

CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA W DIAGNOSTYCE IMMUNOFENOTYPOWEJ OSTRYCH BIAŁACZEK

FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSTICS OF ACUTE LEUKEMIA

Agnieszka BALANA-NOWAK, Edyta ZDZIŁOWSKA

Katedra i Klinika Hematologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie

Streszczenie: Współczesna diagnostyka chorób rozrostowych krwi obejmuje różnorodne techniki laboratoryjne. Cytometria przepływowa jest obecnie niezbędnym narzędziem do diagnozowania białaczek i chłoniaków, stosowanym obok klasycznej cytologii, cytochemii, cytogenetyki i biologii molekularnej. Ogromną zaletą cytometrii przepływowej jest możliwość wieloparametrowej oceny antygenowej na poziomie pojedynczej komórki nowotworowej. Cytometria przepływowa w diagnostyce ostrych białaczek pozwala określić pochodzenie badanej komórki oraz jej stopień dojrzałości, a zatem jaki jest podtyp badanej białaczki oraz precyzyjnie identyfikuje nietypową ekspresję antygenów, umożliwiając dalsze monitorowanie minimalnej choroby resztkowej. W artykule omówiono aktualną klasyfikację immunologiczną ostrych białaczek, przedstawiono przykładowe panele stosowanych przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce ostrych białaczek wraz z ich interpretacją kliniczną, oraz pokazano graficzne przykłady analizy immunofenotypowej, w oparciu o doświadczenia własne Kliniki Hematologii CMUJ w Krakowie. Artykuł ten może stanowić praktyczną pomoc dla osób rozpoczynających immunofenotypowanie ostrych białaczek.

Summary: Modern diagnostics of hematological diseases is a combination of different laboratory techniques. Flow cytometry is an indispensable tool for the diagnosis of leukemia and lymphoma used in addition to classical cytology, cytochemistry, cytogenetics and molecular biology. The advantage of flow cytometry for diagnosis in hematology is a multiparameter assessment of antigens on a single cell level. Specifically in cases of leukemia flow cytometry allows the determination lineage and maturation status of the malignant cells, and so the classification of the subtype of leukemia, identification of aberrant antigen expression and makes possible further detection of minimal residual disease. This article includes the immunological classification of acute leukemias, shows the examples of different monoclonal antibody panels that can be used for leukemia diagnostics and presents a selection of case reports taken from the routine work in our Department of Hematology. This article could be of practical help for people commencing immunophenotyping of acute leukemias.

Wskaz skrótów: **ALL** (ang. *Acute lymphoblastic leukemia*) – ostra białaczka limfoblastyczna; **AML** (ang. *Acute myeloid leukemia*) – ostra białaczka szpikowa; **AMLL** (ang. *Acute mixed lineage leukemia*) – ostra białaczka mieszanoliniowa; **AML + Ly** (ang. *Acute myeloid leukemia with lymphoid coexpression*) – ostra białaczka szpikowa z koekspresją antygenów limfoidalnych; **ALL + Ly** (ang. *Acute lymphoblastic leu-*

mia with lymphoid coexpression) – ostra białaczka limfoblastyczna z koekspresją antygenów limfoidalnych; **ALL + My** (ang. *Acute lymphoblastic leukemia with myeloid coexpression*) – ostra białaczka limfoblastyczna z koekspresją antygenów mieloidalnych; **AUL** (ang. *Acute undifferentiated leukemia*) – ostra białaczka niezróżnicowanokomórkowa; **BMT** (ang. *Bone marrow transplantation*) – transplantacja szpiku kostnego; **CD** (ang. *Clusters of differentiation*) – kompleks różnicowania; **CR** (ang. *Complete remission*) – całkowita remisja hematologiczna; **FAB** – francusko-amerykańsko-brytyjska klasyfikacja; **FL1** – fluorescencja 1; **FL2** – fluorescencja 2; **FL3** – fluorescencja 3; **FSC** (ang. *Forward scatter*) – rozproszenie przednie światła; **Gly A** – glikoforyna A; **HLA-DR** – antygeny zgodności tkankowej – klasa II; **IgM** – immunoglobulina klasy M; **MDR** (ang. *Multidrug resistance molecule*) – cząsteczka oporności wielolekowej; **MoAb** (ang. *Monoclonal antibody*) – przeciwciało monoklonalne; **MRD** (ang. *Minimal residual disease*) – minimalna choroba resztkowa; **PBSCT** (ang. *Peripheral blood stem cell transplantation*) – przeszczepienie komórek macierzystych krwi obwodowej; **Pgp** – glikoproteina; **R1, R2** (ang. *Region*) – oznaczenia bramek zakładanych podczas analizy populacji komórkowych w cytometrze przepływowym; **SSC** (ang. *Side scatter*) – rozproszenie boczne światła; **TdT** – terminalna transferaza deoksynukleotydowa.

I. BIAŁACZKI OSTRE – DEFINICJA I KLASYFIKACJA

Terminem ostra białaczka określa się grupę nowotworów złośliwych wywodzących się z prekursorowych komórek hematopoetycznych szpiku kostnego. Do rozwoju ostrej białaczki dochodzi w wyniku transformacji nowotworowej we wczesnej lub ukierunkowanej komórce hematopoetycznej szpiku przebiegającej z:

- niekontrolowaną proliferacją patologicznego klonu komórkowego,
- niezdolnością tych komórek do dojrzewania,
- naciekaniem przez niedojrzałe komórki różnych narządów (wątroby, śledziony, węzłów chłonnych, ośrodkowego układu nerwowego czy skóry),
- wyparciem, przez rozrastający się klon białaczkowy, prawidłowych linii komórek szpikowych.

W szpiku i krwi obwodowej charakterystyczne jest występowanie obok siebie dojrzałych komórek i najmłodszych form prekursorowych układu hematopoetycznego (blastów) [24, 48, 69, 71, 72].

Ostra białaczka szpikowa (AML)

Ostra białaczka szpikowa jest nowotworowym rozrostem komórek wywodzących się z prekursorowej komórki hematopoetycznej szpiku, z wyłączeniem linii limfoidalnej [24, 44, 48, 72]. AML (*Acute Myeloid Leukemia*) stanowi 75–80% przypadków ostrych białaczek u dorosłych, natomiast u dzieci występuje w ok. 15% wszystkich przypadków. Ostłą białaczkę szpikową możemy podzielić na pierwotną i wtórną, w zależności od tego, czy rozwinęła się jako schorzenie pierwotne (*de novo* AML), czy też była poprzedzona innym schorzeniem (zespoły mielodysplastyczne, guzy lite leczone przy pomocy radio- i chemioterapii, kryza blastyczna w przewlekłej białaczce szpikowej) [24, 48, 71]. Chemioterapia indukująca remisję, stosowana w AML dorosłych chorych pozwala na uzyskanie całkowitej remisji hematologicznej w ok. 60% przypadków umożliwiając kontynuację leczenia, w tym przeszczepienie szpiku kostnego. Przeszczepienie macierzystych komórek hematopoetycznych szpiku kostnego – BMT (*bone marrow*

transplantation) lub krwi obwodowej – PBSCT (*peripheral blood stem cell transplantation*) – autologiczne lub allogeniczne – pozwala na uzyskanie długoletniego przeżycia, odpowiednio u 50% i 70% chorych [23, 24, 34, 44, 65, 66, 71, 73].

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)

Ostra białaczka limfoblastyczna jest chorobą charakteryzującą się nieprawidłową i rozsianą proliferacją komórek nowotworowych wywodzących się z linii limfocyту T lub B. ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) jest postacią ostrej białaczki najczęściej występującą u dzieci (75–80% wszystkich przypadków). W grupie dorosłych chorych rozpoznawana jest w 15–20% przypadków ostrych białaczek. ALL z linii limfocyту B występuje częściej niż z linii limfocyту T zarówno u dzieci (85% ALL), jak i u dorosłych (75% ALL). Wyniki chemioterapii u dzieci w ciągu ostatnich lat uległy znacznej poprawie (75–80% całkowitych wyleczeń), podczas gdy w grupie dorosłych 70–80% uzyskuje całkowitą remisję hematologiczną (CR), a jedynie 20–30% chorych osiąga długoletnie przeżycie. Przeszczepienie macierzystych komórek hematopoetycznych, autologiczne lub allogeniczne, pozwala na uzyskanie długoletniego przeżycia odpowiednio u 40–50% i 50–60% dorosłych chorych [3, 14, 23, 41, 65].

Metody laboratoryjne stosowane w diagnostyce ostrych białaczek

Współczesna diagnostyka laboratoryjna ostrych białaczek obejmuje ocenę:

- cytologiczną komórek szpiku i krwi obwodowej,
- enzymów i związków chemicznych w komórkach blastycznych (metody cytochemiczne),
- immunofenotypu komórek białaczkowych metodą cytometrii przepływowej, oraz
- zaburzeń genetycznych ocenianych metodami klasycznej cytogenetyki oraz technikami biologii molekularnej.

Badanie immunofenotypu komórek pozwala na ocenę antygenów różnicowania – CD (ang. *cluster of differentiation*) występujących na powierzchni komórek i/lub w cytoplazmie, charakterystycznych dla określonej linii komórkowej. Podstawowymi metodami służącymi do oceny immunofenotypu komórek białaczkowych są:

- Immunocytochemia – w metodzie tej komórki są utrwalone na szkiełku, przeciwciała monoklonalne znakowane jest enzymem, a reakcję antygenu z przeciwciałem uwidacznia się wykorzystując reakcję barwną enzymu z substratem. Można wykorzystywać też przeciwciała sprzężone z fluorochromem, a ocenę prowadzić pod mikroskopem fluorescencyjnym.

- Immunofluorescencja bezpośrednia jest oparta na znakowaniu komórek w zawiesinie przeciwciałami monoklonalnymi połączonymi z fluorochromem i ocenie fluorescencji przy pomocy cytometru przepływowego.

We współczesnej diagnostyce hematologicznej do analizy immunofenotypu komórek układu krwiotwórczego wykorzystuje się rutynowo metodę cytometrii przepływowej.

Wprowadzenie standardowej oceny immunofenotypu przy użyciu przeciwciał monoklonalnych, udoskonalenie techniki znakowania przeciwciał (MoAb znakowane bezpośrednio fluorochromem) pozwalające na równoczesną ocenę występowania kilku antygenów na komórkach białaczkowych doprowadziło do ujednolicenia kryteriów immunofenotypowej diagnostyki i klasyfikacji ostrych białaczek [17, 27, 31, 45, 52, 62, 68, 77, 81, 85].

Zastosowanie cytometrii przepływowej w diagnostyce ostrych białaczek pozwala na:

- rozpoznanie stadiów różnicowania się poszczególnych populacji komórek hematopoetycznych,

- analizę dojrzałości komórek w obrębie populacji białaczkowej,
- ocenę ekspresji molekuł odpowiedzialnych za występowanie oporności wielolekowej (MDR),

- monitorowanie efektów terapii i potwierdzenie remisji choroby,
- wykrywanie i śledzenie choroby resztkowej (MRD) [8, 9, 22, 26, 30, 33, 39, 42, 52, 56, 64, 79, 80].

Klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek na podstawie immunofenotypu (charakterystyki antygenowej) komórek białaczkowych

Badania immunofenotypu komórek szpiku kostnego i narządów limfatycznych pozwoliły na poznanie kombinacji antygenowych charakterystycznych dla kolejnych stadiów prawidłowej hematopoezy. Badania oparto na ocenie ekspresji powierzchniowych i cytoplazmatycznych determinant antygenowych typowych dla poszczególnych etapów dojrzewania komórek linii mieloidalnych i limfoidalnych [9, 25, 38, 40, 45, 54, 55, 82, 83]. Porównanie immunofenotypów komórek prawidłowej hematopoezy i komórek białaczkowych doprowadziło do powstania hipotezy wskazującej, iż rozrost komórek białaczkowych jest wyrazem niekontrolowanej proliferacji komórek zatrzymanych na danym etapie dojrzewania i różnicowania [6, 9, 30, 79]. Założenie to stanowi podstawę immunofenotypowej klasyfikacji ostrych białaczek.

Wśród antygenów charakteryzujących daną linię komórkową można wyróżnić antygeny determinujące linię komórkową (tzw. antygeny restrykcyjne), swoiste dla danej linii komórkowej oraz determinanty dodatkowe. Obecność przynajmniej dwóch antygenów restrykcyjnych pozwala na prawie jednoznaczne określenie typu komórki, która uległa transformacji nowotworowej. Natomiast antygeny dodatkowe pozwalają na ocenę dojrzałości i zróżnicowania komórki blastycznej oraz oceny kombinacji antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych, charakterystycznej dla poszczególnych podtypów ostrej białaczki szpikowej lub limfoblastycznej (tab. 1) [79].

Białaczka nie zróżnicowanokomórkowa – AUL

Białaczki typu AUL (*Acute Undifferentiated Leukemia*) charakteryzują się brakiem ukierunkowania komórek blastycznych. Wykazują ekspresję tylko antygenu CD34, HLA-DR i jądrowej TdT, co pozwala na określenie ich jako białaczek z komórek macierzystych. Wielu autorów [21, 26, 31, 36, 61] sugeruje, że nie istnieje białaczkowy rozrost komórki macierzystej, a wyodrębnianie AUL wynika z niedosko-

TABELA 1. Antygeny charakteryzujące linie komórkowe – znaczenie dla immunofenotypowania białaczek ostrych

Linia komórkowa	Antygeny restrykcyjne	Antygeny dodatkowe
Linia limfocytu B	CD19 + CD22* i/lub D79a*	TdT*, CD20, HLA-DR, CD34, CD10, μ^* , sIg
Linia limfocytu T	CD3* + CD7 i/lub CD2	TdT*, CD5, CD1a, CD34, TCR-CD3, CD4, CD8
Linia mieloidalna	MPO* + CD33 i/lub CD13	CDw65, HLA-DR, CD117, CD14, CD34, CD15
Linia erytrocytarna	CD71	glikoforyna A
Linia megakariocytna	CD41 CD61	CD42, CD62

*identyfikowany w barwieniu cytoplazmatycznym

nałości badania markerów ukierunkowania komórki macierzystej w cytoplazmie, takich jak: cCD22, cCD79a, cCD3 czy MPO.

Ostra białaczka limfoblastyczna – ALL

W diagnostyce ostrych białaczek limfoblastycznych dopiero immunofenotypowanie limfoblastów umożliwiło pełną klasyfikację ALL z linii limfocytu B i T (tab. 2).

Białaczki z linii limfocytu B

Klasyfikacja ALL wywodzącej się z linii limfocytu B zmieniała się kilkakrotnie. Pierwsza klasyfikacja obejmowała 4 postacie i wykorzystywała jedynie określenie ekspresji antygenów: CD19, CD10, CD20, HLA-DR [9, 21, 30, 31]. Kolejna jej modyfikacja [9, 21] polegała na uwzględnieniu antygenów CD22 i CD34 oraz zmianie kolejności pojawiania się na powierzchni komórek poszczególnych determinant.

Obecnie powszechnie stosowana jest klasyfikacja według Europejskiej Grupy ds. Immunologicznej Klasyfikacji Białaczek (EGIL) będąca kompilacją obu wyżej wymienionych [1, 6, 9, 21, 30, 31, 38, 40, 51, 62, 68, 79].

B I – pro-B ALL – ostra białaczka limfoblastyczna wczesnych prekursorów B nazwana białawką progenitorową, od angielskiej nazwy *progenitor B ALL*. Stanowi 5–10% ALL u dzieci i dorosłych. Komórki wykazują ekspresję powierzchniowych determinant antygenowych: HLA-DR, CD34, CD19 oraz cytoplazmatyczną obecność antygenu CD22, CD79a i jądrową TdT. Może wystąpić brak ekspresji CD45 [22, 45].

B II – common ALL – stanowi największy odsetek białaczek limfoblastycznych wieku dziecięcego (65%) i u dorosłych (75%). Komórki wykazują ekspresję antygenów: TdT, HLA-DR, CD34, CD19, CD10 oraz zmienną ekspresję CD22 i CD45 [22, 45]. W obrębie „etapu CD10+” różnicowania prekursorów B może pojawiać się ekspresja CD20. Stąd wyróżnia się dodatkowo postać CD10+/CD20+ (*common ALL II*).

B III – pre-B ALL – występuje u ok. 25% dzieci i jest rzadko spotykany u dorosłych. W tym typie ALL istotnym dla diagnostyki różnicowej jest obecność w cytoplazmie łańcucha ciężkiego immunoglobuliny klasy IgM (μ). Komórki wykazują

TABELA 2. Immunofenotypowa klasyfikacja ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL)

z linii limfocyту B	
pro-B ALL	HLA-DR, CD34, CD19, cCD22
common I ALL	HLA-DR, CD10, CD19, CD22
common II ALL	HLA-DR, CD10, CD19, CD22, CD20
pre-B ALL	HLA-DR, CD19, CD22, c IgM(μ)
transitional pre-B ALL	HLA-DR, CD19, CD22, c/s IgM(μ)
mature-B ALL	CD19, CD20, CD22, sIg (G+A+M), kappa lub lambda
z linii limfocyту T	
ALL-T (I-III)	różne kombinacje antygenów charakterystycznych dla etapów rozwoju tymocyту
ALL-T (IV)	różne kombinacje antygenów charakterystycznych dla limfocyту T

ekspresję: HLA-DR, CD19, CD20, CD22 i TdT. Może utrzymywać się zmienna ekspresja antygeny CD10 (tylko u niektórych badanych).

