

## Citopatološka diagnostika ne-Hodgkinovih limfomov v izlivih

Veronika Kloboves Prevodnik, Marija Us-Krašovec

Pri bolnikih z ne-Hodgkinovimi limfomi (NHL) lahko infiltracija plevre, preikarda in peritoneja z limfomskimi celicami povzroči izliv v telesne votline (plevralni, preikardialni in abdominalni). Izliv se lahko med boleznijo pojavi zaradi razsoja limfoma ali zelo redko kot prvi in edini znak bolezni posebne oblike difuznega velikoceličnega B-limfoma, ki primarno nastane v steni telesnih votlin (1).

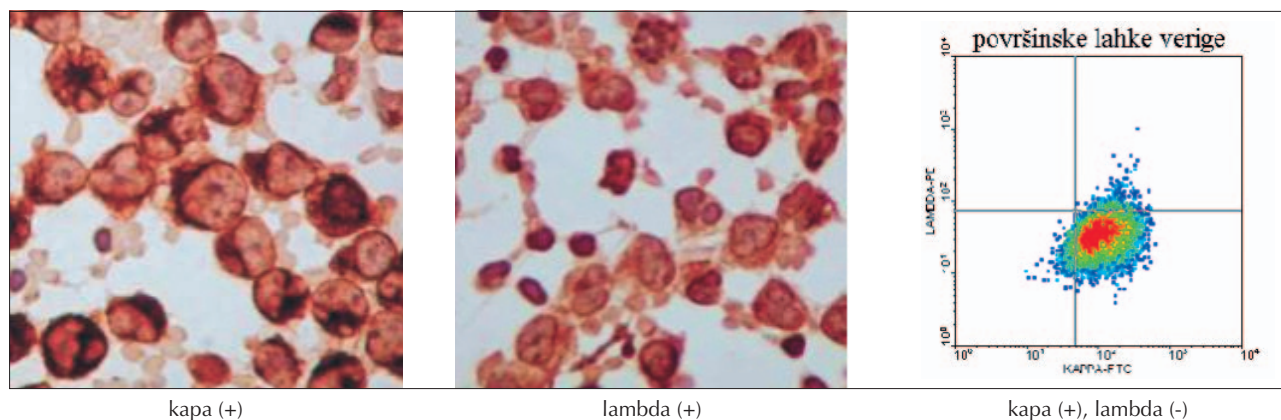
Pred začetkom zdravljenja NHL je treba opredeliti razširjenost bolezni (stadij), kar je pomembno za načrtovanje zdravljenja in napoved poteka bolezni. Če pride do izliva v serozno votlino, moramo s citopatološko preiskavo sedimenta ugotoviti, ali je izliv posledica infiltracije serozne membrane z limfomskimi celicami. V sedimentu izliva so limfomske celice lahko pomešane z reaktivnimi limfatičnimi celicami, granulociti, monociti, makrofagi in reaktivnimi mezotelijskimi celicami. Izkušnje kažejo, da z mikroskopsko, morfološko analizo razmazov sedimenta izliva odkrijemo limfomske celice v manj kot 10 % preiskanih izlivov pri bolnikih z NHL (2). Za zanesljivo diagnozo NHL v izlivih je zato nujna uporaba dodatnih metod, s katerimi določimo imunofenotip reaktivnih in malignih limfatičnih celic. Najpogosteje uporabljamo imunocitokemične reakcije in imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom (3–5).

V citopatološkem laboratoriju Onkološkega inštituta v Ljubljani smo kot dodatno metodo za odkrivanje limfomskih celic v izlivih in določitev imunofenotipa

