

Citopatološka preiskava in citometrična imunofenotipizacija v diferencialni diagnozi limfoidnih proliferacij

Veronika Kloboves Prevodnik

Zaradi velike morfološke in biološke variabilnosti reaktivnih in neoplastičnih procesov v bezgavkah je diagnoza teh bolezni zahtevna in težavna. Za opredelitev limfomov pred začetkom zdravljenja uporabljamo večinoma histopatološko preiskavo. Citopatološko preiskavo indiciramo predvsem za usmerjanje kirurške biopsije, opredelitev tumorskega stadija, potrditev ponovitve limfoma ali transformacijo drobnoceličnega limfoma v velikocelični limfom (1).

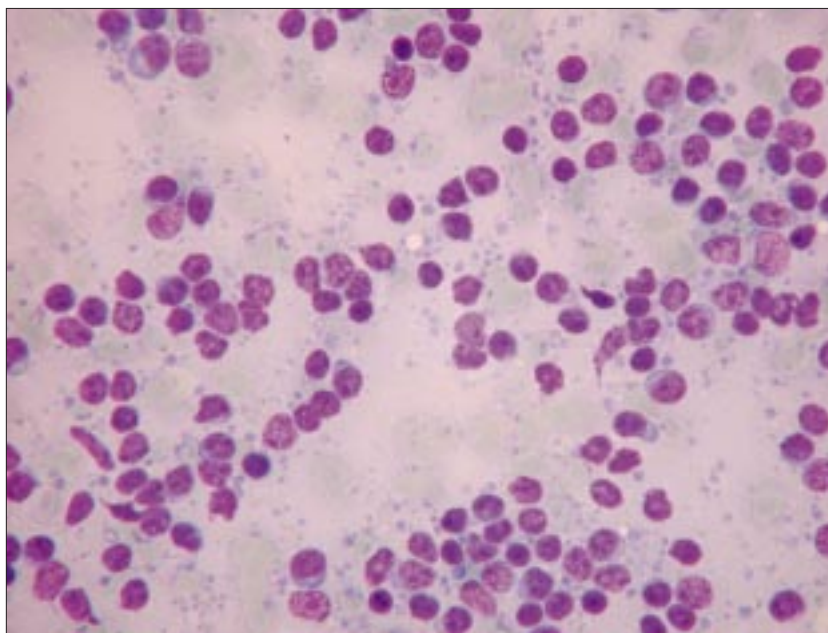
Kljub temu da citopatološka preiskava zaenkrat še ni sprejeta kot neodvisna diagnostična metoda, ima v primarni diagnostiki limfomov pomembno mesto. V primerjavi s histopatološko preiskavo, ki zahteva kirurško odstranitev bezgavke, je aspiracijska biopsija s tanko iglo neinvazivna, hitra in bolnikom prijazna metoda. S citopatološko preiskavo enostavno in hitro izberemo tiste bolnike z limfadenopatijo, pri katerih je indicirana kirurška biopsija. Pri bolnikih s številnimi povečanimi bezgavkami določimo hkrati najbolj primerno bezgavko za kirurško biopsijo. S tem močno zmanjšamo število nepotrebnih biopsij in skrajšamo diagnostični postopek. Po naših izkušnjah in izkušnjah drugih citopatologov lahko s citopatološko preiskavo postavimo zanesljivo diagnozo malignega limfoma, diferenciramo med B-celičnimi in T-celičnimi limfomi ter drobnoceličnimi in velikoceličnimi limfomi. Če je kirurška biopsija za bolnike, ki so v slabi fizični kondiciji, preveč obremenjujoča ali pa je celo kontraindicirana, jih lahko začnemo zdraviti le na osnovi citopatološke preiskave.

S konvencionalno mikroskopsko analizo citoloških in histoloških vzorcev bezgavk velikokrat ne moremo ločiti med reaktivnimi in neoplastičnimi procesi (slika 1), še težje pa zanesljivo opredelimo vrsto limfoma (2). Zato je za diagnozo Nehodgkinovih limfomov v sodobnem histopatološkem in citopatološkem diagnostičnem postopku nujna uporaba dodatnih metod. V najnovejši WHO histološki klasifikaciji limfomov je posebej poudarjeno, da je za opredelitev tipa limfoma poleg kliničnih, morfoloških, molekularnih in citogenetskih kriterijev izjemnega pomena imunofenotip limfomskih celic (3-6). Imunofenotip limfomskih celic

se v histopatologiji in citopatologiji najpogosteje določi z imunocitokemično metodo. Ker so limfomski antigeni zelo občutljivi in se med fiksacijo vzorcev pogosto uničijo, z imunocitokemično metodo vedno ni možno povsem opredeliti imunofenotipa limfomskih celic (7). Zato v citopatološko diagnostiko limfomov zadnje čase uvajamo imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, ker za pretočno citometrično analizo fiksacija vzorcev ni potrebna (8,9).