B IV – mature-B ALL – stanowi 2–5% ALL z limfocyту B. Komórki są większe niż komórki B-prekursorowe. Fenotyp charakterystyczny dla dojrzałych limfocyту B wykazuje ekspresję: HLA-DR, CD19, CD20, CD22, łańcuchów ciężkich immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) oraz jednego z łańcuchów lekkich kappa (κ) lub lambda (λ) (rozrost monoklonalny). W pewnym odsetku przypadków nadal obserwuje się ekspresję antygeny CD10.

ALL B-I do III określa się często wspólną nazwą ALL z komórek prekursorowych linii limfocyту B (prekursor-B ALL). W ostatnich latach wyróżniono ponadto podtyp **transitional pre-B ALL**. Jest to rzadko występująca białaczka, w której limfoblasty ekspozują jednocześnie w cytoplazmie i na powierzchni komórki łańcuchy ciężkie μ , bez ekspresji łańcuchów lekkich κ czy λ .

Białaczki z linii limfocyту T

Dla białaczek wywodzących się z linii limfocyту T swoista jest cytoplazmatyczna i błonowa ekspresja antygeny CD3. Na tej podstawie oraz na podstawie ekspresji pozostałych antygenów określających linię limfocyту T, EGIL wyróżniła 4 podtypy ALL-T definiowane w zależności od stopnia dojrzałości tymocyту [7, 9, 15, 21].

T I – pro-T ALL odpowiada wczesnemu etapowi różnicowania limfocyту T w szpiku kostnym. Komórki wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych: HLA-DR (zmienna ekspresja), CD34, CD7 oraz cytoplazmatyczną obecność CD3 i TdT.

T II – pre-T ALL odpowiada etapowi niedojrzałego tymocyту (*immature thymocyte*). Komórki wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych: CD7, CD2, CD5 oraz częściowo powierzchniową ekspresję CD3, CD8 i CD4, a także cytoplazmatyczną obecność CD3 i TdT. W wielu przypadkach opisuje się ekspresję antygeny CD10.

T III – cortical-T ALL odpowiada etapowi tzw. *common thymocyte*. W tym typie ALL istotnym dla diagnostyki różnicowej jest obecność na błonie komórkowej antygeny CD1a. Komórki wykazują powierzchniową ekspresję antygenów: CD3, CD7, CD2, CD5, CD8 i/lub CD4 i cytoplazmatycznie TdT i CD3.

TABELA 3. Immunofenotypowa klasyfikacja ostrych białaczek mieloidalnych (AML)

AML0 – bez cech zróżnicowania	CD34, HLA-DR, CD13 lub CD33, c*MPO (TdT, CD7)
AML1 – min. zróżnicowana	CD34, HLA-DR, CD13, CD33, c*MPO
AML2 – z cechami zróżnicowania	CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65, CD11c, c*MPO
AML3 – promielocytowa	CD13, CD33, c*MPO
AML4 – mielomonoblastyczna	CD64, CD14, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD11c, (CD4, CD56)
AML5 – monoblastyczna	CD64, CD14, HLA-DR, CD13, CD33, (CD4, CD56)
AML6 – erytroblastyczna	Gly-A, CD71, (CD34, HLA-DR)
AML7 – megakarioblastyczno-megakariocytarna	CD41, CD33, HLA-DR (CD34)

T IV – mature-T ALL odpowiada etapowi dojrzałego tymocyту (*mature thymocyte*). Komórki wykazują ekspresję: CD7, CD2, CD5, CD8 lub CD4, CD3 i cytoplazmatycznie TdT. Wyróżnia się dwie podgrupy typu IV ALL w zależności od definiowanej ekspresji receptorów: TCR α / β + (grupa IVa) lub TCR γ / δ + (grupa IVb) w połączeniu z CD3.

Białaczki, których komórki mają immunofenotyp odpowiadający prekursorom limfocyту T (typ I–III), stanowią grupę traktowaną jako **prekursorowa T-ALL**, pozostałe to postać odpowiadająca dojrzałemu tymocytowi – **ALL-T**. Taka klasyfikacja jest preferowana przez większość autorów, co wynika głównie z niewielkiego klinicznego znaczenia szczegółowego podziału grupy białaczek z linii limfocyту T oraz ze znacznej asynchroniczności opisywanych immunofenotypów [9, 11, 21, 30, 31, 58].

Ostra białaczka mieloblastyczna – AML

Klasyfikacja immunologiczna ostrych białaczek szpikowych koreluje z klasyfikacją wg FAB, lecz immunofenotypowanie mieloblastów wniosło wiele uzupełnień (np. podtyp M0 i M7) (tab. 3) [1, 2, 6, 9, 12, 16, 21, 24, 28, 30, 31, 36, 37, 76, 77, 86].

Białaczka mieloblastyczna bez cech zróżnicowania (FAB-M0) – od 1991 roku włączona do klasyfikacji [2, 13, 16, 37, 86]. Stanowi 10–15% przypadków AML. Komórki białaczkowe w typie M0 nie dają reakcji barwnych w badaniach cytochemicznych. Immunofenotyp komórek M0 wykazuje ekspresję zwykle jednej determinanty powierzchniowej specyficznej dla linii mieloidalnej: CD13 lub CD33 przy braku CD11b, CD15, CD65 oraz słabą ekspresję cytoplazmatycznej mieloperoxydazy (MPO). Komórki nie prezentują antygenów linii limfoidalnej, choć w niewielkim odsetku mogą wykazywać ekspresję CD7 lub/i TdT [37]. Mieloblasty w podtypie M0 cechuje silna ekspresja CD34 i HLA-DR.

Ostra białaczka mieloblastyczna minimalnie zróżnicowana (FAB-M1) – stanowi 25–40% AML. Blasty w AML-M1 są CD13 i CD33 oraz HLA-DR pozytywne, ale ekspresja CD34 nie jest tak silna jak w M0. Typowo nie wykazują

obecności antygenów CD11b, CD15 i CD65. Ekspresja cytoplazmatycznego MPO jest silniejsza w podtypie M1 niż w M0.

Ostra białaczka mieloblastyczna z cechami zróżnicowania (FAB-M2) – ten podtyp AML diagnozowany jest u 10–25% chorych z AML. W większości przypadków komórki białaczkowe prezentują ekspresję HLA-DR, CD13, CD15, CD33 i CD65. Ocena immunofenotypu mieloblastów M2 wykazuje brak lub zanikającą ekspresję antygenu CD34. Natomiast silnie zaznaczona jest obecność cytoplazmatycznego MPO.

Ostra białaczka promielocytowa (FAB-M3) – stanowi 4–7% AML. Typowo obserwuje się brak ekspresji wczesnych antygenów dojrzewania mieloblastu, takich jak: CD34 i HLA-DR, jak również brak antygenów różnicowania, takich jak: CD15, CD65 czy CD11b. Hipergranularne formy tej białaczki mogą wykazywać też redukcję ekspresji CD45 zestawionej z brakiem HLA-DR. Obserwuje się zwykle silną ekspresję antygenów CD13 i CD33.

Według współczesnej klasyfikacji WHO AML-M3 określa się jako białaczkę z t(15,17) i do potwierdzenia rozpoznania niezbędne jest wykrycie wyżej opisanej translokacji metodami cytogenetycznymi.

Ostra białaczka mielomonocytoza (FAB-M4) – obserwuje się minimum 30% mieloblastów o fenotypie CD13+/ CD33+/ CD34+/-/ HLA-DR+/ CD11b-/ CD64-/ CD14- oraz co najmniej 20% komórek linii monocytarnej o fenotypie CD13+/ CD33+/ CD34-/ HLA-DR+/ CD11b+/ CD64+/ CD14+/- i CD4+/-.

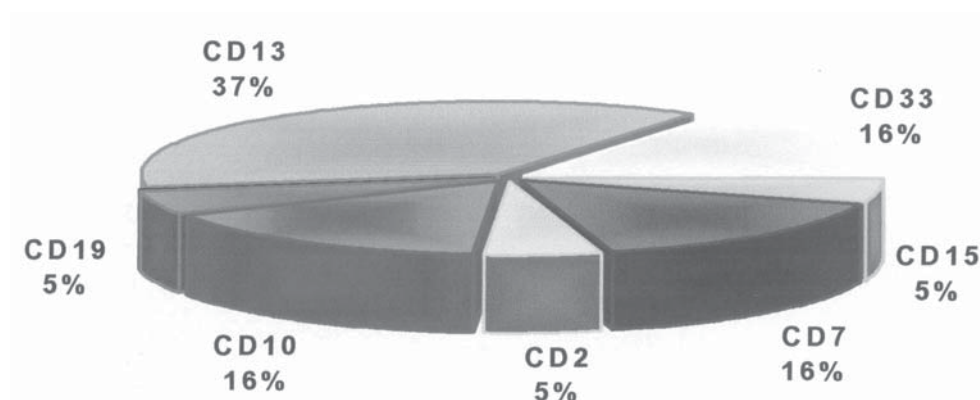
Ostra białaczka monocytowa (FAB-M5) – obserwuje się w ponad 80% komórek linii monocytarnej wykazujących ekspresję antygenów CD13, CD33, CD15, HLA-DR, CD64, CD14, CD16, CD56 i CD4. Immunologicznie wyróżnia się 2 podtypy M5a i M5b, różniące się intensywnością ekspresji CD14, CD4, CD16 oraz CD56 na monoblastach.

Erytroleukemia (FAB-M6) – stanowi mniej niż 5% AML. W szpiku występuje minimum 30% mieloblastów o typowym dla nich fenotypie CD33+/ CD13+/ CD34+/ HLA-DR+/ CD45+ oraz co najmniej 50% komórek szeregu erytroidalnego o fenotypie CD71+/ CD45- i glikoforyna A+ na bardziej dojrzałych formach erytroblastów.

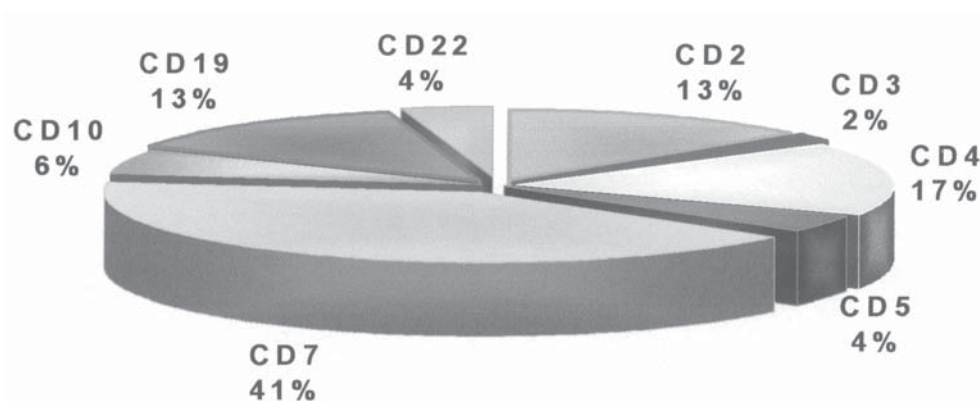
Ostra białaczka megakarioblastyczna (FAB-M7) – włączona została do klasyfikacji w 1985 roku [29]. Jest rzadko występującym (<5% przypadków) podtypem AML, wywodzącym się z wczesnych postaci rozwojowych linii megakariocytowej odpowiadających promegakarioblastom. Rozpoznanie AML-M7 opiera się na wykazaniu obecności antygenów CD61 (glikoproteina IIIa) i/lub CD41 (glikoproteina IIb/IIIa) na minimum 30% megakarioblastów w szpiku kostnym. Należy zwrócić uwagę na możliwość fałszywie pozytywnej reakcji spowodowanej adherencją płytek do blastów białaczkowych, dlatego dla prawidłowego rozpoznania krytyczne jest stosowanie połączenia CD41 i CD62 (determinanta płytkowa nieobecna na niedojrzałych megakarioblastach).

Białaczki o nietypowym immunofenotypie blastów

W miarę rozwoju diagnostyki immunofenotypowej ostrych białaczek coraz częściej obserwowano przypadki, w których komórki białaczkowe nie przypominały swoich „zdrowych odpowiedników”, wykazując niewłaściwą ekspresję determinant uznanych za charakterystyczne dla poszczególnych odrębnych linii komórkowych [5, 18, 84]. Brak ekspresji swoistych determinant lub obecność determinant dodatkowych, cechujących inne linie, sugerowały zaburzenia w genomie komórki. Nazwano je immunofenotypami nietypowymi [30, 35]. Stwierdzenie występowania aberrantnych immunofenotypów komórek białaczkowych doprowadziło do zmiany poglądu o mechanizmie powstawania ostrych białaczek. Jako wyjaśnienie tego zjawiska powstało kilka hipotez tłumaczących patomechanizm schorzeń limfo- i mieloproliferacyjnych. Do najczęściej wymienianych należą: anormalna ekspresja genów,



RYCINA 1. Częstość występowania nietypowych antygenów w grupie ALL z koekspresją



RYCINA 2. Częstość występowania antygenów limfoidalnych w grupie AML z koekspresją

określana też jako „niewierność linii komórkowych” (*linear infidelity*) [5, 18, 74] oraz złośliwa transformacja pluripotentnych komórek progenitorowych zdolnych zarówno do limfoidalnego, jak i mieloidalnego różnicowania, stąd określenie „linie o mieszanym pochodzeniu” [5, 84].

Białaczki z koekspresją antygenów innych niż zdefiniowana linia komórkowa

W tej grupie immunofenotypów nietypowych opisuje się białaczki limfoblastyczne z ekspresją antygenów mieloidalnego (ALL+My) lub limfoidalnego innego niż opisana linia (ALL+Ly) oraz białaczki mieloidalne z ekspresją antygenów limfoidalnych (AML+Ly).

Częstość występowania ALL+My, według różnych autorów, mieści się w bardzo szerokim zakresie 5–50%. Wyższy odsetek koekspresji antygenów mieloidalnych stwierdzono w ALL z linii limfocyty B niż z linii T [18, 57]. Najczęściej obserwowaną determinantą mieloidalną jest CD13 (ryc. 1).

Zakres częstości występowania AML+Ly waha się od 20 do 60% (w zależności od przyjętych kryteriów i badanej grupy) [9, 30, 62, 70, 75]. Opisuje się więcej przypadków z koekspresją antygenów z linii limfocyty T. Najczęściej obserwowanymi antygenami są CD7, CD2 i z linii B-CD19 (ryc. 2).

Asynchroniczność

Jest kolejnym przykładem nietypowych immunofenotypów. Tego rodzaju odstępstwo fenotypu komórki białaczkowej od immunofenotypu komórek prawidłowej ontogenezy dzieli się na:

- asynchroniczność pod względem ilościowym – oceniamy stopień ekspresji antygenów (np. hiperekspresja CD10 w *common ALL B*) oraz
- asynchroniczność pod względem jakościowym – oceniamy współwystępowanie antygenów z wczesnego etapu dojrzewania i antygenów charakterystycznych dla dojrzałych komórek (np. CD34+/CD15+ lub CD34+/CD3+) [18, 46].

Ponad 50% diagnozowanych przypadków ostrych białaczek mielo- i limfoblastycznych wykazuje ten rodzaj aberracji immunofenotypu komórek.

Fenotyp niepełny

Charakteryzuje się brakiem ekspresji pojedynczej determinanty specyficznej dla danego etapu rozwoju. Nieprawidłowość tę opisuje się zarówno w grupie chorych z AML (np. brak HLA-DR na mieloblastach), jak i z ALL (np. brak CD45 na limfoblastach).

Ostra białaczka dwufenotypowa (Biphenotypic Acute Leukemia)

Jest rzadką jednostką chorobową, w której stwierdza się zrównoważoną ekspresję antygenów dwóch linii komórkowych, np. determinant limfoidalnych i mieloidalnych na jednej populacji komórek blastycznych [5, 78]. W ostatnich latach zaproponowano system punktowy oceny (Kantarjian 1990, Catovsky 1991) [4, 67], który opiera się na analizie różnych antygenów (cytoplazmatycznych i błonowych) związanych z linią mieloidalną i limfoidalną, i zliczaniu punktów im przypisanych (tab. 4). Aby zdiagnozować białaczkę dwufenotypową suma antygenów z każdej zdefiniowanej

linii komórkowej musi być **większa niż 2 punkty**, w innym przypadku (liczba punktów ≤ 2) należy rozpoznać ostrą białaczkę z koekspresją. Na przykład: immuno-fenotyp cytCD79a+/ CD19+/ CD10+/ CD13+/ CD33+/ MPO+/ CD34+/ HLA-DR+ pozwala rozpoznać białaczkę dwufenotypową – AML/ ALL-B, podczas gdy cytCD79a+/ CD19+/ CD10+/ CD13+/ CD33+/ MPO-/ CD34+/ HLA-DR+ jako białaczkę z koekspresją – common ALL B + CD13/ CD33. Uwzględniając nowe, bardziej rygorystyczne kryteria oceny białaczkę dwufenotypową wykrywa się w 4–8% przypadków. Ten typ białaczki cechuje wysoki odsetek mutacji genowych [5, 9] oraz niekorzystne rokowanie [44, 78].

