwodowych węzłów chłonnych” oznacza powiększenie węzłów chłonnych powyżej 5 cm średnicy, zwykle tworzących konglomeraty.

** Objawy „niewydolności szpiku” oznaczają niedokrwistość (Hb poniżej 10 g/dl) i/lub małopłytkowość (liczba płytek poniżej $100 \times 10^9/l$).

60 min. Następnie bardzo delikatnie wstrząsając osad powtórnie zawieszano. Zawiesinę komórek w szklanej komorze oglądano w mikroskopie świetlnym. Z 1000 komórek obliczano odsetek limfocytów wiążących więcej niż 3 erytrocyty myszy. Wartości prawidłowe badanych parametrów zestawiono w tab. 3.

METODY STATYSTYCZNE

Uzyskane wyniki oceniano określając: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, współczynnik korelacji Pearsona (r), test Studenta (t) i prawdopodobieństwo (P).

WYNIKI

Celem oceny klonalności proliferujących komórek badano we krwi i w szpiku odsetek komórek noszących na powierzchni łańcuchy lekkie bądź x , bądź λ . Wyniki badań w poszczególnych grupach chorych zestawiono w tab. 4.

U wszystkich chorych z grupy I stwierdzono monoklonalność limfocytów B we krwi obwodowej. Natomiast w szpiku u 3 na 6 badanych (przypadki 1, 2 i 3) występowała tendencja do poliklonalności (odsetek komórek noszących inny łańcuch lekki niż klon proliferujący był wyższy w szpiku niż we krwi obwodowej), co może sugerować późniejsze zajęcie szpiku.

Przeciwnie, u chorych z grupy II — przy monoklonalności w szpiku — u których we krwi obwodowej w 3 przypadkach (przypadki 1, 2 i 3) występowała tendencja do poliklonalności. Wyniki te wskazują, że pomimo

Tab. 3. Wartości prawidłowe badanych parametrów
Normal values of investigated parameters

Parametry	Krew obwodowa	Szpic
Procent komórek noszących powierzchniowe immunoglobuliny (komórek B)	20—25% (badania własne) 10—20% (6)	średnio 11% — komórek B CD19 ⁺ (7)
Stosunek komórek noszących na powierzchni łańcuch x do komórek z łańcuchem λ	2:3 (6)	brak danych
Procent komórek CD5 ⁺	15—25% (8) powyżej 30% wskazuje na proliferację (9)	0 lub ilości śladowe (9; badania własne)
Procent komórek tworzących rozety z erytrocytami myszy	0—3% (badania własne) powyżej 30% wskazuje na proliferację (9)	powyżej 10% wskazuje na proliferację (9)

Tab. 4. Porównanie odsetków limfocytów noszących łańcuchy lekkie λ lub x we krwi obwodowej z analogicznymi odsetkami limfocytów w szpiku w poszczególnych grupach chorych z PBL-B
The comparison of percentages of peripheral blood lymphocytes carrying λ or x light chains to analogical lymphocytes of bone marrow in particular groups of B-CLL patients

Grupa	L.p.	Synonim	Procent komórek noszących łańcuchy lekkie							
			we krwi obwodowej				w szpiku			
			λ	x	klonalność		λ	x	klonalność	
					mono-	poli-			mono-	poli-
I	1	Ł. St.	55	2	+		63	11	±	
	2	J. E.	29	4	+		43	9	±	
	3	K. K.	1	10	+		7	28	±	
	4	B. J.	9	35	+		4	35	+	
	5	Ż. Zd.	62	2	+		58	0,5	+	
	6	K. E.	29	16	+		43	4	+	
II	1	S. J.	46	22		+	69	17	+	
	2	K. St.	19	26		+	10	33	+	
	3	Z. K.	95	52		+	78	12	+	
	4	B. J.	0	40	+		5	15	+	
III	1	P. B.	62	8	+		66	0	+	
	2	M. St.	3	62	+		5	83	+	
	3	G. L.	9	27	+		16	17		+
	4	K. St.	4	42	+		2	72	+	

masywnego nacieczenia szpiku (miejsce pierwotnej transformacji?) krew nie jest jeszcze całkowicie zajęta przez klon białaczkowy.