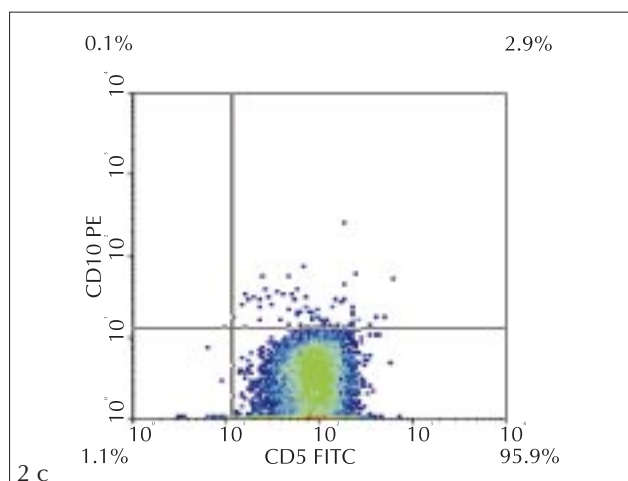
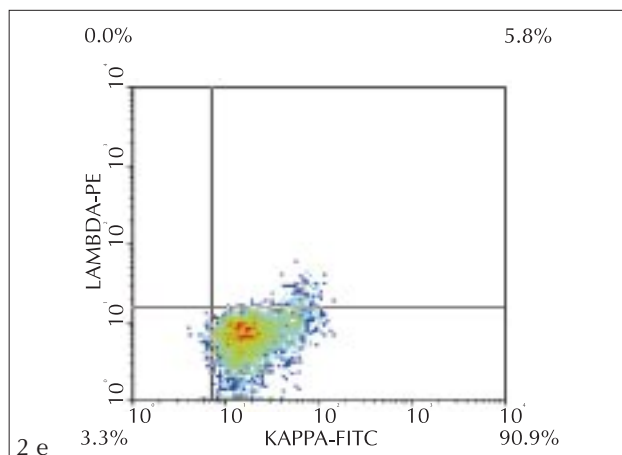
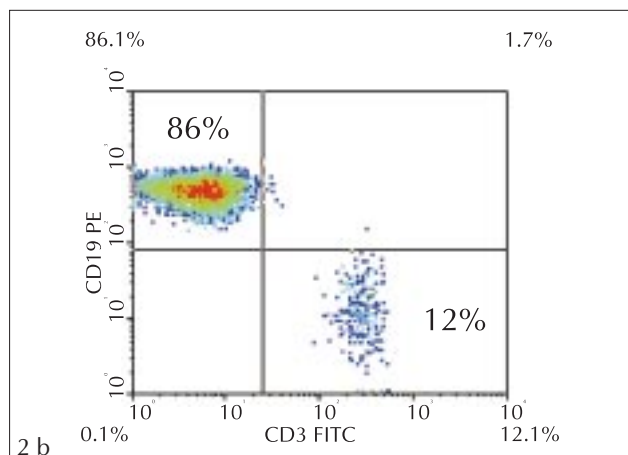
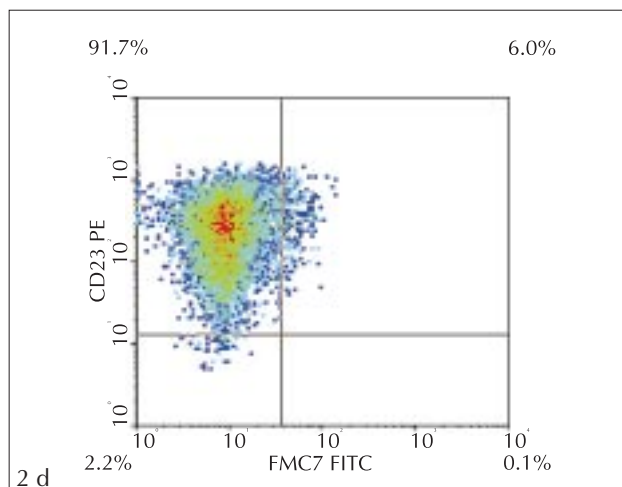
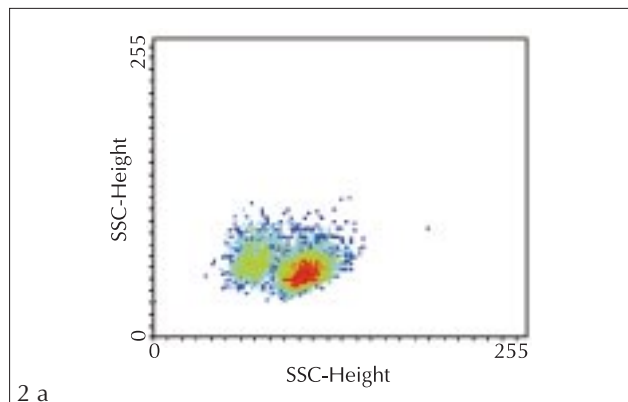
Prednost citometrične imunofenotipizacije je tudi v tem, da na eni celici lahko merimo več diagnostičnih ali prognostičnih parametrov hkrati. Pri citometričnih meritvah opredelimo celično populacijo in določimo njen imunofenotip z merjenjem sipane svetlobe in fluorescence, ki jo je oddal preiskovani vzorec (10).