TABELA 4. Sposób oceny białaczki dwufenotypowej wg tabeli z punktacją antygenów (Katarijan 1990, Catovsky 1991)

2 Punkty	1 punkt	0,5 punktu
cyt CD79a cyt CD22 cyt IgM	CD19 CD10	TdT
cyt CD3	CD2 CD5	CD7
MPO	CD13 CD33	CD14, CD15 CD11c, CD11b

Białaczka mieszano-liniowa – AMLL (*Acute Mixed Lineage Leukemia*)

Jest to bardzo rzadkie schorzenie opisywane u 1–2% pacjentów, u których na jednorodnej morfologicznie populacji komórek białaczkowych stwierdza się występowanie determinant z różnych linii komórkowych [6, 9, 18, 30, 31, 49, 56, 57, 67] np.: cytCD3+/ cytCD79a+/ MPO+/ CD7+/ TdT+/ CD13+/ CD34+/ HLA-DR+, czy cytCD3+/ CD7+/ CD19+/ CD10+/ TdT+/ CD13+/ CD33+/ CD11c+/ MPO+/ HLA-DR+. Rozpoznanie AMLL koreluje z niekorzystnym rokowaniem [49].

Określenie nietypowego fenotypu komórek blastycznych jest istotne dla oceny remisji hematologicznej oraz śledzenia minimalnej choroby resztkowej (MRD). Jej prawidłowa ocena umożliwia lekarzowi podjęcie decyzji o kontynuowaniu lub uzupełnieniu leczenia u chorego z całkowitą remisją hematologiczną. Ułatwia to między innymi kwalifikację pacjentów do wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej przeszczepieniem komórek hematopoetycznych.

II. DOBÓR PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH DO DIAGNOSTYKI OSTRYCH BIAŁACZEK

Wykazanie obecności odpowiedniego zestawu determinant (antygenów) pozwala precyzyjnie określić, z jakiej linii pochodzi badana komórka, jaki jest stopień jej dojrzałości oraz w jakim stopniu jej fenotyp jest odpowiednikiem immunofenotypu prawidłowej komórki szpiku (tab. 1, 2, 3).

Zastosowanie szerszego panelu przeciwciał ułatwia wykrycie „nieprawidłowości” na badanych komórkach (fenotyp aberrantny), co z kolei umożliwia dalsze monitorowanie efektów terapii i wiarygodną ocenę choroby resztkowej.

W tabeli 5 przedstawiono przykładowe, trójkolorowe zestawienia przeciwciał do wstępnej diagnostyki ostrych białaczek szpikowych i limfoblastycznych, pozwalające

TABELA 5. Przykładowy panel przeciwciał do wstępnej diagnostyki ostrych białaczek

1.	TdT/ CD5/ CD19	weryfikuje linię komórkową, różnicuje ALL B od ALL T
2.	TdT/ cCD79a/ cCD3	weryfikuje linię komórkową, różnicuje ALL B od ALL T
3.	MPO/ CD7/ CD33	weryfikuje linię komórkową, identyfikuje AML
4.	CD4/ CD14/ CD45	identyfikuje populacje monocytów i limfocytów T pomocniczych
5.	CD3/ CD56/ CD45	identyfikuje populacje komórek NK i limfocytów T
6.	HLA-DR/ CD117/ CD45	identyfikuje populacje mieloblastów i promielocytów
7.	CD15/ CD19/ CD45	różnicuje linię mieloidalną od linii limfocytu B lub pozwala wykryć fenotyp aberrantny
8.	CD34/ CD33/ CD45	identyfikuje populacje mieloblastów
9.	CD2/ CD13/ CD45	różnicuje linię mieloidalną od linii limfocytu T lub pozwala wykryć fenotyp aberrantny

TABELA 6. Przykładowy panel przeciwciał do diagnostyki ALL-T

1.	TdT/ CD5/ CD3	różnicuje etap dojrzewania limfoblastu
2.	CD34/ CD3/ CD7	różnicuje etap dojrzewania limfoblastu lub pozwala wykryć fenotyp asynchroniczny
3.	CD2/ CD5/ CD7	identyfikuje podtyp pre-T ALL
4.	CD8/ CD4/ CD7	różnicuje etap dojrzewania limfoblastu
5.	CD1a/ CD3/ CD7	identyfikuje podtyp cortical T ALL
6.	HLA-DR/CD10/ CD7	różnicuje podtyp pro-T i pre-T ALL
7.	TCR-alfa/beta/ TCR-gamma/delta/ CD3	identyfikuje klonalność limfoblastu
8.	CD13/ CD33/ CD7	identyfikuje koekspresję antygenów mieloidalnych na limfoblastach
9.	CD10/ CD19/ CD7	identyfikuje koekspresję antygenów linii limfocytu B na limfoblastach

TABELA 7. Przykładowy panel przeciwciał do diagnostyki ALL-B

1.	TdT/ CD10/ CD19	różnicuje etap dojrzewania limfoblastu
2.	CD34/ CD38/ CD19	identyfikuje wczesny etap dojrzewania limfoblastu
3.	CD20/ CD10/ CD19	identyfikuje podtyp common B ALL
4.	CD34/ CD22/ CD19	różnicuje etap dojrzewania limfoblastu
5.	CD66/ CD58/ CD19	identyfikuje aberrantne limfoblasty rozrostowe
6.	cIgM/ sIgM/ CD19	różnicuje podtyp pre-B i transycyjny pre-B ALL
7.	kappa/ lambda/ CD19	identyfikuje klonalność limfoblastu
8.	CD15/ CD34/ CD19	identyfikuje koekspresję antygenów mieloidalnych na limfoblastach
9.	CD13/ CD7/ CD19	identyfikuje koekspresję antygenów mieloidalnych i limfoidalnych linii T na limfoblastach

TABELA 8. Przykładowy panel przeciwciał do diagnostyki AML

1.	MPO/ TdT/ CD33	różnicuje etap dojrzewania mieloblastu
2.	CD34/ CD117/ CD33	różnicuje etap dojrzewania mieloblastu
3.	CD15/ CD34/ CD33	różnicuje podtyp M0, M1, M2 lub pozwala wykryć fenotyp asynchroniczny
4.	CD65/ HLA-DR/ CD33	identyfikuje podtyp M2
5.	CD64/ CD56/ CD33	identyfikuje populację komórek monocytarnych lub pozwala wykryć fenotyp nietypowy (koekspresja)
6.	CD4/ CD14/ CD33	identyfikuje populację komórek monocytarnych lub pozwala wykryć fenotyp nietypowy (koekspresja)
7.	CD71/ CD41/ CD33	różnicuje komórki linii megakariocytarnej od erytrocytarnej
8.	P-gp/ CD114/ CD33	identyfikuje molekułę oporności i receptor dla G-CSF na mieloblastach
9.	CD7/ CD13/ CD33	identyfikuje fenotyp nietypowy (koekspresja) lub wskazuje na podtyp M0
10.	CD7/ CD19/ CD33	identyfikuje koekspresję antygenów limfoidalnych linii T i linii B na mieloblastach

zweryfikować, która linia komórkowa uległa transformacji nowotworowej oraz odpowiedzieć na pytanie, czy możemy wykryć białaczkę dwufenotypową lub mieszaną-liniową, czy też rozpoznać fenotyp nietypowy (koekspresja).

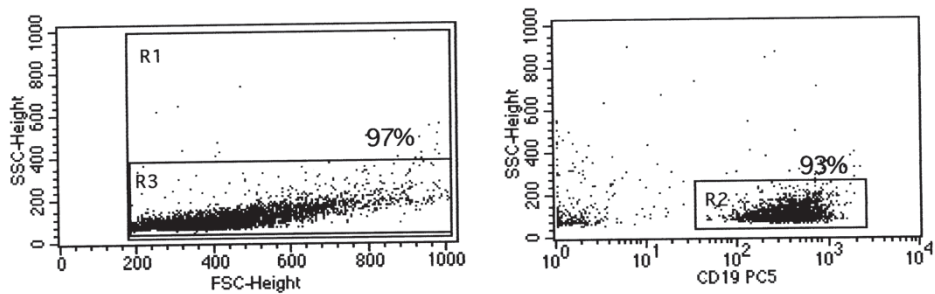
W tabelach 6, 7, 8 przedstawiono przykładowe zestawy przeciwciał pozwalające wykryć antygeny charakterystyczne dla poszczególnych podtypów diagnozowanej białaczki oraz niektóre zestawienia przeciwciał w kierunku wykrycia fenotypów aberrantnych.

III. AKWIZYCJA I ANALIZA BADANYCH KOMÓREK

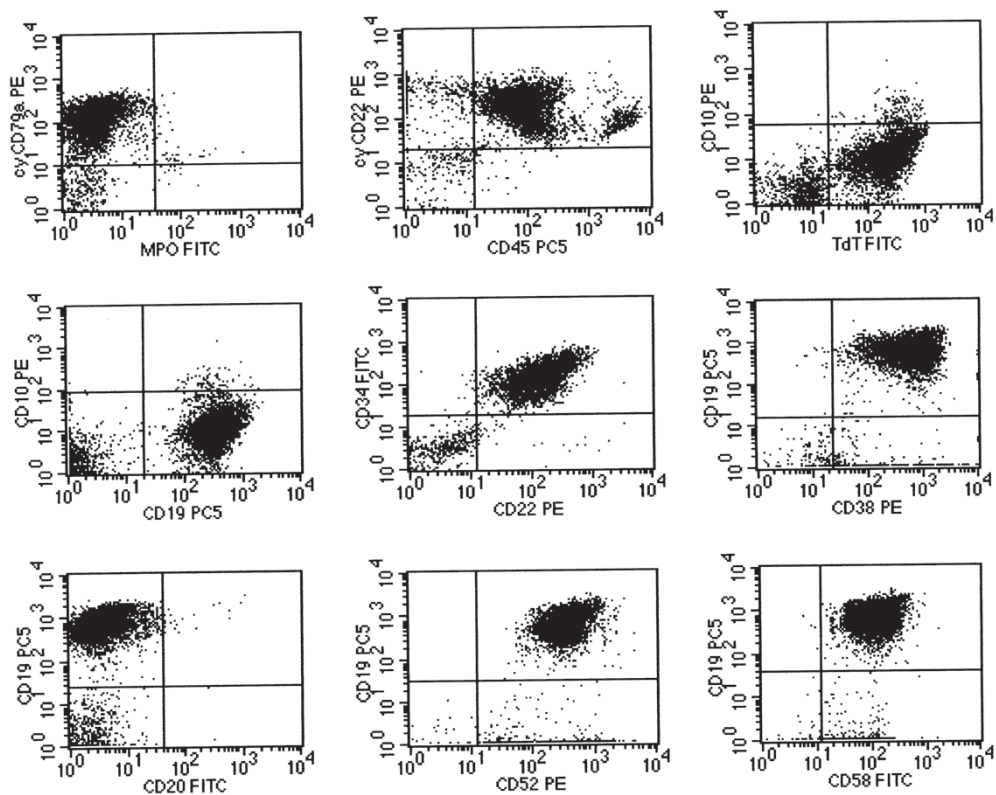
Z badanej próbki pobiera się do analizy jednakową ilość komórek połączonych z przeciwciałami monoklonalnymi (np. 10 000), przy stałym ustawieniu parametrów czułości i kompensacji cytometru przepływowego.

Każdorazowo komórki analizuje się w układzie współrzędnych FSC (*Forward Scatter*) vs. SSC (*Side Scatter*), oceniając subpopulacje komórkowe występujące w badanym materiale. FSC rozdziela komórki ze względu na ich wielkość, a SSC ze względu na ich strukturę wewnętrzną. Dla określenia immunofenotypu badanych komórek selekcjonuje się populację interesujących nas komórek przy użyciu elektronicznych bramek (ang. *gating*). Rozdział komórek białaczkowych opiera się na nietypowej lokalizacji i na znacznej przewadze ilościowej badanej populacji komórek w porównaniu do obrazu prawidłowego szpiku czy krwi obwodowej. Ocenę odsetka komórek wykazujących ekspresję badanych antygenów komórkowych dokonuje się na wstępnie wybranej populacji komórkowej, na wykresach fluorescencji (np. FL1/FL2, FL1/FL3, FL2/FL3).

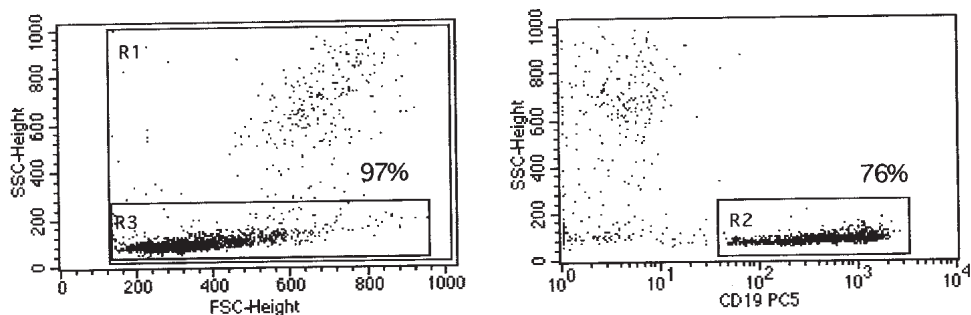
IV. WYBRANE PRZYKŁADY IMMUNOFENOTYPOWEJ ANALIZY OSTRYCH BIAŁACZEK



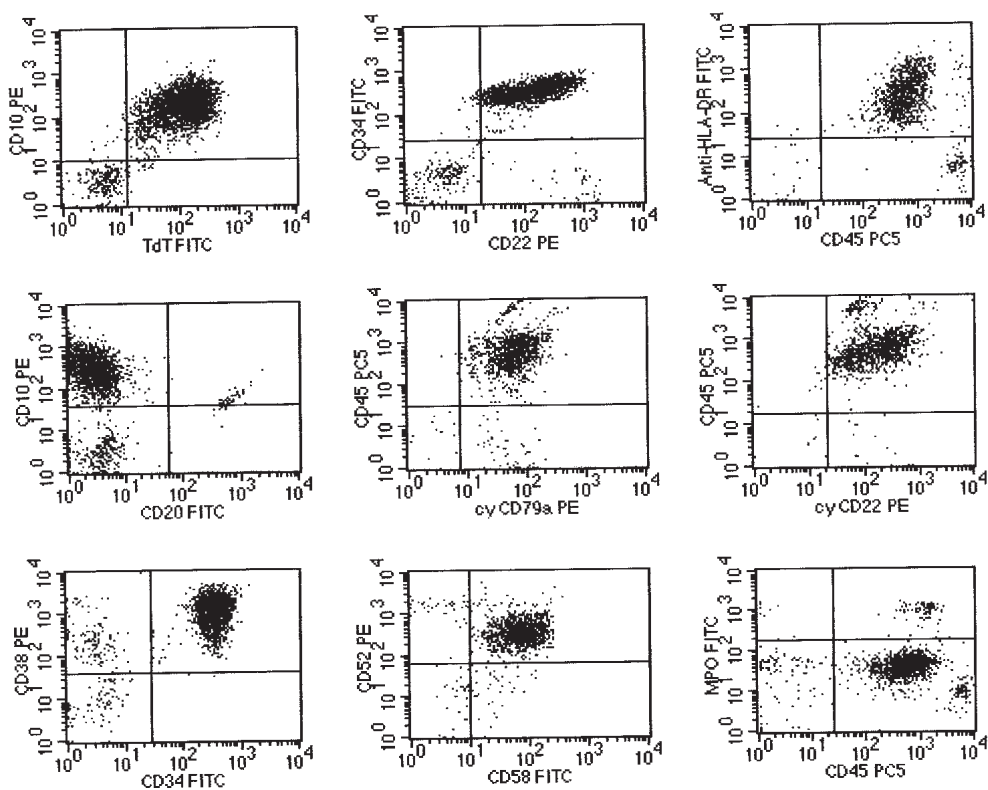
CD34+,HLA-DR+,CD45+,cCD79a+,TdT+,CD19+,CD38+,CD22+,CD58+,CD52+
CD10-,CD20-,MPO-



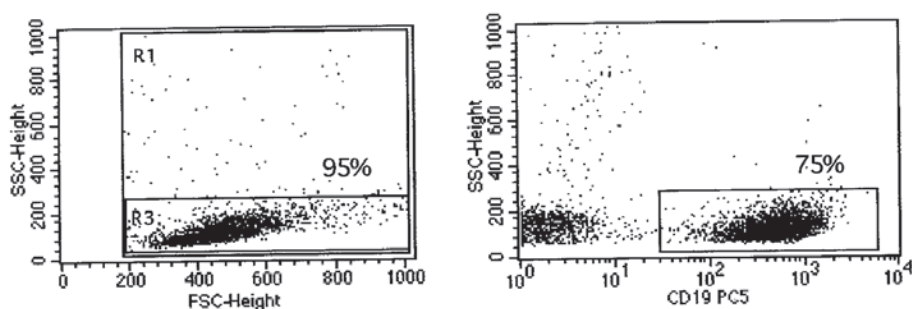
RYCINA 3. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – pro-B ALL