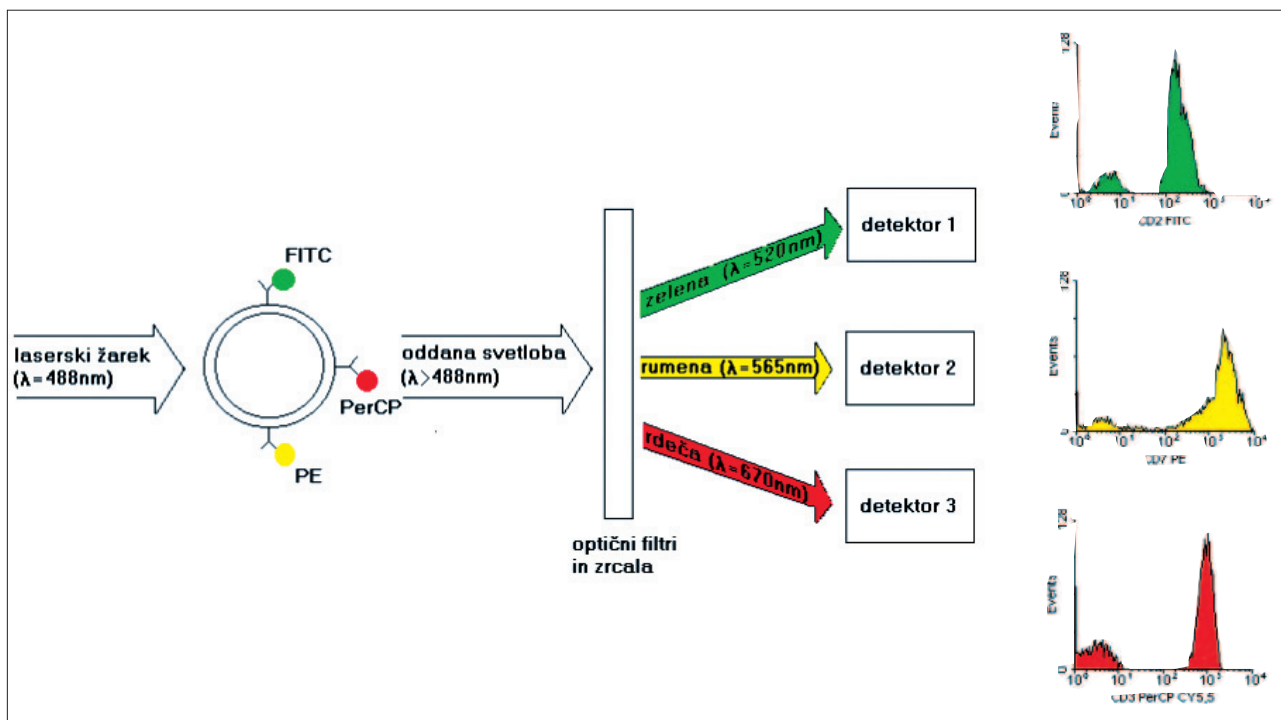
najprej uporabljali imunocitokemične reakcije. Zaradi nespecifičnih reakcij je bila preiskava pogosto nekonkluzivna. Poleg tega pa ta metoda ni bila dovolj občutljiva pri iskanju minimalnega ostanka bolezni. Minimalni ostanek bolezni je po definiciji bolezen, kjer limfomske celice v vzorcu predstavljajo manj kot 5 % vseh celic in jih le z mikroskopsko, morfološko analizo sedimenta izliva ni mogoče odkriti (6). Iskanje minimalnega ostanka bolezni je pomembno za spremljanje uspešnosti zdravljenja in njegovo načrtovanje.

Zaradi nespecifičnih imunocitokemičnih reakcij in slabe občutljivosti imunocitokemične metode smo leta 1998 v rutinski diagnostiki NHL iz izlivov začeli uporabljati imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom (Slika 1). To je zelo občutljiva, kvantitativna in hitra metoda, ki omogoča hkratno merjenje številnih bioloških lastnosti svežih ali fiksiranih celic. Pretočni citometri so zasnovani tako, da z merjenjem sipane in fluorescentne svetlobe preučujemo fizikalne (velikost, granularnost) in antigenske lastnosti celic (Slika 2). Antigenske lastnosti preučujemo s kombinacijo različnih s fluorokromi označenih protiteles, ki nam dajo največ podatkov o imunofenotipu limfomskih celic (B-celični panel: CD45, CD19, CD20, CD10, CD5, CD23, FMC7, lahke verige T-celični panel: CD45, CD3, CD2, CD7, CD5, CD4, CD8, CD(56 + 16)).