U wszystkich chorych z grupy III stwierdzono monoklonalność we krwi obwodowej, ale w szpiku u 1 chorego (przypadek 3) występowała poliklonalność. U tego chorego we krwi obwodowej dominował klon x , natomiast w szpiku stosunek $\lambda+$ do $x+$ wynosił 1:1. A zatem występowało w tym przypadku

podobieństwo do chorych 1, 2 i 3 z grupy I, u których w szpiku, jakkolwiek w znacznie mniejszym stopniu, obserwowano tendencję do poliklonalności.

W tab. 5 przeprowadzono porównanie odsetka limfocytów noszących antygen CD5 we krwi obwodowej i w szpiku z obrazem klinicznym chorych z PBL-B.

Tab. 5. Porównanie odsetków limfocytów noszących antygen CD5 we krwi obwodowej i w szpiku z obrazem klinicznym chorych z PBL-B

The comparison of percentages of lymphocytes carrying the CD5 antigen in peripheral blood and bone marrow with the clinical states of B-CLL patients

Grupa	Liczba badanych	Procent komórek CD5 ⁺						Krew obwodowa a szpik		
		Krew obwodowa			Szpik					
		wartości graniczne	<i>M</i>	$\pm SD$	wartości graniczne	<i>M</i>	$\pm SD$	<i>r</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
I	6	27—50	38,5	$\pm 9,07$	2—62	26,7	$\pm 21,54$	+0,190	0,388	>0,70
II	4	10—75	44,8	$\pm 26,7$	43—82	64,3	$\pm 16,07$	+0,996	16,379	<0,01
III	4	32—66	48,0	$\pm 17,03$	15—47	29,25	$\pm 13,72$	-0,442	0,697	<0,50

Objaśnienia: *M* — średnia arytmetyczna, $\pm SD$ — odchylenie standardowe, *r* — współczynnik korelacji Pearsona, *t* — test Studenta, *P* — prawdopodobieństwo.

Explanation: *M* — arithmetic mean, $\pm SD$ — standard deviation, *r* — Pearson's correlation coefficient, *t* — Student test, *P* — probability.

W grupie I chorych średnia arytmetyczna odsetka komórek CD5⁺ we krwi obwodowej wynosiła 38,5%, w szpiku 26,7%. Jednakże pomimo wyraźnej przewagi odsetkowej komórek CD5⁺ we krwi obwodowej nad odsetkiem tych komórek w szpiku różnice nie były statystycznie istotne, być może, wskutek małej liczby badanych. Przy analizowaniu badań poszczególnych chorych z tej grupy wykazano, że u 4 na 6 badanych odsetek komórek CD5⁺ był ponad dwukrotnie wyższy we krwi obwodowej niż w szpiku. U tych 4 chorych średnia arytmetyczna odsetka komórek CD5⁺ we krwi obwodowej wynosiła 36,2%, w szpiku 15,7%. U piątego chorego (K. E.) odsetek komórek CD5⁺ we krwi obwodowej i w szpiku był bardzo zbliżony (30% we krwi, 35% w szpiku), a tylko u szóstego z badanych (Ż. St.) był wyraźnie wyższy w szpiku (46% we krwi, 62% w szpiku). Oceniając wyniki uzyskane u poszczególnych chorych, nie można wykluczyć hipotezy, że w przypadkach przebiegających z przewagą zajęcia struktur limfoidalnych nad zajęciem szpiku pierwotne ognisko transformacji nowotworowej znajduje się albo w węzłach chłonnych, albo w śledzionie.

W grupie II chorych średnia arytmetyczna odsetka komórek CD5⁺ we krwi obwodowej wynosiła 44,8%, w szpiku 64,3% i różnice te były statystycznie istotne ($r = +0,996$, $t = 16,379$, $P < 0,01$). Istnienie takiej wysoce istotnej ($P < 0,01$) dodatniej korelacji ($r = +0,996$) pomiędzy odsetkiem komórek CD5⁺

we krwi i w szpiku sugeruje, że w grupie chorych, u których w obrazie klinicznym przeważa zajęcie szpiku, pierwotna transformacja nowotworowa ma właśnie tam miejsce. Co więcej, u 3 chorych z tej grupy (przypadki 1, 2 i 3) we krwi obwodowej istniała poliklonalność łańcuchów lekkich na powierzchni limfocytów B przy monoklonalności w szpiku (patrz tab. 4).