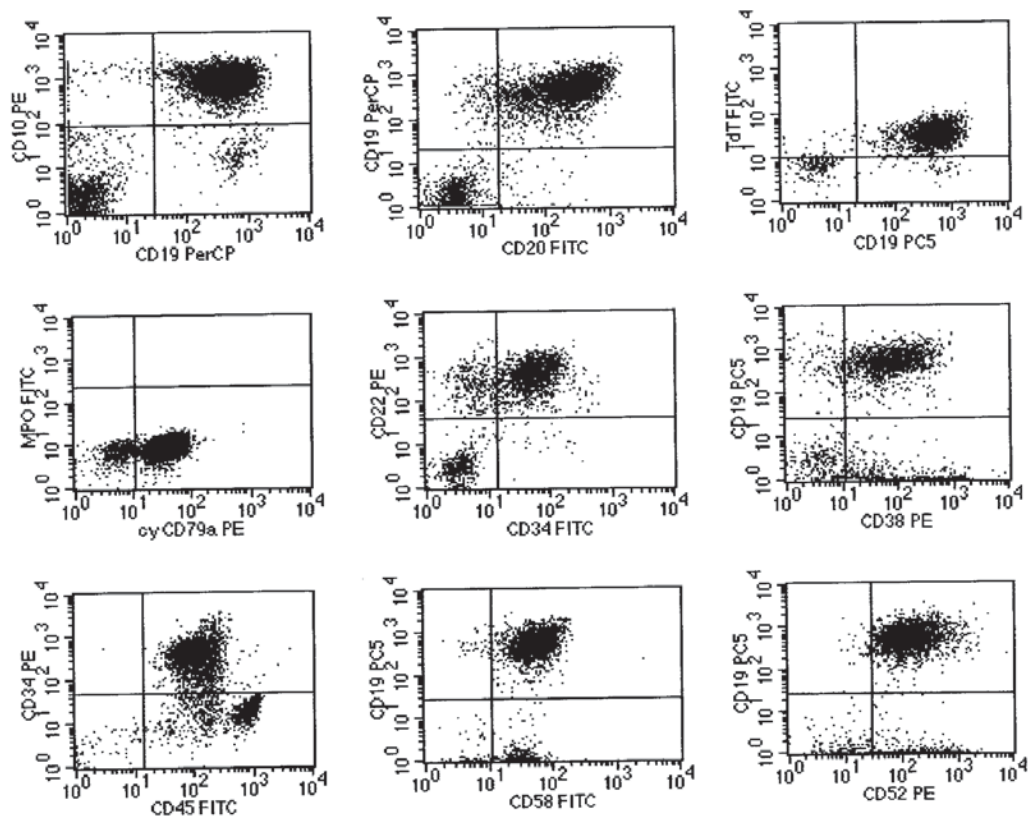
CD34+,HLA-DR+,CD45+,cCD79a+,TdT+,CD19+,CD10+,CD38+,cCD22+,CD58+
MPO-,CD20-



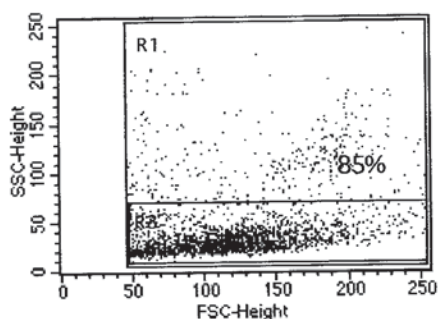
RYCINA 4. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – common-B ALL typ I



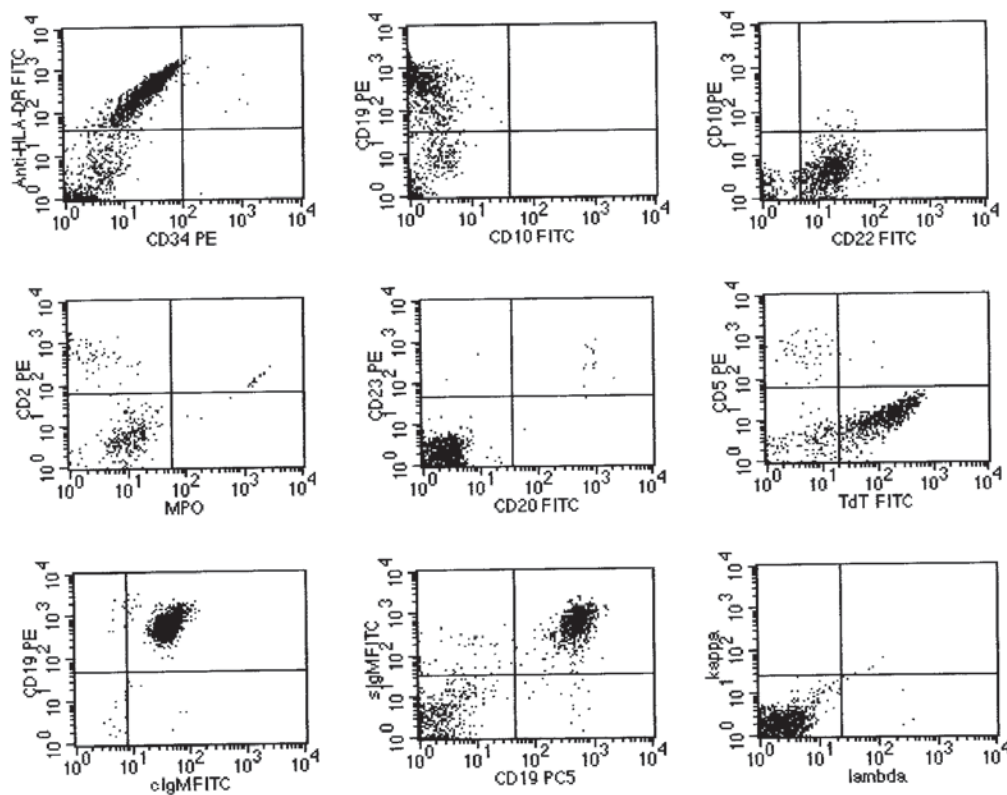
CD34+,HLA-DR+,CD45+,cCD79+,TdT+,CD19+,CD10+,CD38+,CD20+,CD22+,
CD52+,CD58+,MPO-



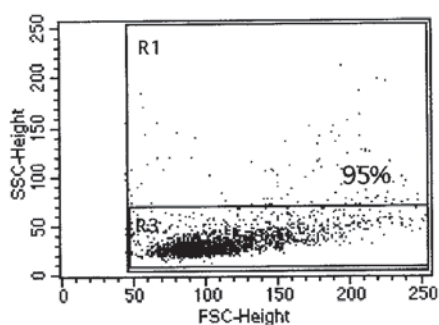
RYCINA 5. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – common-B ALL typ II



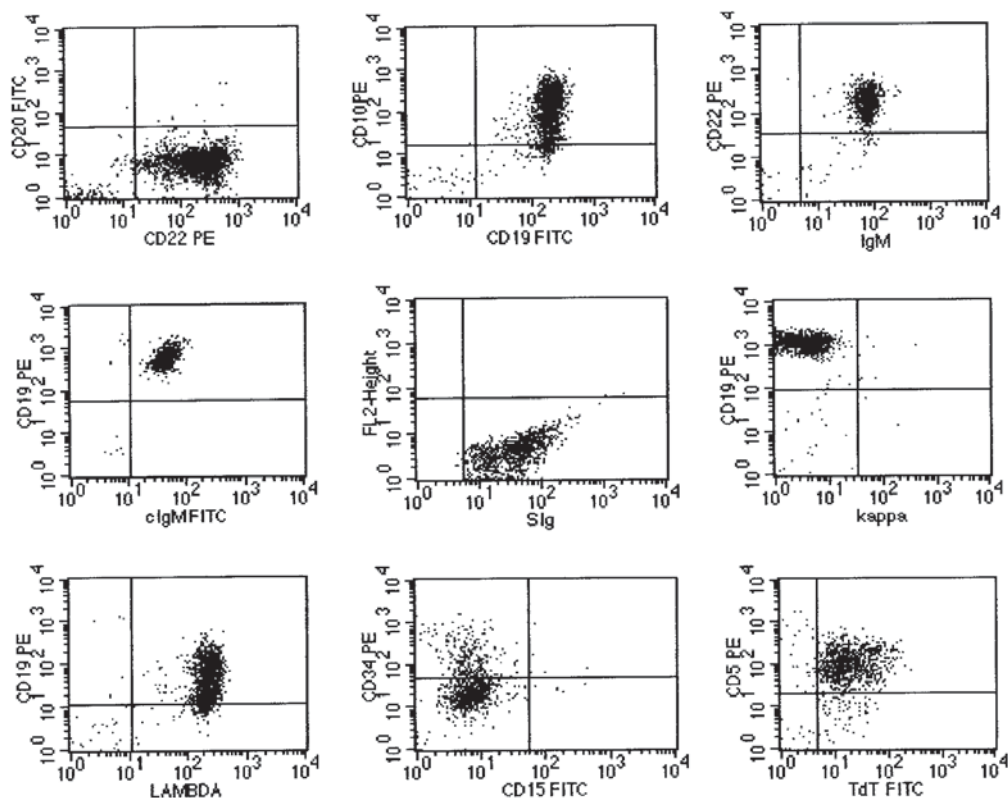
Tdt+, CD19+, c/slgM+, HLA-DR+, CD45+, CD22+,
CD10-, CD34-, MPO-, CD20-, CD23-, kappa-, lambda-



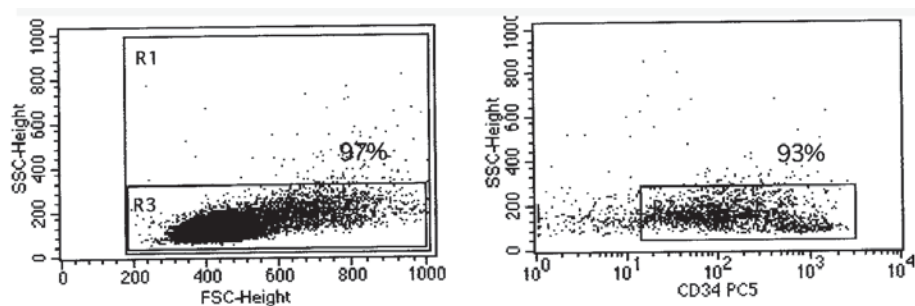
RYCINA 6. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – transitional pre-B ALL



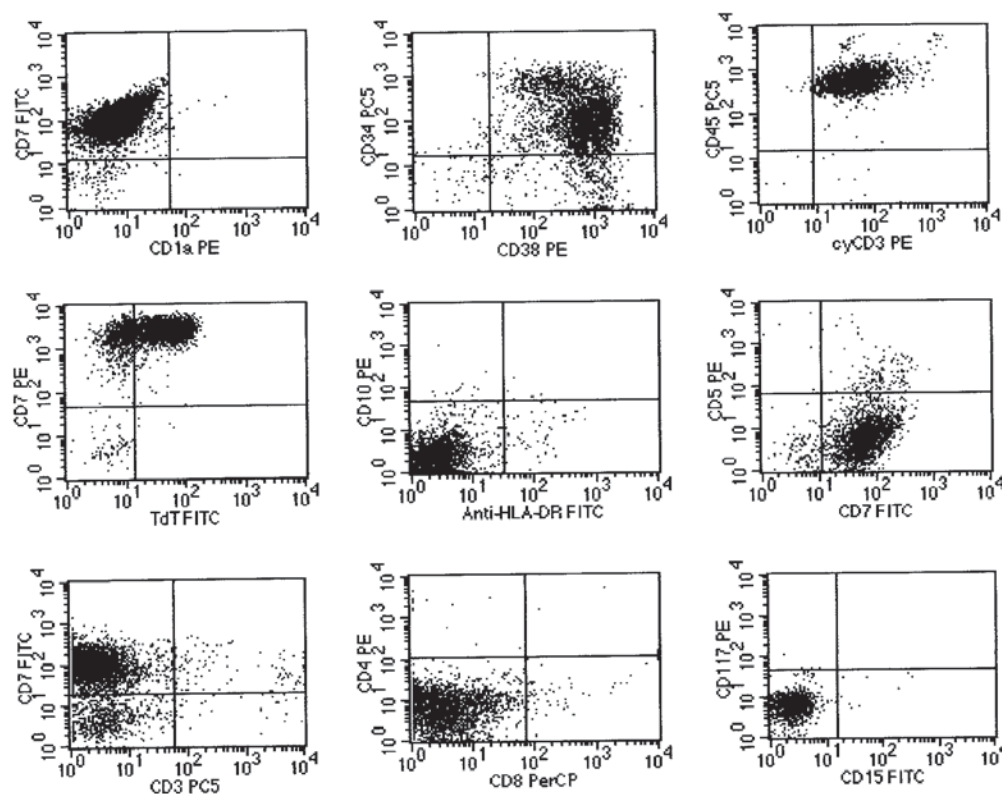
CD45+, TdT+, CD19+, CD10+, c/slgM +, slg+, lambda+, CD5+,
CD34-/+ , CD20-, kappa-, CD15-



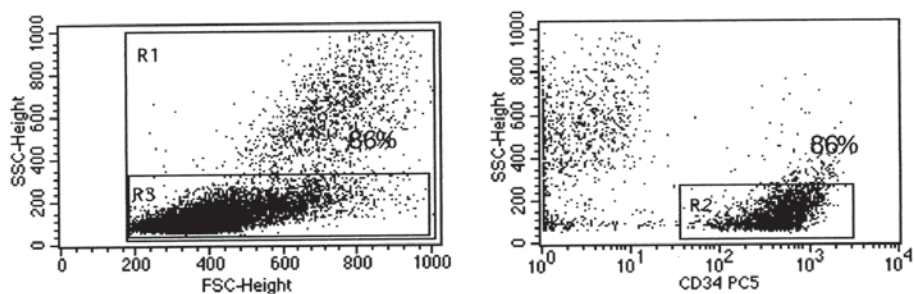
RYCINA 7. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – mature B ALL



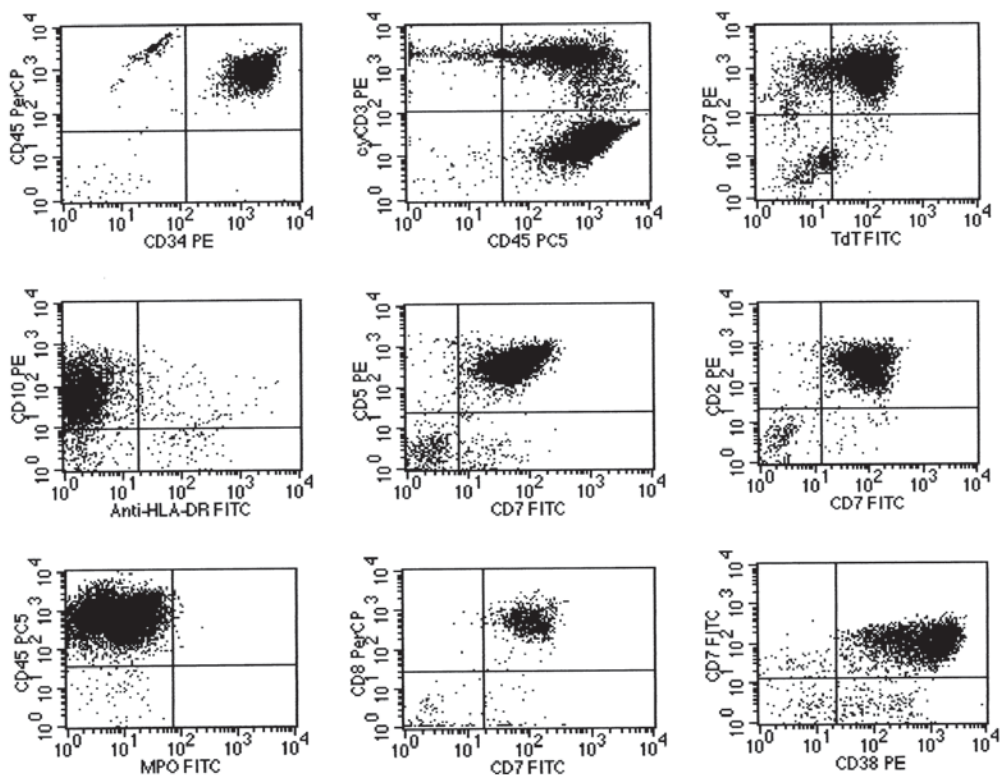
CD34+, CD45+, cCD3+, CD7+, Tdt+, CD38+,
CD5-, CD10-, CD2-, CD8-, CD3-, HLA-DR-, MPO-, CD15-, CD117-



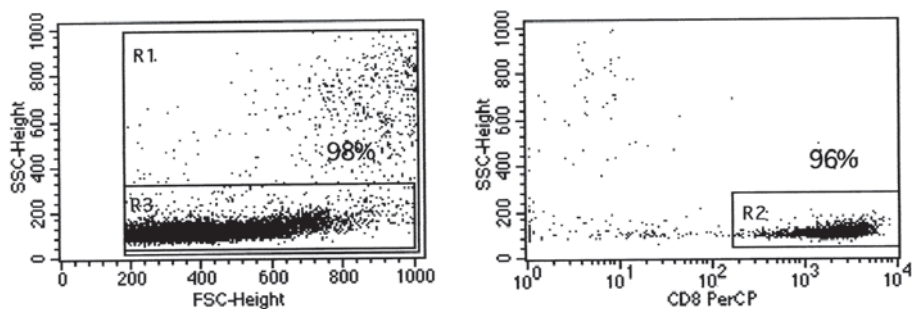
RYCINA 8. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – pro-T ALL