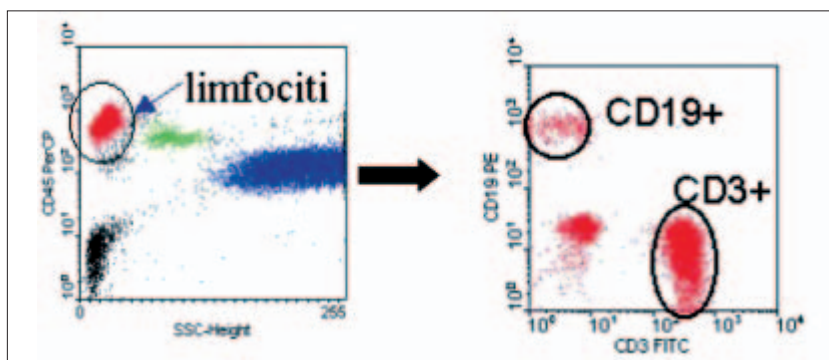
Pomembna možnost pretočnicometrične analize je zamejevanje celičnih populacij (»gating«), ki omogoča



**Slika 1.** Določanje površinskih lahkih verig kapa in lambda v izlivu z imunocitokemičnimi reakcijami in tri-parameterno imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. Z imunocitokemičnimi reakcijami klonalnosti B celic nismo uspeli dokazati, saj so bile zaradi nespecifičnega barvanja limfomske celice pozitivne na obe lahki verigi. Z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom smo dokazali, da so B celice monoklonalne, kapa pozitivne.



**Slika 2.** Shematski prikaz tri-parametrne analize antigenih lastnosti celic s pretočnim citometrom. Celice v vzorcu označimo s protitelesi, ki so označena s fluorokromi (FITC, PE, PerCP). Ko celica potuje skozi laserski žarek, se fluorokromi vzburi in fluorescirajo. Z optičnimi zrcali in filtri se oddana svetloba razdeli na svetlobo različnih valovnih dolžin (zelena, rumena, rdeča). To svetlobo zaznajo detektorji svetlobnih signalov. S procesiranjem signalov in računalniško obdelavo podatkov dobimo rezultate meritev, ki so v našem primeru prikazani s tremi histogrami. Z eno meritvijo s pretočnim citometrom smo hkrati prikazali prisotnost treh celičnih antigenov (CD5, CD7 in CD3) po principu: ena celica-trije antigeni-trije signali.



**Slika 3.** Zamejevanje celičnih populacij (»gating«) omogoča analizo fizikalnih in antigenih lastnosti skupine celic v heterogeni celični suspenziji. Levi citogram prikazuje, kako lahko na osnovi granularnosti celic in ekspresije CD45 antigena (skupni levkocitni antigen) v heterogeni celični suspenziji opredelimo več različnih celičnih populacij: limfocite (rdeči), monocite (zeleni) in granulocite (modri). Z zamejevanjem celičnih populacij lahko proučujemo antigenske lastnosti samo ene populacije npr. limfocitov. Desni citogram prikazuje, da ima del limfocitov na celični membrini prisoten CD19 antigen (B limfociti) del pa CD3 antigen (T limfociti).

analizo fizikalnih in antigenih lastnosti skupine celic v heterogeni celični suspenziji (Slika 3). Tako lahko selektivno analiziramo sumljive celične populacije, tudi kadar predstavljajo le manjši delež celic v heterogeni celični suspenziji. S selektivnim zamejevanjem celičnih populacij (»gating«) na podlagi kombinirane antigeneske ekspresije in sipanja svetlobe B-celic lahko na primer v vzorcu odkrijemo

monoklono celično populacijo, ki predstavlja manj kot 1 % vseh celic v vzorcu. Občutljivost metode lahko primerjamo z občutljivostjo molekularnih tehnik (PCR ali Southern blot), ki jih uporabljamo za iskanje monoklonalnosti B-celic v vzorcih biopsij bezgavk (7).

Od leta 1998 do 2001 smo napravili imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom v vzorcih 56 izlivov pri 44 bolnikih. Indicirali smo jo, kadar smo z mikroskopsko, morfološko analizo razmaza sedimenta izliva našli številne limfatične celice ali kadar je imel bolnik že znano diagnozo NHL. V pilotnem poskusu smo ugotovili, da je najbolj občutljivejša in najnatančnejša triparametrna imunofenotipizacija, da največ podatkov o imunofenotipu limfomskih celic dobimo z uporabo specifične kombinacije protiteles ter z

analizo fizikalnih (velikost, granularnost) in antigenih lastnosti celičnih populacij. Končna citopatološka diagnoza NHL v izlivih vedno temelji na kombinaciji rezultatov morfološke, mikroskopske analize celic v preparatih, barvanih po Giemsi, in imunofenotipskih študij.