Najciekawsza była grupa III badanych, u których obok masywnego nacieczenia struktur limfoidalnych (zarówno w jamie brzusznej, jak i w obwodzie) występowały objawy niewydolności szpiku (niedokrwistość i/lub małopłytkowość). Na podstawie obrazu klinicznego u tych chorych nie można było zatem ustalić przypuszczalnego miejsca pierwotnej transformacji nowotworowej. Wprawdzie średnia arytmetyczna dla całej tej grupy odsetka komórek CD5⁺ we krwi obwodowej była wyraźnie wyższa niż w szpiku (48% we krwi, 29% w szpiku), ale różnice nie były statystycznie istotne. Jednakże przy analizowaniu poszczególnych przypadków wykazano, że u 3 na 4 badanych pacjentów odsetek komórek CD5⁺ był ponad dwukrotnie wyższy we krwi obwodowej niż w szpiku (średnia arytmetyczna odsetka komórek CD5⁺ we krwi obwodowej 53,3%, w szpiku 23,3%). U jednego z tych chorych (przypadek 3) niższemu poziomowi komórek CD5⁺ w szpiku w stosunku do krwi obwodowej towarzyszyła poliklonalność łańcuchów lekkich na powierzchni szpikowych komórek B (komórki λ + — 16%, x + — 17%) pomimo monoklonalności we krwi obwodowej (patrz tab. 4). U tego chorego oznaczono dodatkowo odsetek komórek CD5⁺ we krwi obwodowej przed i w 3 godz. po dożylnym podaniu 200 mg Hydrocortisonu (w okresie najwyższego wzrostu leukocytozy). Leukocytoza przed podaniem Hydrocortisonu wynosiła $4,6 \times 10^9/l$, po podaniu — $6,6 \times 10^9/l$, odsetek komórek CD5⁺ we krwi obwodowej przed podaniem — 44%, po podaniu 53%. Test hydrokortyzonowy służy do określenia tzw. rezerwy szpikowej leukocytów, ale w przebiegu PBL-B nie można wykluczyć uwalniania limfocytów z ognisk pozaszpikowych. Pomimo tego zastrzeżenia u badanego zarówno wzrost leukocytozy, jak i odsetek komórek CD5⁺ po Hydrocortisonie był stosunkowo niewielki. Wynik ten może sugerować, że albo populacja komórek CD5⁺ w szpiku była stosunkowo nieliczna, albo komórki te były silnie związane ze zrębem szpikowym i nie zostały „wyplukane” do krwi obwodowej przez Hydrocortison. Wyniki te, podobnie jak w grupie I badanych, sugerują wtórne zajęcie szpiku.

W tab. 6 zestawiono wyniki badań trzeciego markeru charakteryzującego komórki PBL-B, a mianowicie zdolności limfocytów białaczkowych do tworzenia R-EM. Odsetki rozetkujących komórek we krwi obwodowej i w szpiku porównywano, podobnie jak w tab. 5, z obrazem klinicznym.

W grupach II i III chorych średnie arytmetyczne odsetka komórek R-EM + we krwi obwodowej i w szpiku były zbliżone, przy czym odsetki te, zwłaszcza dla krwi obwodowej, były stosunkowo niskie. U 2 pacjentów z grupy II, w której w obrazie klinicznym przeważało zajęcie szpiku, średnia arytmetyczna odsetka

Tab. 6. Porównanie zdolności tworzenia rozet z erytrocytami myszy (R-EM) przez limfocyty krwi obwodowej i w szpiku z obrazem klinicznym chorych z PBL-B
The comparison of capability for forming mouse erythrocyte rosettes (MER) by lymphocytes of peripheral blood and bone marrow with the clinical states of B-CLL patients

Grupa	Liczba badanych	Procent komórek tworzących R-EM						Krew obwodowa a szpik		
		Krew obwodowa			Szpik					
		wartości graniczne	<i>M</i>	$\pm SD$	wartości graniczne	<i>M</i>	$\pm SD$	<i>r</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
I	6	11—56	28,5	$\pm 21,08$	6—49	26,67	$\pm 13,79$	+0,080	0,161	>0,80
II	2	11 i 22	16,5	$\pm 7,78$	33 i 52	42,5	$\pm 13,44$			
III	4	7—44	22,0	$\pm 15,9$	15—46	31,5	$\pm 13,48$	-0,854	2,323	>0,10

Objaśnienia: R-EM — zdolność tworzenia rozet przez limfocyty z erytrocytami myszy, *M* — średnia arytmetyczna, $\pm SD$ — odchylenie standardowe, *r* — współczynnik korelacji Pearsona, *t* — test Studenta, *P* — prawdopodobieństwo.