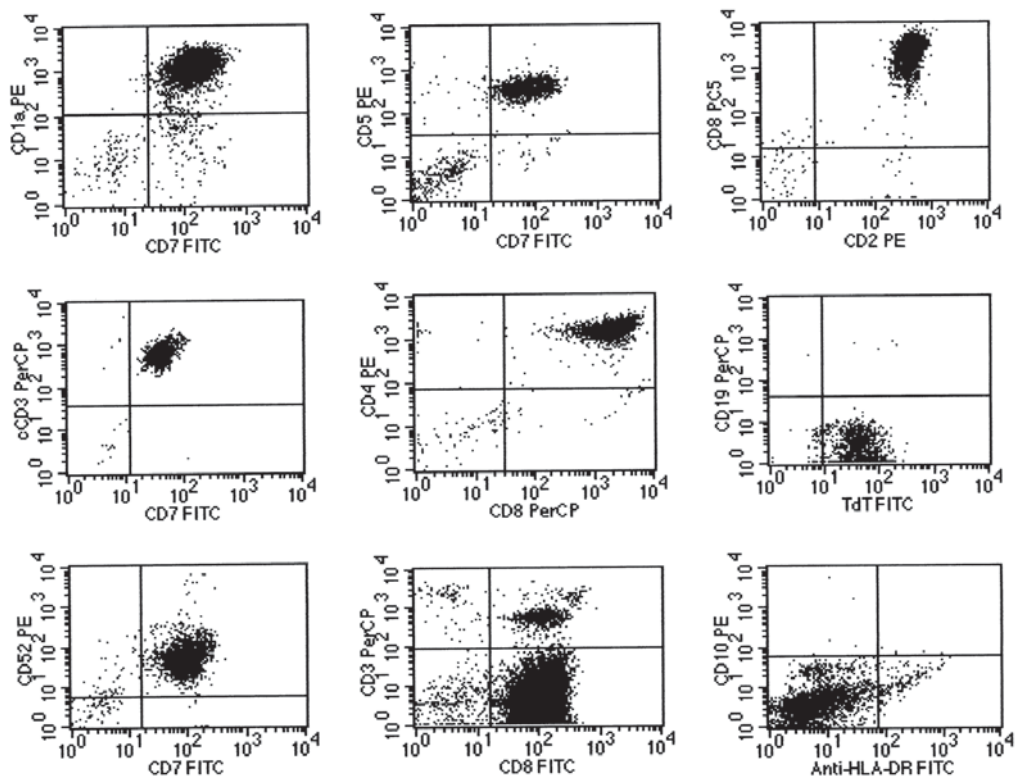
CD34+,CD45+,cCD3+,TdT+,CD7+,CD5+,CD10+,CD2+,CD8+,CD38+
CD3-,HLA-DR-,MPO-,



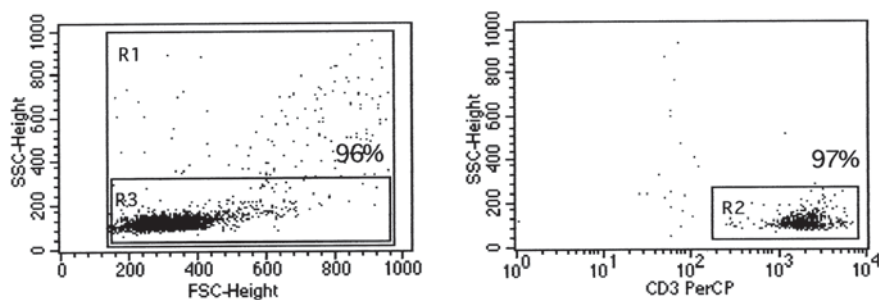
RYCINA 9. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – pre-T ALL



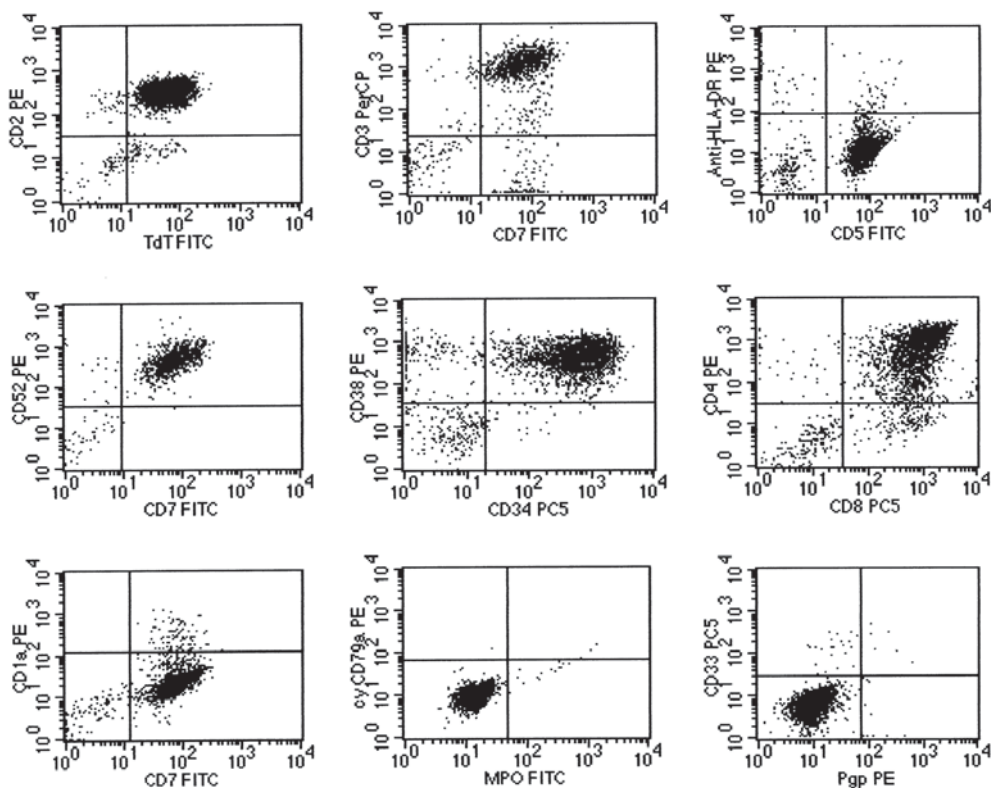
CD1a+, cCD3+, TdT+, CD7+, CD5+, CD2+, CD8+, CD4+, CD45+, CD38+,
CD34-, HLA-DR-, CD10-, CD3-/+



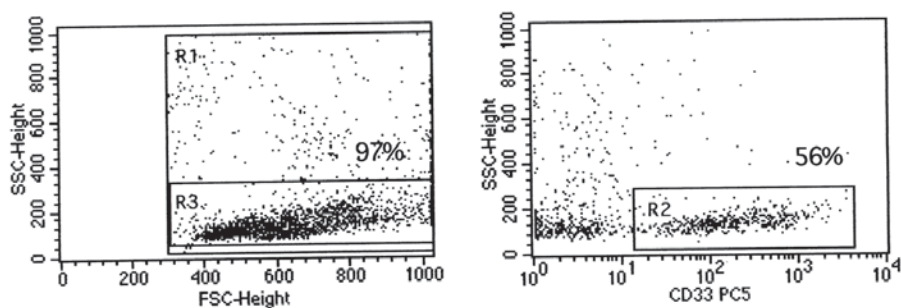
RYCINA 10. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – cortical T ALL



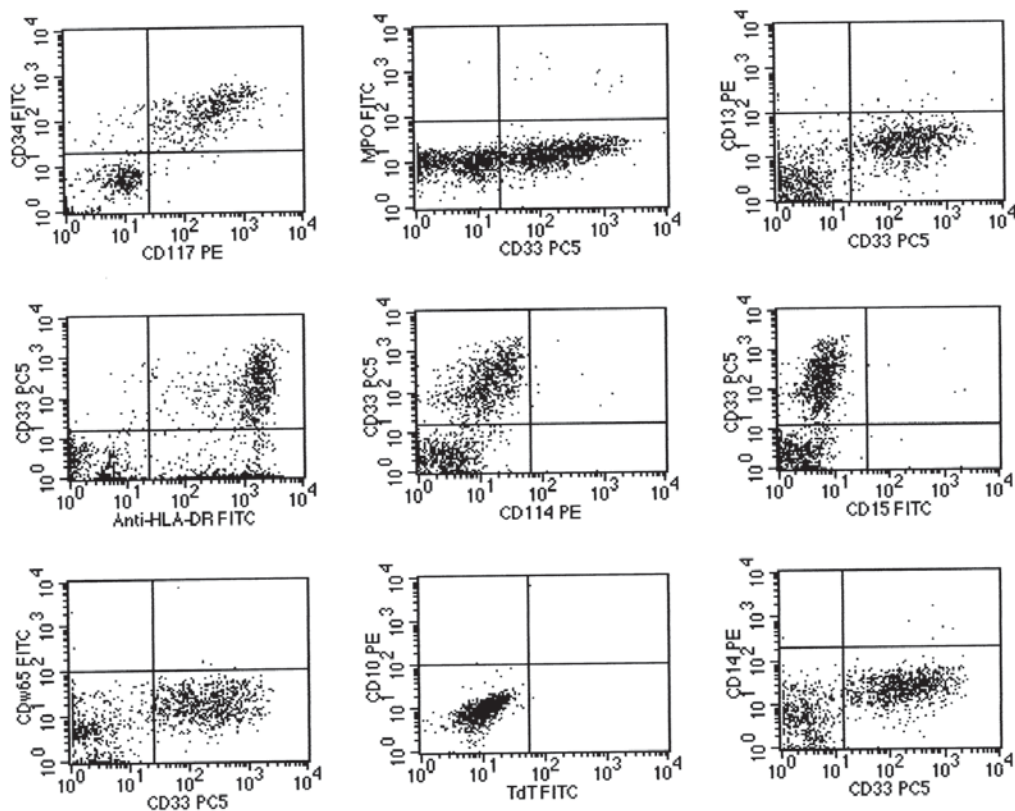
CD34+,CD38+,CD45+,cCD3+,TdT+,CD7+,CD5+,CD2+,CD8+,CD3+,CD4+,CD52+
HLA-DR-,CD10-,MPO-,CD33-,CD1a-



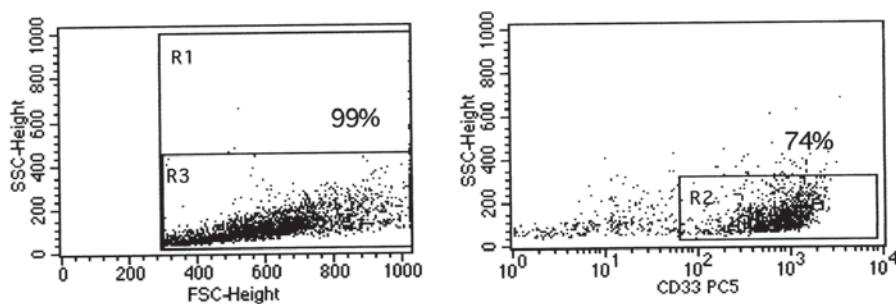
RYCINA 11. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – mature T ALL



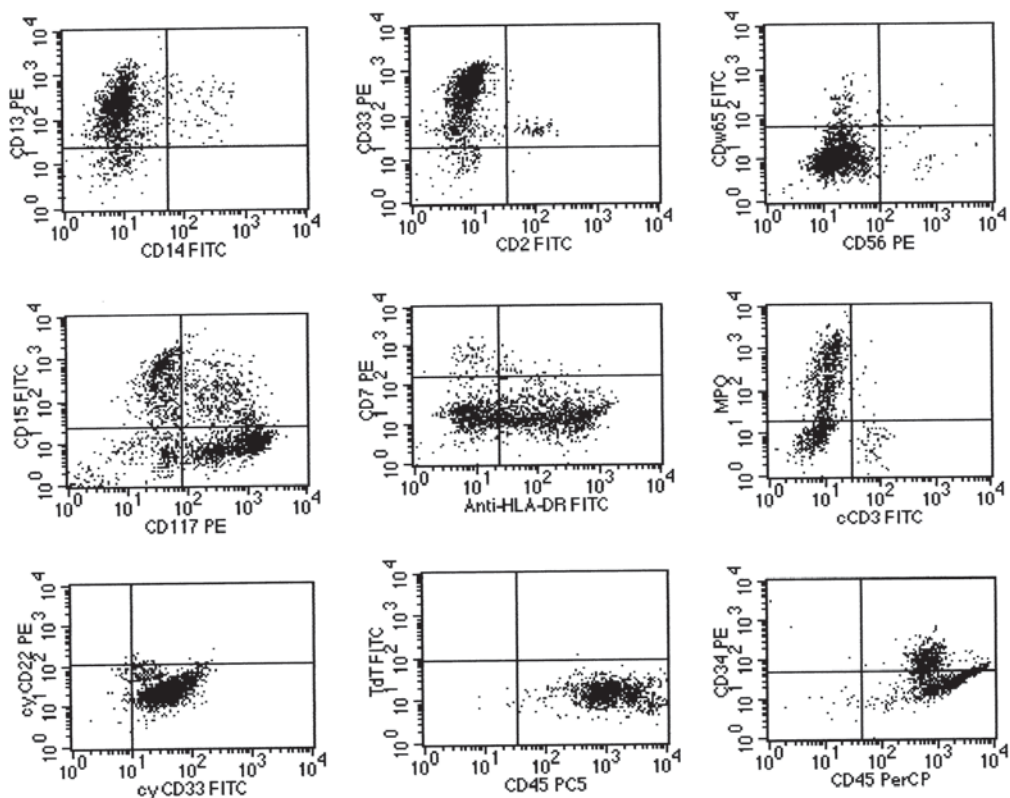
CD34+,HLA-DR+,CD117+,CD33+,CD45+,
MPO-,TdT-,CD13-,CD15-,CD114-,CD65-,CD14-



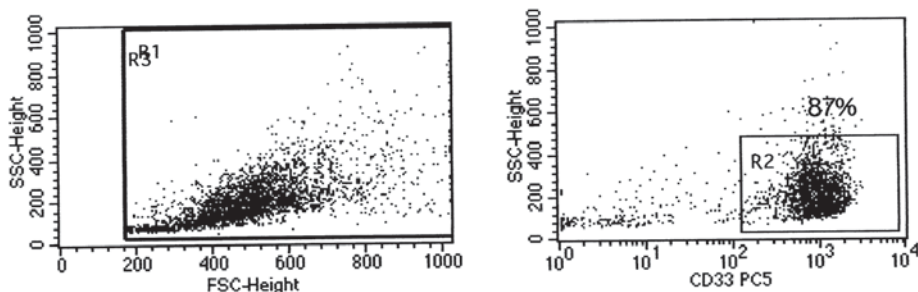
RYCINA 12. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki mieloblastycznej bez cech różnicowania (FAB-M0)



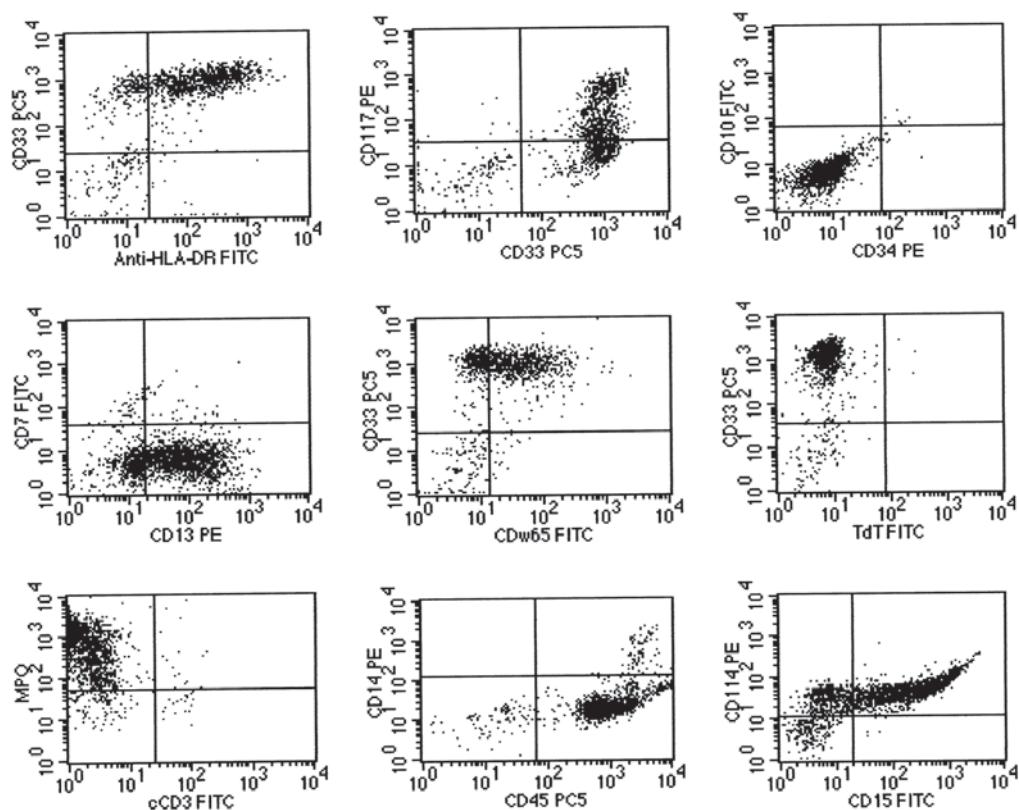
HLA-DR+, CD117+, CD13+, MPO+, CD45+, s/cCD33+, CD15-/-+, CD34-/-+, CD65-, Tdt-, CD56-, CD14-.