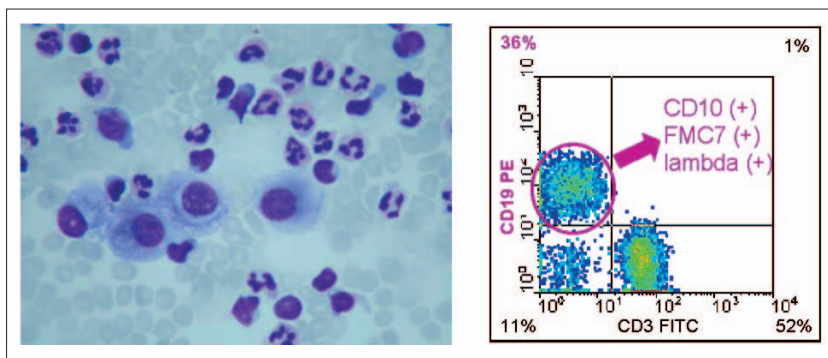
Kombinacija morfološke analize vzorca in imunofenotipizacije s pretočnim citometrom je zelo

občutljiva in natančna. Pri triparametrsni imunofenotipizaciji sta bili občutljivost in natančnost metode 1,0. To pomeni, da je bila diagnoza v vseh primerih pravilno negativna ali pozitivna. Ta metoda je najobčutljivejša tudi pri iskanju minimalnega ostanka bolezni.

Tako z morfološko analizo vzorca kot tudi z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom je včasih zelo težko najti redke limfomske celice in jih ločiti od drugih celic v vzorcu (Slika 4). Z našo retrogradno analizo smo

Uporabljati moramo tri- ali štiriparametrsno imunofenotipizacijo z analizo celičnih populacij na podlagi fizikalnih lastnosti celic in prisotnosti antigena CD 19. Tako preprečimo lažno negativne diagnoze, kadar so limfomske celice pomešane s številnimi reaktivnimi limfatičnimi in drugimi celicami.

Pri bolniku z NHL in izlivom je treba za boljše spremljanje uspehov zdravljenja narediti imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom pred začetkom in po končanem zdravljenju, če je izliv še prisoten.



**Slika 4.** Razmaz sedimenta izliva (Giemsa, 40X) in rezultati imunofenotipizacije s pretočnim citometrom pri bolniku, ki se je zdravil zaradi NHL. Z mikroskopsko, morfološko analizo vzorca sedimenta izliva nismo našli jasnih limfomskih celic, pač pa številne reaktivne mezotelne celice, nevtrofilne granulocite in zrele limfocite podobne limfatične celice. Z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom smo ugotovili, da je 36% limfatičnih celic malignih (imunofenotip tumorskih celic: CD19+, CD10+, FMC7+, lambda+).

ugotovili, da je med limfomskimi celicami v sedimentu izlivov, ki nastanejo zaradi B-celičnih limfomov v povprečju le 44 % celic malignih (razpon: 1–94 %), drugo pa so reaktivni T-limfociti. V štirih primerih pa je bilo v izlivu manj kot 5 % celic NHL. Zato je za iskanje minimalnega ostanka bolezni, ki pomembno vpliva na nadaljnje načrtovanje zdravljenja, nujno uporabljati čim občutljivejšo metodo.

## Zaključek

Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom je v diagnostiki NHL izlivov indicirana vedno, kadar imamo podatek, da se je bolnik zdravil ali se še zdravi zaradi NHL, ali kadar smo z morfološko analizo v sedimentu izliva odkrili številne ali atipične limfatične celice.

## Literatura

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organisation classification of tumours: Pathology and Genetics of tumours of haemtopoietic and lymphoid tissue. Lyon: IARC Press, 2001.
2. Storey DD, Dines DE, Coles DT. Pleural effusions: A diagnostic dilemma. *Jama* 1976; 236: 2183–6.
3. Katz RL, Raval P, Manning JT, McLaughlin P, Barlogie B. A morphologic, immunologic and cytometric approach to the classification of non-Hodgkin's lymphoma in effusions. *Diagn Cytopathol* 1987; 3: 91–101.
4. Moriarty AT, Wiersema L, Synder W, Kolyto PK, McCloskey DW. Immunophenotyping of cytologic specimens by flow cytometry. *Diagn Cytopathol* 1993; 9: 252–8.
5. Dunphy CH. Combined cytomorphologic and immunophenotypic approach to evaluation of effusions for lymphomatous involvement. *Diagn Cytopathol* 1996; 15: 427–30.
6. Ormerod MG. Flow cytometry. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1999.
7. Lechman CM, Sarago C, Nasim S, et al. Comparison of PCR with Southern hybridisation for the routine detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 171–6.