Explanation: R-EM — capability for forming mouse erythrocyte rosettes by lymphocytes, *M* — arithmetic mean, $\pm SD$ — standard deviation, *r* — Pearson's correlation coefficient, *t* — Student test, *P* — probability.

komórek R-EM⁺ była ponad 2 razy wyższa w szpiku niż we krwi obwodowej, co przemawia za jego pierwotnym zajęciem. U tych pacjentów porównano odsetki komórek R-EM⁺ we krwi i w szpiku z odsetkami komórek CD5⁺ (tab. 7). U obu odsetek zarówno komórek R-EM⁺, jak i CD5⁺ był istotnie wyższy w szpiku niż we krwi obwodowej. Wynik ten potwierdza naszą wcześniejszą sugestję, opartą na badaniach łańcuchów λ i κ na powierzchni limfocytów oraz antygenu CD5, że u chorych z przewagą zajęcia szpiku w obrazie klinicznym tam ma właśnie miejsce pierwotna transformacja nowotworowa.

Tab. 7. Porównanie odsetków komórek R-EM⁺ oraz komórek CD5⁺ we krwi obwodowej i w szpiku u 2 chorych z PBL-B, u których w obrazie klinicznym przeważa zajęcie szpiku
The comparison of percentages of MER⁺ and CD5⁺ cells in peripheral blood and bone marrow of 2 B-CLL patients, in whom bone marrow infiltration was predominant

L.p.	Synonim	Krew obwodowa		Szpik	
		Procent komórek			
		R-EM ⁺	CD5 ⁺	R-EM ⁺	CD5 ⁺
1	S. J.	11	46	52	67
2	K. St.	22	10	33	43
Średnia arytmetyczna		16,5 \pm 7,78	28,0 \pm 25,46	42,5 \pm 13,44	55,0 \pm 16,97

OMÓWIENIE

Wyniki badań łańcuchów lekkich powierzchniowych immunoglobulin limfocytów krwi obwodowej i szpiku (tab. 4) oraz antygeny CD5 (tab. 5) w wyodrębnionych 3 grupach chorych (grupa I — chorzy z przewagą zajęcia struktur limfoidalnych w jamie brzusznej i/lub obwodowych węzłów chłonnych; grupa II — chorzy z przewagą nacieczenia szpiku; grupa III — chorzy z dużą masą guza w strukturach limfoidalnych oraz objawami niewydolności szpiku) sugerują, że u pacjentów z przewagą zajęcia struktur limfoidalnych, nawet przy współistniejących objawach niewydolności szpiku, pierwotne ognisko transformacji leży pozaszpikowo (w węzłach chłonnych lub śledzionie). Szpik zostaje zajęty dopiero później przez szerzący się drogą krwi (jak wynika z naszych badań), a być może także innymi drogami, klon limfoidalny.

U chorych tych istnieje konieczność różnicowania między PBL-B a inną jednostką morfologiczną — chłoniakiem B-komórkowym o małych limfocytach (CML-B) *small lymphocytic lymphoma* (5, 12, 24). Na ogół przyjęto, że PBL-B charakteryzuje zwiększona liczba małych limfocytów o dojrzałym wyglądzie naciekających, przynajmniej we wczesnym okresie choroby, wyłącznie szpik i występujących wtórnie we krwi obwodowej (5, 11, 12, 18, 24). Natomiast w CML-B identycznie morfologicznie nowotworowe komórki przynajmniej we wczesnym okresie występują wyłącznie w tkankach (węzłach chłonnych, śledzionie), bez białaczkowego zajęcia krwi obwodowej i szpiku (5). Jednakże w ok. 40% przypadków w CML-B zachodzi ewolucja w postać białaczkową, nieodróżnialną od PBL-B (11, 12).