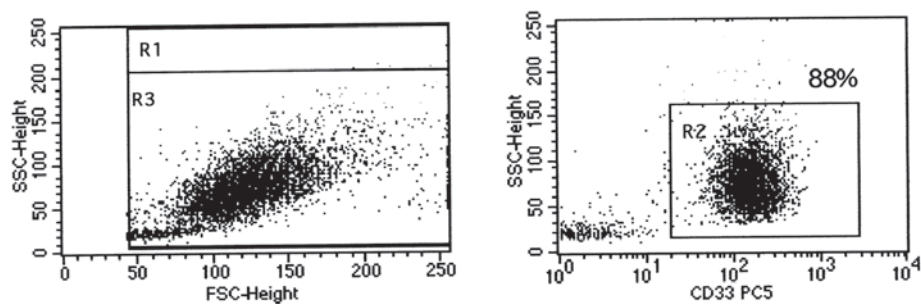
RYCINA 13. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki mieloblastycznej minimalnie zróżnicowanej (FAB-M1)



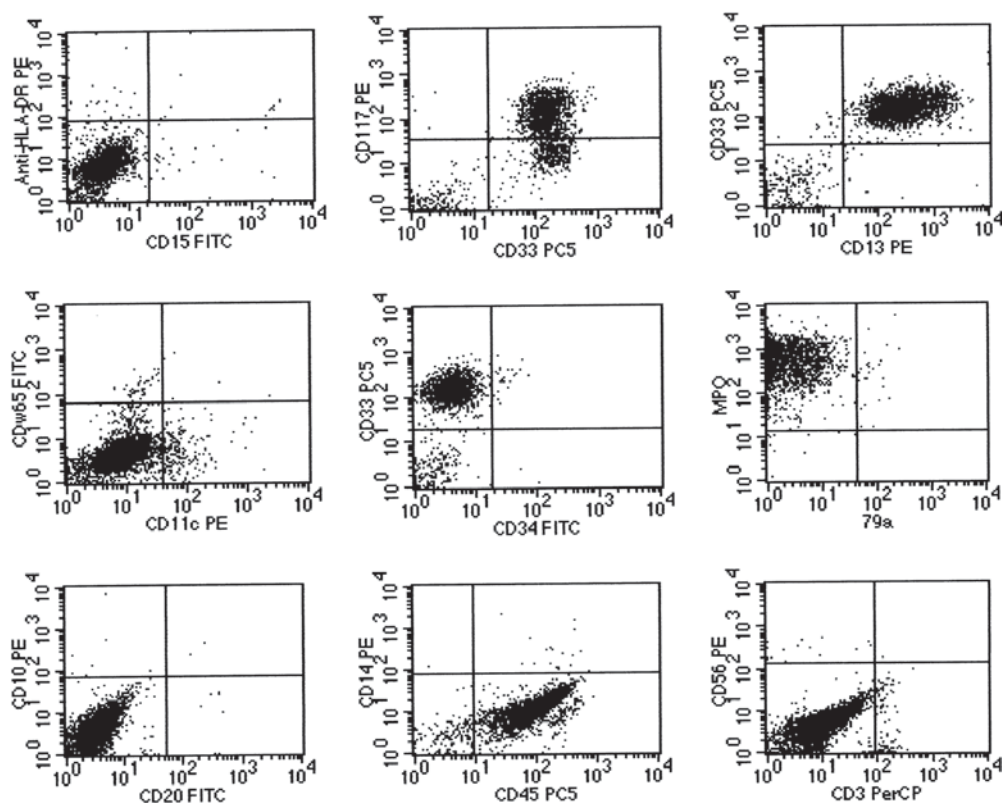
CD117+,HLA-DR+,MPO+,CD45+,CD33+,CD13+,CD15+,CD65+,CD114+,
TdT-,CD34-



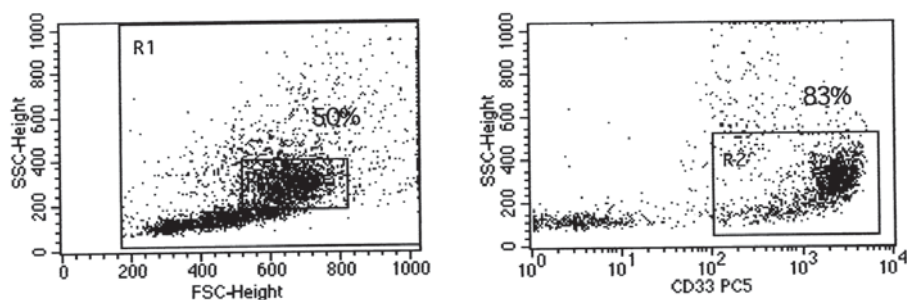
RYCINA 14. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki mieloblastycznej z cechami zróżnicowania (FAB-M2)



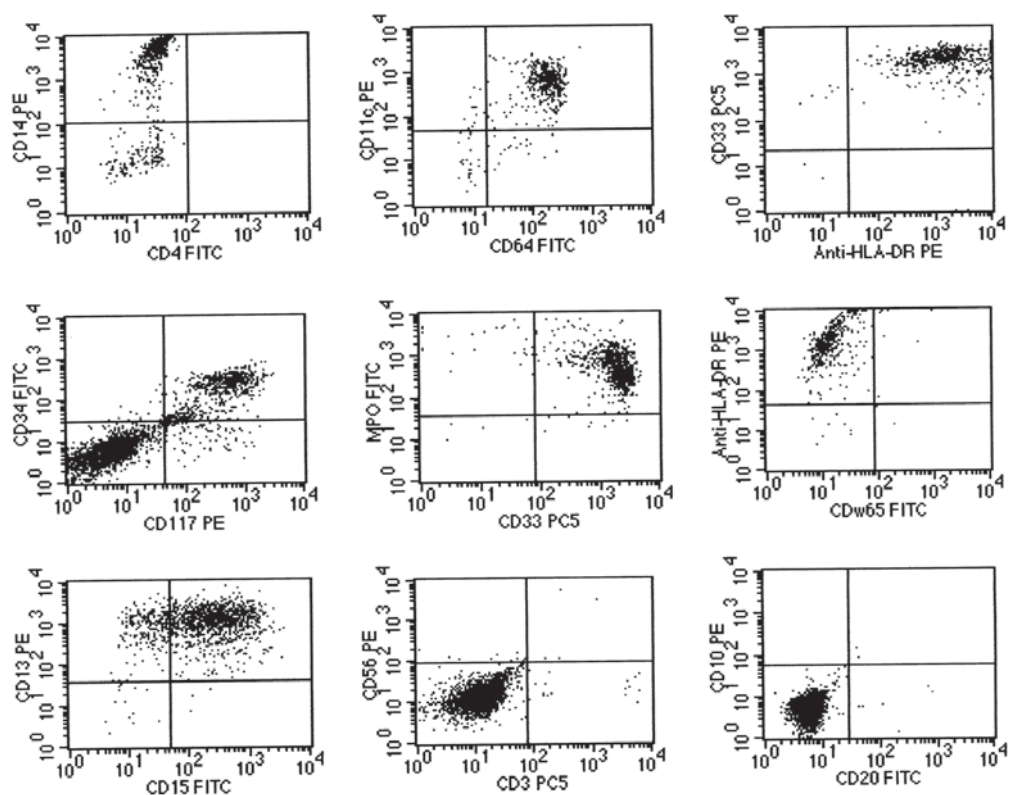
MPO+, CD45+, CD33+, CD117+, CD13+,
CD34-, HLA-DR-, CD15-, CD11c-, CD65-



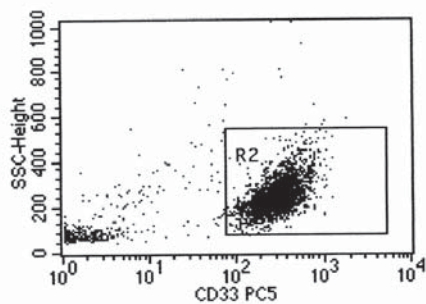
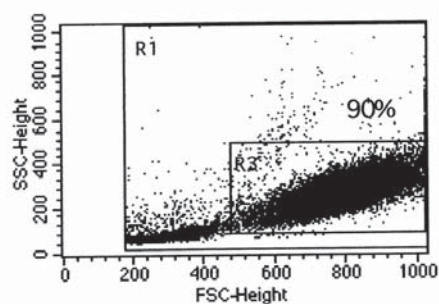
RYCINA 15. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki promielocytowej (FAB-M3)



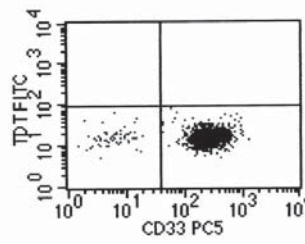
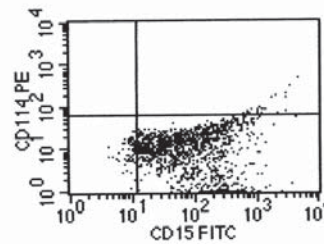
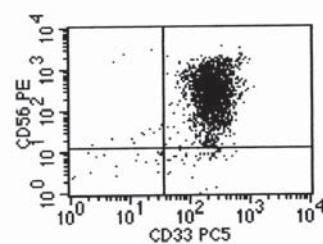
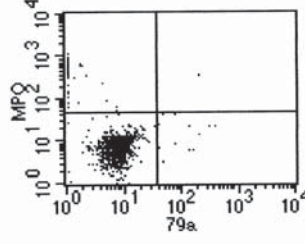
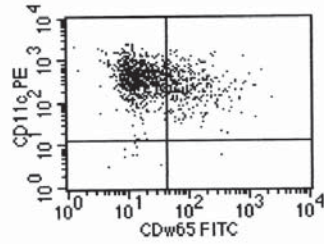
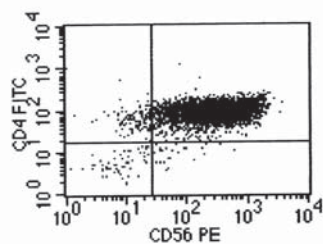
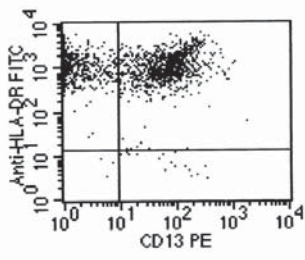
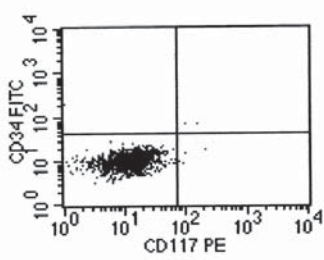
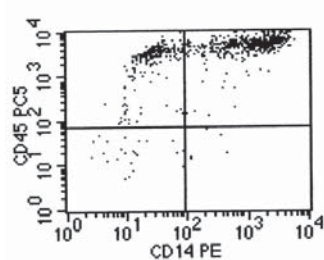
CD34+,HLA-DR+,MPO+,CD45+,CD33+,CD117+,CD13+,CD11c+,CD64+,CD4+,
CD14+,CD15+,CD65-,CD56-.



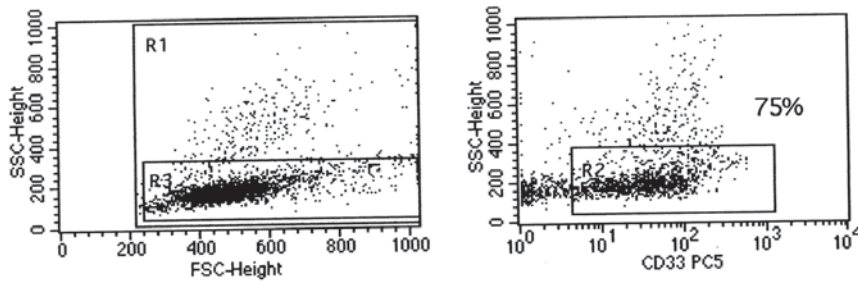
RYCINA 16. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki mielomonocytowej (FAB-M4)



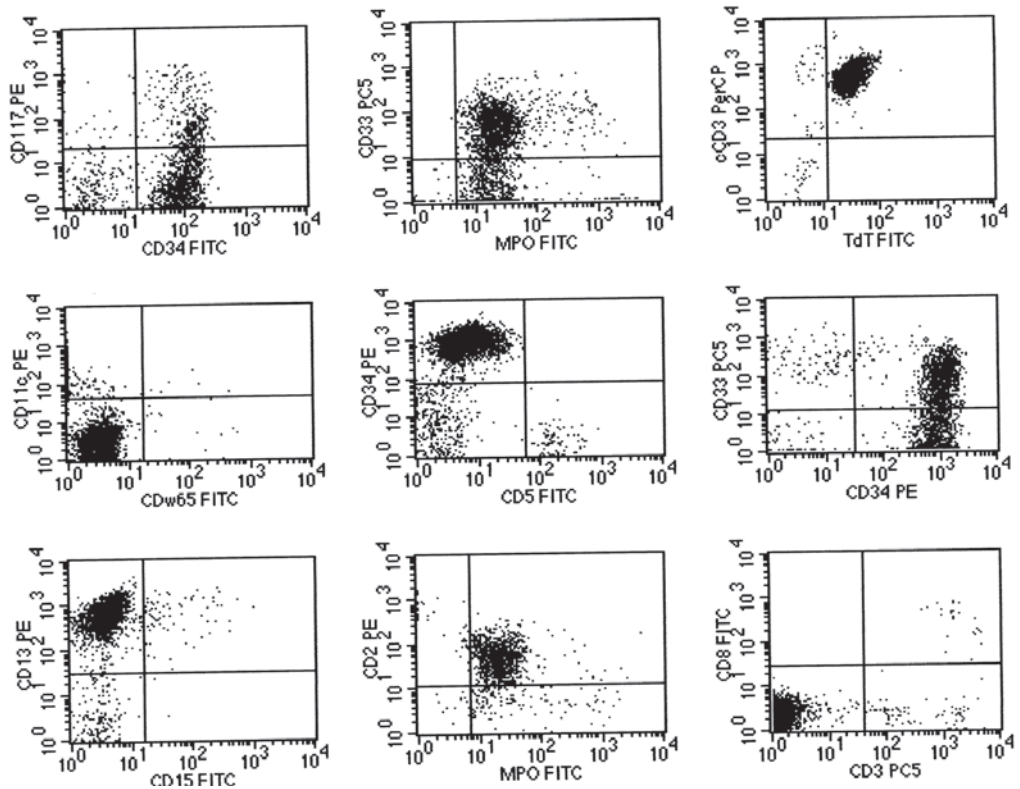
HLA-DR+, CD45+, CD33+, CD13+, CD11c+, CD14+, CD4+, CD56+, CD15+
MPO-, CD34-, CD117-, Tdt-, CD65-, CD114-



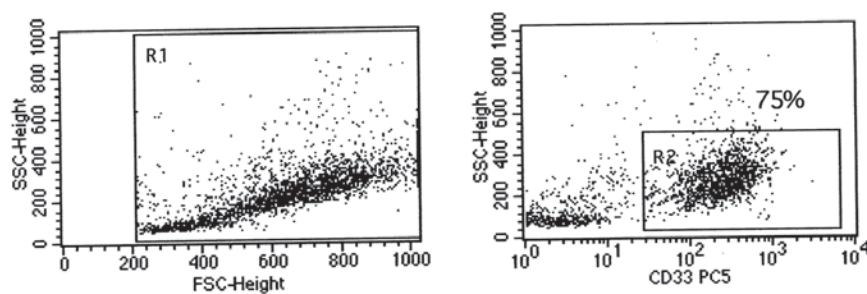
RYCINA 17. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki monocytowej (FAB-M5)



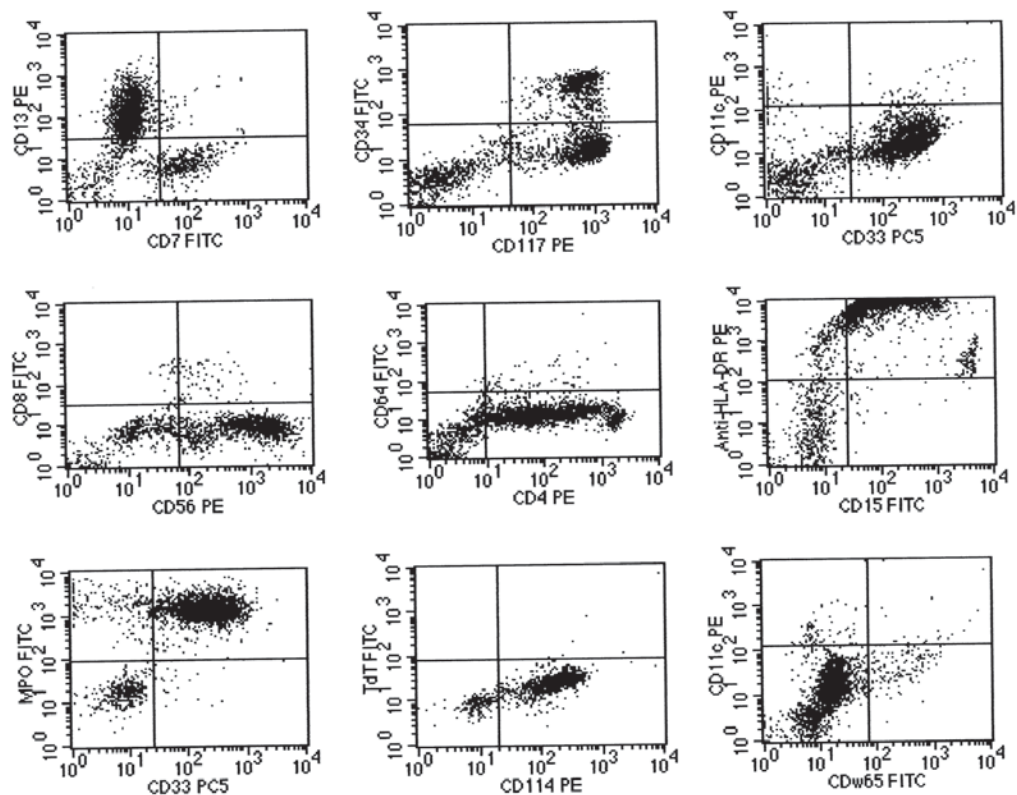
CD34+,HLA-DR+,CD33+,CD13+,MPO+,TdT+,cCD3+,CD2+,
CD117-/+,CD11c-,CD65-,CD15-,CD3-,CD4-,CD8-,CD5-