Badania markerów immunologicznych nowotworowych komórek ujawniły ściśle podobieństwo w obu stanach chorobowych (3, 5). Mianowicie charakteryzuje je:

- 1) zmniejszona ekspresja powierzchniowych immunoglobulin (1—4, 13, 15, 17, 18);
- 2) ekspresja antygeny CD5, (3)-antygeny, który do niedawna był uważany za antygen komórek T;
- 3) występowanie antygenów komórek B, takich jak: CD19, CD20, CD24 i HLA-DR (3, 4, 17);
- 4) zdolność do tworzenia rozet z erytrocytami myszy (3, 7, 13).

Pomimo tych daleko idących podobieństw zarówno klinicznych, jak i morfologicznych, a także immunologicznych białaczkowych komórek, sądzimy, że odróżnienie białaczkowej fazy CML-B od PBL-B jest możliwe na podstawie różnic między krwią a szpikiem w odsetkach limfocytów noszących łańcuchy lekkie immunoglobulin bądź CD5⁺. W PBL-B w szpiku występuje monoklonalność i odsetek komórek CD5⁺ jest wyższy niż we krwi obwodowej. W CML-B — odwrotnie, monoklonalność i przewaga odsetkowa komórek CD5⁺ występuje we krwi obwodowej. Obie jednostki zatem stanowią odmienną ekspresję tkankową niekoniecznie identycznego procesu nowotworowego.

Z kolei zarówno PBL-B, jak i CML-B należy różnicować z chłoniakiem o kosmatych limfocytach (*splenic lymphoma with villous lymphocytes*). Kosmate limfocyty są nieco większe od małych limfocytów PBL-B, a z ich powierzchni wychodzą rzadkie, krótkie kosmki, często zgrupowane na biegunkach komórki. Ich fenotyp immunologiczny charakteryzuje monoklonalna warstwa powierzchniowych immunoglobulin, obecność innych antygenów typowych dla limfocytów B (CD19, CD20, CD22, HLA-DR), ale także antygeny FMC-7 cechującego białaczkę kosmatokomórkową. Natomiast komórki te są CD5 ujemne, a u $\frac{2}{3}$ chorych występuje monoklonalna gammapatia (4).

Jeśli idzie o zdolność limfocytów białaczkowych do tworzenia R-EM (tab. 6), to zarówno u chorych z grupy I, jak i III średnia arytmetyczna odsetka komórek tworzących R-EM była niska tak we krwi obwodowej, jak i w szpiku. Ba t a t a i Shen (3) przyjmują, że za proliferacją przemawiają wartości powyżej 30% komórek R-EM⁺ we krwi obwodowej. W naszych badaniach w grupie I wartość ta wynosiła 28,5%, w grupie III — 22%. Ba t a t a i Shen (2, 3) podają także, że R-EM tworzą zarówno komórki PBL-B, jak i CML-B. Natomiast zdaniem autorów prowadzących badania w pierwszej połowie lat siedemdziesiątych, o ile 90% limfocytów PBL-B posiada zdolność tworzenia R-EM, o tyle komórki tzw. dobrze zróżnicowanego chłoniaka limfocytowego (*well-differentiated lymphocytic lymphoma*) są pozbawione tej właściwości (23). Być może, stosunkowo niskie odsetki komórek R-EM⁺ we krwi obwodowej u naszych chorych wynikają stąd, że znajdowali się oni w białaczkowej fazie CML-B.

W obu tych grupach analiza statystyczna przeprowadzona między komórkami CD5⁺ a komórkami R-EM⁺ nie wykazała korelacji ani we krwi obwodowej, ani w szpiku. W grupie I dla krwi obwodowej: $r = +0,035$, $t = 0,070$, $P > 0,90$, dla szpiku: $r = 0,340$, $t = 0,722$, $P > 0,50$. W grupie III dla krwi obwodowej: $r = +0,688$, $t = 1,342$, $P > 0,30$, dla szpiku: $r = +0,424$, $t = 0,663$, $P > 0,50$. Ten brak korelacji może świadczyć o istnieniu subklonów komórek limfoidalnych u chorych z pierwotnie pozaszpikowym miejscem transformacji. Znaną sprawą jest występowanie u pewnych pacjentów z chłoniakami kilku subklonów komórek B. Tak na przykład w badaniach immunofenotypowych limfocytów u chorych z chłoniakami — które rozwinęły się w przebiegu wrodzonych lub nabytych niedoborów immunologicznych, albo u chorych z tzw. chłoniakami „złożonymi” (*“composite” lymphoma*), tzn. chłoniakami, które u tego samego pacjenta w tym samym lub dwu różnych węzłach chłonnych dają dwa odmienne obrazy histopatologiczne — zwykle stwierdza się istnienie dwu lub więcej subklonów komórek nowotworowych (14, 22). Zwłaszcza często (w 10—15% przypadków) taką biklonalność fenotypu obserwowano (10) w chłoniaku grudkowym (*follicular lymphoma*).

Ten brak korelacji między komórkami CD5⁺, a komórkami R-EM⁺ nasuwa pytanie, czy antygen CD5, o którym wiadomo, że jest markerem białaczkowych komórek PBL-B (20), istotnie charakteryzuje odrębną subpopulację

komórek B, odmienną od komórek R-EM⁺, albo czy ten brak korelacji wynika z tego, że CD5 występuje także na komórkach T. Wskazane więc byłyby dalsze badania i przeprowadzenie korelacji między komórkami CD5⁺ a komórkami noszącymi antygeny komórek B lub komórek T.

Wnioski

1. Spośród trzech markerów komórek PBL-B (powierzchniowe łańcuchy λ i κ , antygen CD5 i zdolność tworzenia rozet z erytrocytami myszy) najbardziej użyteczny do rozpoznawania miejsca szpikowej lub pozaszpikowej pierwotnej transformacji nowotworowej jest antygen CD5.

2. Wyższy odsetek komórek CD5⁺ we krwi obwodowej niż w szpiku przemawia za pozaszpikową lokalizacją pierwotnej transformacji nowotworowej. Natomiast wyższy odsetek komórek CD5⁺ w szpiku niż we krwi obwodowej sugeruje lokalizację szpikową pierwotnego ogniska transformacji.

3. Badania antygeny CD5 mogą ułatwić różnicowanie między przewlekłą białaczką limfatyczną a białaczkową fazą chłoniaka o małych limfocytach również wychodzącego z komórek B. W pierwszym przypadku odsetek limfocytów CD5⁺ jest wyższy w szpiku, a w drugim — we krwi obwodowej. Takie różnicowanie z punktu widzenia lekarza-praktyka ma zarówno znaczenie prognostyczne (częstsza transformacja chłoniaka o małych limfocytach w chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości oraz częste występowanie infekcji zagrożających życiu), jak i terapeutyczne. W przewlekłej białaczce limfatycznej bardziej celowa wydaje się chemoterapia, natomiast w chłoniaku, nawet w jego fazie białaczkowej, opowiadamy się raczej za radioterapią (nie publikowane obserwacje własne).

PIŚMIENNICTWO

1. Batata A., Shen B.: Importance of surface immunoglobulin, mouse rosettes and CD5 in immunophenotyping of chronic lymphocytic leukemia and reactive lymphocytosis. *Cancer* **68**, 355, 1991.
2. Batata A., Shen B.: Mouse rosettes and surface immunoglobulin in well-differentiated lymphocytic lymphoma: importance in immunophenotyping and differential diagnosis. *Cancer* **69**, 1021, 1992.
3. Batata A., Shen B.: Relationship between chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Cancer* **70**, 625, 1992.
4. Bennet J. M. i wsp.: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J. Clin. Pathol.* **42**, 567, 1989.
5. Braylan R. C. i wsp.: Similarity of characteristics of neoplastic well-differentiated lymphocytes from solid tissues and from peripheral blood. *Cancer Res.* **36**, 1619, 1976.
6. Casali P. i wsp.: Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1⁺ B-cell subset. *Science* **77**, 236, 1987.
7. Cherchi M., Catovsky D.: Mouse RBC rosettes in chronic lymphocytic leukaemia: different expression in blood and tissues. *Clin. Exp. Immunol.* **39**, 411, 1980.