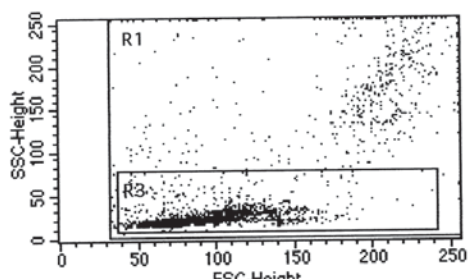
RYCINA 18. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki dwufenotypowej AML/ALL-T



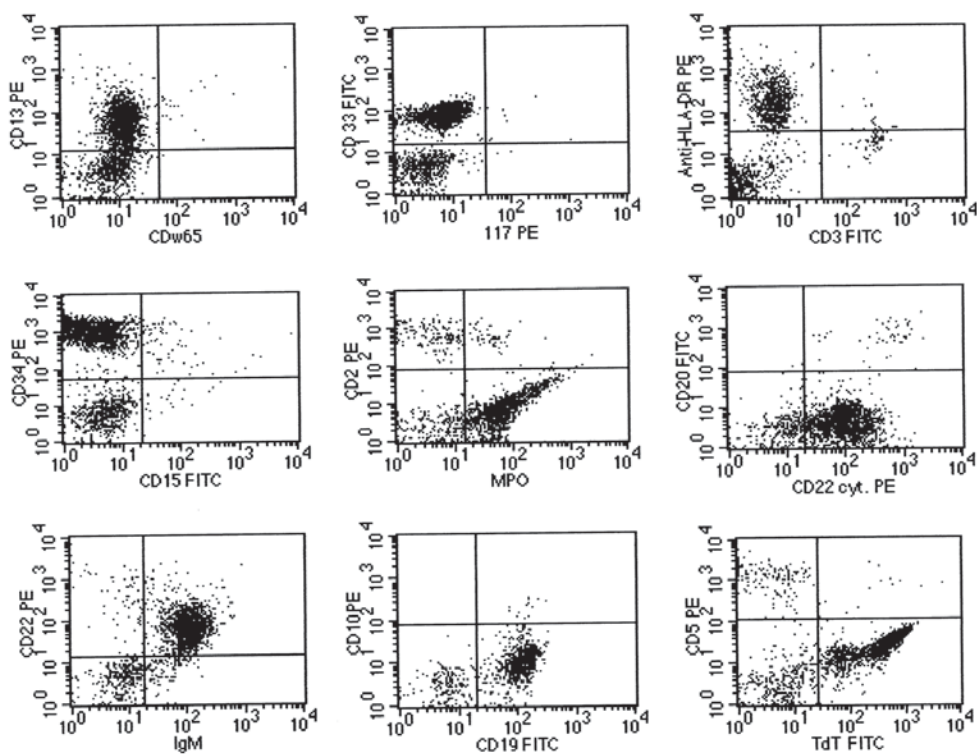
CD117+,HLA-DR+,CD33+,CD15+,MPO+,CD114+,CD4+,CD56+,CD45+,
CD34-/,Tdt-,CD11c-,CD65-,CD64-,CD7-



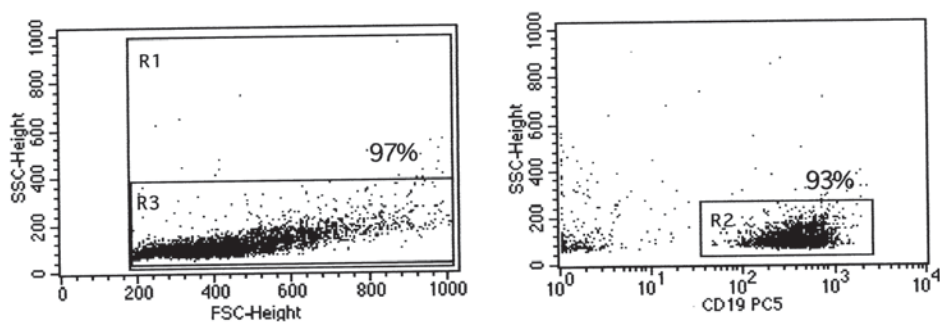
RYCINA 19. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki mieloblastycznej z koekspresją antygenów CD4+ i CD56+



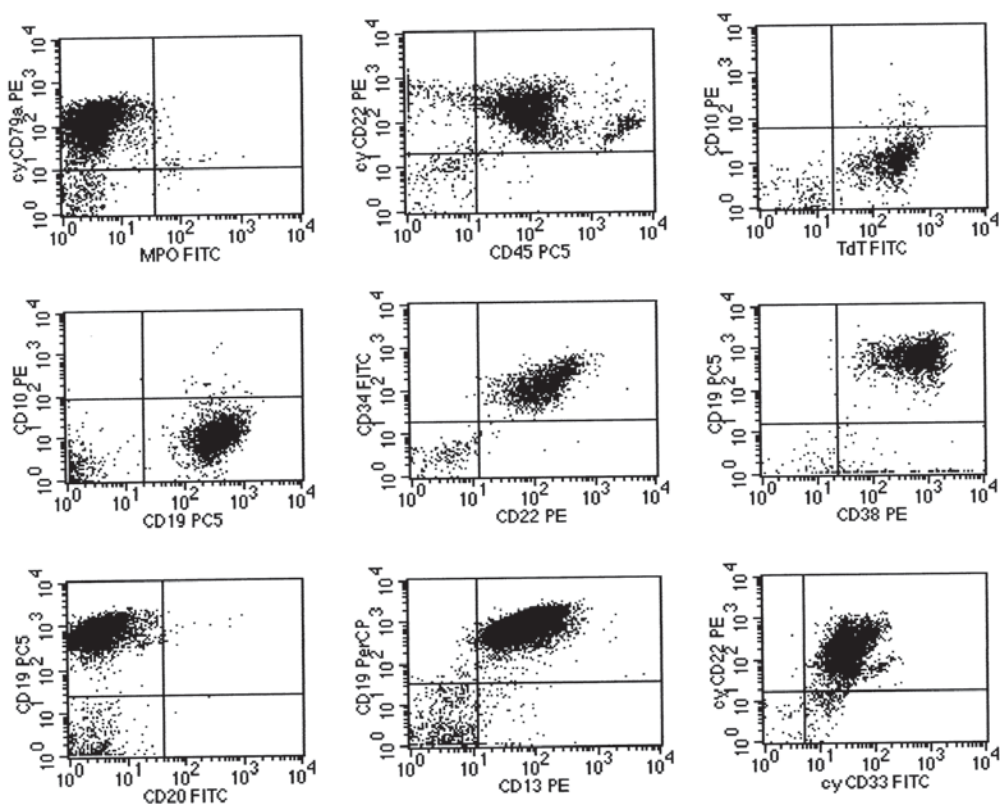
CD34+,HLA-DR+,CD33+,CD45+,CD13+,MPO+,TdT+,cCD22+,CD19+,CD22+,IgM+,
CD117-,CD11c-,CD65-,CD15-,CD10-,CD20-,CD3-



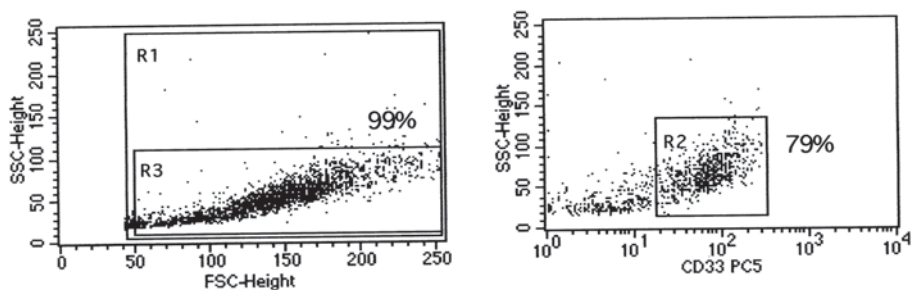
RYCINA 20. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki dwufenotypowej AML/ALL-B



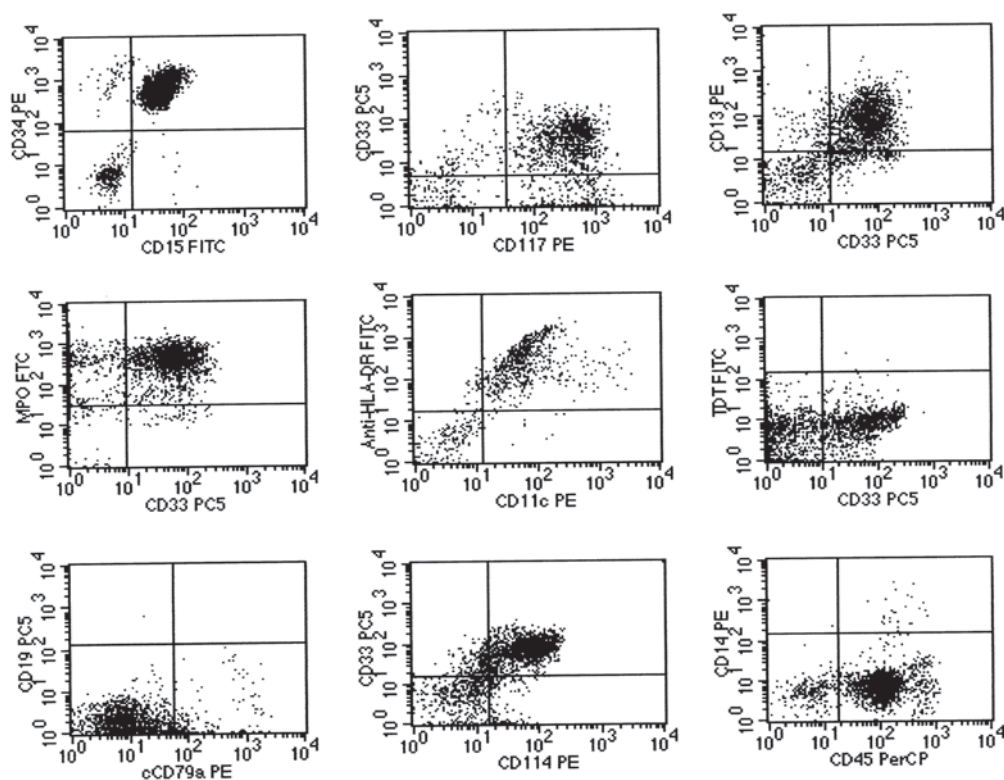
CD34+,HLA-DR+,cCD22+,cCD79a+,TdT+,CD19+,CD13+,cCD33+,CD45+,
CD10-,CD20-,MPO-



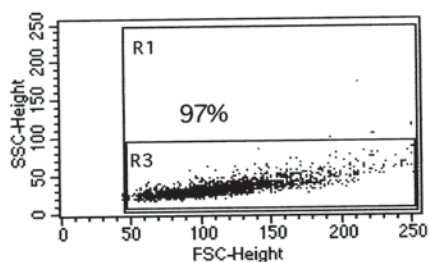
RYCINA 21. Przykład immunofenotypu ostrej białaczki limfoblastycznej – pro-B ALL z koekspresją antygenów CD13+ i CD33+



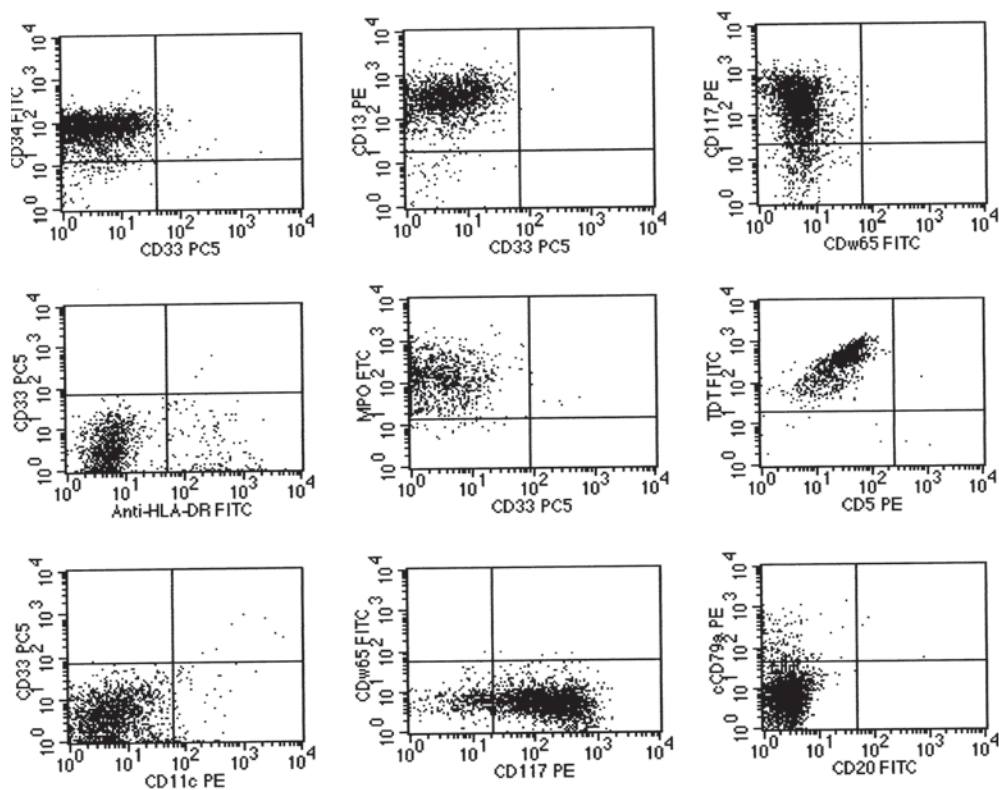
CD34+, CD15+, MPO+, CD117+, CD13+, HLA-DR+, CD33+, CD11c+,
CD65-, CD19-, CD14-, Tdt-, CD79a-



RYCINA 22. Przykład immunofenotypu asynchronicznego w ostrej białaczce mieloblastycznej



CD34+, CD45+, MPO+, TdT+, CD117+, CD13+,
HLA-DR-, CD33-, CD65-, CD11c-, CD15-, CD79a-, CD20-,



RYCINA 23. Przykład immunofenotypu niepełnego w ostrej białaczce mieloblastycznej

PIŚMIENNICTWO

- [1] BENE MC, CASTOLDI G, KNAPP W. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Proposal for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; **9**: 1783–1786.
- [2] BENE MC, BERNIER M, CASASNOVAS RO, CASTOLDI G, DOEKHARAN D, VAN DER HOLT B, KNAPP W, LEMEZ P, LUDWIG WD, MATUTES E, ORFAO A, SCHOCH C, SPERLING CH, VAN VEER MB. Acute myeloid leukemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis 241 patients. *J Haematol* 2001; **113**: 737–745.
- [3] BLAISE D, GASPARD MH, STOPPA A M. Allogenic, autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant* 1990; **5**: 7.
- [4] BOLDT DH, KOPECKY KJ, HEAD D, GEHLY G, RADICH JP, APPELBAUM FR. Expression of myeloid antigens by blast cells in acute lymphoblastic leukemia of adults. The Southwest Oncology Group experience. *Leukemia* 1994; **8**: 2118–2126.
- [5] BUCCHERI V, MATUTES E, DYER MJS, CATOVSKY D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia* 1993; **7**: 919–927.
- [6] CALIGIURI MA, RITZ J. Immunology. W: Leukemia. Henderson ES, Lister TA. [red.] Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company 1990; 105–139.
- [7] CAMPANA D, DONGEN JJM, METHA A, COUSTAN-SMITH E, WOLVERS-TETTERO ILM, GANESHAGURU K, JANOSSY G. Stage of T-cell receptor protein expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; **77**: 1546–1554.
- [8] CAMPANA D, PUI CHH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; **85**: 1416–1434.
- [9] CAREY JL, HANSON CA. Flow cytometric analysis of leukemia and lymphoma. W: Flow cytometry and clinical diagnosis. KEREN DF, HANSON CA, HURTUBISE PE [red.] American Society of Clinical Pathologists 1994; 197–227.
- [10] CARBONELL F, SWANSBURY J, MIN T, MATUTES E, FARAHAT N, BUCCHERI V, MORILLA R, SECKER-WALKER L, CATOVSKY D. Cytogenetic findings in acute biphenotypic leukemia. *Leukemia* 1996; **10**: 1283–1287.
- [11] CASCIVILLA N, MUSTO P, D'ARENA G, LADOGANA S, MELILLO I, CARELLA MA, PERLA G, MATERA R, CAROTENUTO M. Are „early” and „late” T-acute lymphoblastic leukemias different diseases? A single center study of 34 patients. *Leukemia Lymphoma* 1996; **21**: 437–442.
- [12] CATOVSKY D, MATUTES E, BUCCHERI V, SHETTY V, HANSLIP J, YOSHIDA N, MORILLA RA. Classification of acute leukemia for 1990s. *Ann Hematol* 1991; **62**: 16–21.
- [13] COHEN PL, HOYER JD, KURTIN PJ, DEWALD GW, HANSON CA. Acute myeloid leukemia with minimal differentiation. A multiple parameter study. *Amer J Clin Pathol* 1998; **109**: 32–37.
- [14] CORTES JM, KANTARIJAN HM. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer* 1995; **76**: 2393.
- [15] CRIST WM, SHUSTER JJ, FALLETTA J, PULLEN DJ, BERARD CW, VIETTI TJ, ALVARADO CS, ROPER MA, PRASTHOFER E, GROSSI CE. Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation. *Blood* 1988; **72**: 1891–1897.
- [16] DEL POETA G, STASIR, VENDITTIA, SUPPO G, ARONICA G, BRUNO A, MASI M, TABILIO A, PAPA G. Prognostic value of cell marker analysis in *de novo* acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; **8**: 388–393.
- [17] DEL VECCHIO L, FASANARO A, SCHIAVONE EM, FERRARA F. B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) heterogeneity. *Brit J Hemat* 1989; **72**: 291.
- [18] DREXLER HG, THIEL E, LUDWIG WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1991; **5**: 637–645.
- [19] DREXLER HG, THIEL E, LUDWIG WD. Acute Myeloid Leukemias Expressing Lymphoid-Associated Antigens: Diagnostic Incidence and Prognostic Significance. *Leukemia* 1993; **7**: 489–498.
- [20] FERRARA F, FINIZIO O, DE ROSA C, METTIVIER V, MELE G, RAMETTA V, SPADA OA, DEL VECCHIO L. Acute myeloid leukemia expressing T-cell antigens: clinic-hematological correlations and prognostic relevance. *Leukemia/Lymphoma* 1990; **3**: 217–222.
- [21] FOON KA, TODD RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; **68**: 1–31.
- [22] DIGIUSEPPE JA, BOROWIRTZ MJ. Clinical Applications of flow cytometric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia. W: Immunophenotyping. STEWARD CC, NICHOLSON JKA [red.] Wiley-Liss, Inc. 2000: 161–180.

- [23] GORIN NC, AEGERTER P, AUVERT B. Autologous bone marrow transplantation (ABMT) for acute leukemia in remission: Analysis on 1,322 cases. *Bone Marrow Transplant* 1989; **4**: 3.
- [24] GREER JP, BAER MR, KINNEY MC. Acute Myelogenous Leukemia. W: Wintrobe's Clinical Hematology. LEE GR, FORESTER J, LUKENS J i wsp. [red.] Williams & Wilkins, Baltimore 1999: 2272–2319.
- [25] GROENEVELD k, MARVELDE IG, van den BEEMD MWM, HOOIJKAAS H, van DONGEN JJM. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* 1996; **10**: 1383–1389.
- [26] GUGLIELMI C, CORDONE I, BOECKLIN F, MASIS S, VALENTINI T, VEGNAMI, FERRARIA, TESTI AM, FOA R. Immunophenotype of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: changes at first relapse and clinic-prognostic implications. *Leukemia* 1997; **11**: 1501–1507.
- [27] HAAS M, YU A, GJERSET R. Characteristics of the leukemia cell in childhood acute lymphoblastic T-cell leukemia at diagnosis. *Leukemia* 1990; **3**: 230–234.
- [28] HEAD DR. Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; **10**: 1826–1831.
- [29] HELLEBERG C, KNUDSEN H, HANSEN PB, NIKOLAJSEN K, KJAERGAARD E, RALFKIAER E, JOHNSEN HE. CD34+ megakaryoblastic leukemic cells are CD38-, but CD61+ and glycophorin A+: improved criteria for diagnosis of AML-M7? *Leukemia* 1997; **11**: 830–834.
- [30] HUH YO, ANDREEF M. Flow cytometry. Clinical and research applications in hematologic malignancies. *Hematol/Oncology Clinics of North America* 1994; **8**: 703–723.
- [31] JENINGS DC, FOON KA. Recent Advances in Flow Cytometry to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood* 1997; **90**: 2863–2892.
- [32] KANTARIJAN HM, HIRSCH-GINSBERG C, YEE G, HUH Y, FREIREICH EJ, STRASS S. Mixed lineage leukemia revisited: acute lymphocytic leukemia with myeloperoxidase-positive blasts by electron microscopy. *Blood* 1990; **90**: 2863–2892.
- [33] KAWIAK J. Rola i miejsce cytometrii przepływowej w badaniach klinicznych. *Centr Europ J Immunol* 1996; **21**: 94–98.
- [34] KEATING MJ, SUCIU S, De WITTE T, MANDELLI F, WILLEMZE R, RESEGOTTI L, BROCCIA G, THALER J, LABAR B, DAMASIO E, BIZZI B, ROTOLI B, VEKHOFF A, MUUS P, PETTI MC, DARDENNE M, SOLBU G, VEGNA ML, ZITTOUN RA. Prognostic factors of patients with acute myeloid leukemia (AML) allografted in first complete remission: an analysis of the EORTC-GIMEMA AML 8A trial. The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Maligne dell'Adulto (GIMEMA). Leukemia Cooperative Groups. *Bone Marrow Transplant* 1996; **17**: 993–1001.
- [35] KHALIDI HS, MEDEIROS LJ, CHANG KL, SLOVAK ML, ARBER DA. The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype. French-American-British classification and cytotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol* 1998; **109**: 211–220.
- [36] KINNEY MC, LUKENS JN. Classification and differentiation of the acute leukemias. W: Wintrobe's Clinical Hematology. LEE GR, FORESTER J, LUKENS J i wsp. [red.] Williams & Wilkins, Baltimore 1999: 2209–2240.
- [37] KITA K, MIWA H, NAKASE K, KAWAKAMI K, SHIRAKAWA S, TANAKA I, OHTA C, TSUTANI H, OGUMA S, KYO T, DOHY H, KARANDA N, NASU K, UCHINO H. (The Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma): Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. *Blood* 1993; **81**: 2399–2406.
- [38] KNAPP W, STROBL H, MAJDIC O. Flow Cytometric Analysis of Cell Surface and Intracellular Antigens in Leukemia Diagnosis. *Cytometry* 1994; **18**: 187–198.
- [39] KRISHAN A, SAUERTEIG A, ANDRITSCH I, WELLHAM L. Flow cytometric analysis of the multiple drug resistance phenotype. *Leukemia* 1997; **11**: 1138–1146.
- [40] LAMKIN T, BROOKS J, ANNET G, ROBERTS W, WEINBERG K. Immunophenotyping differences between putative hematopoietic stem cells and childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 1994; **8**: 1871–1878.
- [41] LARSON RA, STOCK W, HOELZER DF, KANTARIJAN H. Acute lymphoblastic leukemia in adults. American Society of Hematology Education Program Book, 1998.
- [42] LAVABRE-BERTRAND T, JANOSSY G, IVORY K, PETERS R, SECKER-WALKER L, PORWIT-McDONALD A. Leukemia associated changes identified by quantitative flow cytometry: I. CD10 expression. *Cytometry* 1994; **18**: 209–217.
- [43] LEGRAND O, PERROT JY, SIMONIN G, BAUDARD M, CADIOU M, BLANCC, RAMOND S, VIGUIE F, MARIE JP, ZITTOUN R. Adult biphenotypic acute leukaemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression. *Brit J Haemat* 1998; **100**: 147–155.

- [44] LICHTMAN MA. Acute myelogenous leukemia. W: Williams Hematology. BEUTLER E, LICHTMAN MA, COLLIER BS, KIPPS TJ [red.]. McGraw-Hill, Inc. New York 1995: 272–298.
- [45] LOKEN MR, WELLS DA. Normal antigen expression in hematopoiesis. Basis for interpreting leukemia phenotypes. W: Immunophenotyping. STEVARD CC, NICHOLSON JKA [red.]. Wiley-Liss, Inc. 2000: 133–160.
- [46] LUDWIG WD, BARTRAM CR, RITTER J, HILDEMAN W, HEIL G, HARBOT J, SEIBT-JUNG H, TEICHMANN JV, RIEHM H. Ambiguous phenotypes and genotypes in 16 children with acute leukemia as characterized by multiparameter analysis. *Blood* 1998; **71**: 1518–1528.
- [47] LUDWIG WD, REITER A, LOFTLER H, GOKBUGET, HOELZER D, RIEHM H, THIEL E. Immunophenotypic features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): experience of the German Multicentre Trials ALL-BFM and GMALL. *Leukemia and Lymphoma* 1994; **13**: 71–76.
- [48] MAJ S, MARIANŃSKA B, SEIFRYDOWA H. Hematologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996: 11–232.
- [49] MECKENSTOCK G, HEYLL A, SCHNEIDER EM, HILDEBRANDT B, RUNDE V, AUL C, BARTRAM CR, LUDWIG WD, SCHNEIDER W. Acute leukemia co-expressing myeloid, B- and T-lineage.
- [50] NIEZABITOWSKI A, LACKOWSKA B. Cytofluorymetria przepływowa – metoda i jej zastosowanie. *Diag Lab* 1991; **1**: 3–16.
- [51] PAIETTA E. Proposals for the immunological classification of acute leukemia. *Leukemia* 1995; **9**: 2147–2157.
- [52] PARASKEVAS F. Clinical Flow Cytometry. W: Wintrobe's Clinical Hematology. LEE GR, FORESTER J, LUKENS J i wsp. [red.] Williams & Wilkins Baltimore 1999: 56–71.
- [53] PETRIZ J, GARCIA-LOPEZ J. Flow cytometric analysis of p-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia* 1997; **11**: 1124–1130.
- [54] PIĄTKOWSKA-JAKUBAS B, PITUCH-NOWOROLSKA A, SKOTNICKI AB, BALANA-NOWAK A. Znaczenie diagnostyczne określania immunofenotypu blastów u chorych na ostre białaczki. *Acta Haematol Polon* 1996; **27**: 33–41.
- [55] PIRUCCELLO SI, JOHNSON DR. Reagents for flow cytometry: monoclonal antibodies and hematopoietic cell antigens. W: Flow cytometry and clinical diagnosis. KEREN DF, HANSON CA, HURTUBISE PE. [red.] ASCP, Chicago, 1994: 56–91.
- [56] PITUCH-NOWOROLSKA A. Zastosowanie cytometrii do diagnostyki białaczek i chłoniaków niezróżnicowanych. *Centr Europ J Immunol* 1996; **21**: 138–146.
- [57] PITUCH-NOWOROLSKA A, GAWLIĆKA M, BALWIERZ W, STROJNY W. Atypical phenotypes of leukemic cells in acute leukemia in children. *Acta Haemat Polon* 1997; **28**: 53–63.
- [58] PITUCH-NOWOROLSKA A. Właściwości biologiczne i wrażliwość na leczenie indukcyjne komórek rozrostowych o nietypowym immunofenotypie w ostrych białaczkach u dzieci. *Folia Med Cracov* 2001; **42**, 3: 5–81.
- [59] PRETI HA, HUH YO, O'BRIEN SM, ANDREEF M, PIERCE ST, KEATING M, KANTARIJAN HM. Myeloid markers in adult acute lymphocytic leukemia. Correlations with patient and disease characteristics and with prognosis. *Cancer* 1995; **76**: 1564–1570.
- [60] PUI Ch-H, RUBNITZ JE, HANCOCK ML, DOWNING JR, RAIMONDI SC, RIVERA GK, SANDLUND JT, RIBEIRO RC, HEAD DR, RELLING MV, EVANS WE, BEHM FG. Reappraisal of the clinical and biological significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncology* 1998; **16**: 3768–3773.
- [61] ROBAK T, KRAWCZYŃSKA A. Ostra białaczka niezróżnicowana i nieznacznie zróżnicowana. *Acta Haemat Polon* 1994; **25**: 5–12.
- [62] ROBERTSON MJ, RITZ J. Prognostic significance of the surface antigens expressed by leukemic cells. *Leukemia and Lymphoma* 1994; **13**: 15–22.
- [63] ROSS CW, STOOLMAN LM, SCHNITZER B, SCHLEGELMICH JA, HANSON CA. Immunophenotypic aberrancy in adult acute lymphoblastic leukemia. *Amer J Clin Path* 1990; **94**: 590–599.
- [64] ROTHE G, SMITZ G. Consensus protocol for the cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996; **10**: 877–895.
- [65] ROWE JM. Bone marrow transplantation in first remission. *Leukemia* 1997; **11**: 12.
- [66] RUCIŃSKA M, MACHACZKA M, PIĄTKOWSKA-JAKUBAS B, SKOTNICKI AB. Rola autologicznego przeszczepiania komórek hematopoetycznych w leczeniu ostrej białaczki szpikowej u dorosłych. *Przegl Lek* 1999; **56**: 44–52.
- [67] SAIKEYCH IA, KERRIGAN DP, McCONNEL TS, HEAD DR, APPELBAUM FR, WILLMAN. Multiparameter analysis of mixed lineage leukemia: Correlation of B/myeloid immunophenotype and immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements with the presence of Philadelphia chromosome translocation in acute leukemias with myeloid morphology. *Leukemia* 1991; **5**: 373–382.

- [68] SARTOR M, BRADSTOCK K. Detection of intracellular lymphoid differentiation antigens by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry* 1994; **18**: 119–122.
- [69] SHUMACHER HR. Acute leukemia. W: Difficult, controversial, automated analysis. RETFORD DC [red] Williams & Wilkins 1998.
- [70] SIEVERS EL, LOKEN MR. Detection of intracellular lymphoid differentiation antigens by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. *J Ped Hematol Oncol* 1995; **17**: 123–133.
- [71] SKOTNICKI AB. Diagnostyka i chemioterapia ostrych białaczek i zespołów mieloblastycznych. Kraków 1993.
- [72] SKOTNICKI AB, NOWAK WS. Podstawy hematologii dla studentów i lekarzy. *Medycyna Praktyczna*. Kraków 1998: 67–144.
- [73] SKOTNICKI AB, PIĄTKOWSKA-JAKUBAS B, MACHACZKA M, HAWRYLECKA D, WERDA L, JURCZYSZYN A, SZOSTEK M, BALANA-NOWAK A, WĘGLARSKA D, LORENZ F, WALTER Z, MENSAH P. Autologous transplants in acute leukemia patients – single centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**: 88.
- [74] SMITH LJ, CURTIS JE, MESSNER HA, SENN JS, FURTHMAYR H, McCULLOCH EA. Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* 1983; **61**: 1138–1145.
- [75] SOLARY E, CASASNOWAS RO, CAMPOS I, BENE MCh, FAURE G, MAINGON P, FALKENRODT, LENORMAND B, GENETED N, and the Groupe d'etude Immunologiques des Leucemies (GEIL). Surface markers in adult myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR- phenotypes with shorter survival. *Leukemia* 1992; **6**: 393–399.
- [76] STASI R, Del POETA VENDITTIA, COX MC, ABRUZZESE E, BRUNO A, BUCISANO F, TAMBURINI A, PAGANO A, AMADORI S. AML-M0: a biological and clinical profile. *Lab Hemat* 1998; **4**: 181–198.
- [77] STELZER GT, GOODPASTURE L. Use of multiparameter flow cytometry and immunophenotyping for the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia. W: Immunophenotyping. STEWARD CC, NICHOLSON JKA [red.] 2000 Wiley-Liss, Inc. 215–238.
- [78] SULAK LE, CLARE ChN, MORALE BA, HANSEN KL, MONTIEL MM. Biphenotypic acute leukemia in adults. *Am J Clin Pathol* 1990; **94**: 54–58.
- [79] SZCZEPAŃSKI T, SOŃTA-JAKIMCZYK D, MAZUR B. Immunologiczna klasyfikacja ostrych białaczek u dzieci. Prognostyczne znaczenie określania markerów immunologicznych i ich wykorzystanie do monitorowania choroby resztkowej. *Ped Polska* 1998; **9**: 937–947.
- [80] SYRJALAM, ANTILA VJ, RUUTU T, JANSSON SE. Flow cytometric detection of residual disease in acute leukemia by assaying blasts co-expressing myeloid and lymphatic antigens. *Leukemia* 1994; **8**: 1564–1570.
- [81] TAMUL KR, MAYERS DC, BENTLEY SA, FOLDS JD. Two color flow cytometric analysis of concomitant acute myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry* 1994; **18**: 30–34.
- [82] TERSTAPPEN LWMM, STAFFORD M, KONEMANN S, LOKEN M i wsp. Flow Cytometric Characterization of Acute Myeloid Leukemia. Part II. Phenotypic Heterogeneity at Diagnosis. *Leukemia* 1991; **5**: 757–767.
- [83] TERSTAPPEN LWMM, HUANG S, PICKER LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood* 1992; **79**: 666–677.
- [84] THIEN HF, WAND ChH, CHEN Y Ch, SHEN MCh, LIN DT, LIN KH. Characterization of acute myeloid leukemia (AML) co-expressing lymphoid markers: different biological features between T-cell antigen positive and B-cell antigen positive AML. *Leukemia* 1993; **7**: 688–695.
- [85] TIENSIWAKUL P, LERTLUM T, NUCHPRAYOON I, SEKSARN P. Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia in pediatric patients by three-color flow cytometric analysis. *Asian Pacific J Allergy and Immunology* 1999; **17**: 17–21.
- [86] VENDITTIA, Del POETA G, BUCCISANO F, TAMBURINI A, COX MC, STASI R, BRUNO A, ARONICA G, MAFFEI L, SUPPO G, SIMONE MD, FORTE L, CORDERO V, POSTROINO M, TUFFILLI V, ISACCHI G, MASI M, PAPA G, AMADORI S. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): Comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood* 1997; **89**: 621–626.