8. Cheson B. D. i wsp.: Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: Recommendations of the National Cancer Institute-Sponsored Working Group. *Am. J. Hematol.* **29**, 152, 1988.
9. Clark P., Normansell D. E.: Phenotype analysis of lymphocyte subsets in normal human bone marrow. *Am. J. Clin. Pathol.* **94**, 632, 1990.
10. Cleary M. L., Sklar J.: DNA rearrangements in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Surveys* **4**, 331, 1985.
11. Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L.: Disease of White Cells, Lymph Nodes, and Spleen. [w:] Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L. (red.): *Pathologic Basis of Disease* (4th ed.), W. B. Saunders, Philadelphia 1989.
12. Dick F. R.: Small Lymphocytic Malignancies and Related Immunoproliferative Disorders. [w:] Jaffe E. S. (red.): *Surgical Pathology of the Lymph Nodes and Related Organs*. W. B. Saunders, Philadelphia 1986.
13. Freedman A. S. i wsp.: Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **70**, 418, 1987.
14. Hicks M. J. i wsp.: Differentiation of chronic lymphocytic leukemia from other well to intermediate differentiated lymphoproliferative disorders by the mouse rosette assay. *Diagn. Immunol.* **4**, 31, 1986.
15. Hu E. i wsp.: Non-Hodgkin's lymphoma containing both B and T cell clones. *Blood* **70**, 287, 1987.
16. Jakšić B., Vitale B.: Total tumor mass score (TTM) a new parameter in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **49**, 405, 1981.
17. Kurec A. S., Davey F. R.: Lymphocyte Markers. [w:] Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J., Lichtman M. A. (red.): *Hematology* (4th ed.) McGraw-Hill Publishing Company 1990.
18. Nieuwenhuis P., Lennert K.: Histopathology of normal lymphoid tissue and immune reactions. [w:] van den Tweel J. G., Taylor C. R., Bosman F. T. (red.): *Malignant Lymphoproliferative Diseases*. Leiden University Press. The Hague 1980.
19. Rai K. R. i wsp.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219, 1975.
20. Rupniewska Z. M., Dmoszyńska A.: Antygen CD5 i jego rola w stanie fizjologicznym i w patologii. *Post. Biol. Kom.* **19**, 45, 1992.
21. Rupniewska Z. M., Wach M.: Badania powierzchniowych immunoglobulin krwi obwodowej, szpiku i węzła chłonного chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną B-komórkową. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **89**, 304, 1993.
22. Siegelman M. H. i wsp.: Frequent bclonality and Ig gene alternations among B cell lymphomas that show multiple histologic forms. *J. Exp. Med.* **161**, 850, 1985.
23. Stathopoulos G., Elliot E. V.: Formation of mouse or sheep red blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukemic individuals. *Lancet* **1**, 600, 1974.
24. The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* **49**, 2112, 1982.

Otrzymano 1994.09.15.

SUMMARY

A comparative research on lymphocyte immunological phenotypes in peripheral blood and bone marrow was carried out on 14 patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Three types of B cell markers were estimated: 1 — light chains (lambda or kappa) on the surface of cells, 2 — CD5

antigen, 3 — capability of forming mouse erythrocyte rosettes (MER); the last two markers are mostly characteristic of leukaemic cells.

The patients were divided into 3 groups according to the localisation of the main mass of tumorous cells: group I — the patients, whose clinical picture was dominated by the infiltration of lymphoid structures of the abdominal cavity and/or with massive infiltration of peripheral lymph nodes; group II — the patients, whose clinical picture was dominated by the infiltration of bone marrow; group III — the intermediate — patients with large mass of tumor in lymphoid structures and with bone marrow insufficiency symptoms. In most of the patients of group I, the percentage of CD5⁺ cells in peripheral blood was higher than the one in bone marrow (arithmetic means were 38.5% for blood and 26.7% for marrow). It was the reverse in group II (the means were 44.8% for blood and 64.3% for marrow, $P < 0.01$). The percentage in group III was similar to that of group I (the means — 48% for blood and 29.25% for marrow). No correlation between the percentage of CD5⁺ and MER⁺ cells was found in respective groups of the patients although the last marker behaved similarly to CD5.

The results obtained suggest that while estimating percentages of CD5⁺ cells in peripheral blood and bone marrow, one can differentiate between chronic lymphocytic leukaemia (with domination of CD5⁺ cells in bone marrow) and leukaemic phase of small lymphocyte lymphoma (with domination of CD5⁺ cells in peripheral blood).