Levkemije in limfomi imajo značilne morfološke in antigenske značilnosti. Po njih jih razdelimo v histopatološke skupine, ki so pomembne za potek bolezni, za izbor in oceno ustreznega načina zdravljenja. Pomen imunofenotipa tumorskih celic za diagnozo, prognozo in za spremljanje uspeha zdravljenja je prikazan na primeru kronične limfocitne levkemije (KLL). Tumorske celice KLL imajo značilen imunofenotip: CD19 (+), CD20



Slika 1. Mikroskopska slika aspirata bezgavke pri bolniku z limfocitozo in s povečanimi perifernimi bezgavkami (barvanje Giemsa, 40-kratna povečava).

(+), CD5 (+), CD23 (+), FMC7 (-), površinske lahke verige (šibko +) (slika 2).



Slika 2. Rezultati imunofenotipizacije s pretočnim citometrom pri istem bolniku. Npraviili smo aspiracijsko biopsijo s tanko iglo ene od povečanih bezgavk. Aspirirane celice smo označili s fluorescentnimi protitelesi. S pretočnim citometrom smo merili sipanje svetlobe in fluorescenco. Rezultate merjenja sipanja svetlobe prikazuje slika 2A. Citogram sipanja svetlobe naprej in vstran nam pokaže, da so v vzorcu celice, ki so po velikosti in granularnosti podobne zrelim limfocitom. 86% teh celic je B-fenotipa (CD19+), 12% pa je T-limfocitov (CD3+) (slika 2B). Celice B so CD5 + (slika 2C), CD23 + in FMC7 - (slika 2D) ter šibko kappa + (slika 2E). Na podlagi imunofenotipizacije s pretočnim citometrom lahko zaključimo, da so v vzorcu aspirata bezgavke tumorske celice KLL.

Pri bolnikih s sumom na limfom iščemo s citometrično imunofenotipizacijo tumorske celice v vzorcih periferne krvi, kostnega mozga, bezgavk, vranice in telesnih tekočin (plevralni ali abdominalni eksudat). Če najdemo tumorske celice z značilnim imunofenotipom za KLL, lahko postavimo zanesljivo diagnozo KLL.

Prognozo in potek bolezni pri bolnikih s KLL opredelimo s pomočjo napovednih dejavnikov. Eden od teh je membranski antigen CD38, ki je povezan s slabo prognozo. Najdemo ga na tumorskih celicah le pri nekaterih bolnikih s KLL. Ekspresijo CD38 lahko zanesljivo določimo s citometrično imunofenotipizacijo.

Tudi uspeh zdravljenja ali ponovitev KLL lahko zanesljivo opredelimo s citometrično imunofenotipizacijo. V kolikor se je bolnik že zdravil za KLL, lahko s kombinacijo ustreznih protiteles proti značilnim antigenom KLL (npr. anti-CD19, anti-CD5, anti-CD23) (11) zanesljivo določimo prisotnost tumorskih celic. S citometrično imunofenotipizacijo lahko zaznamo tudi manj kot 5% malignih celic v vzorcu.

V citopatološki diagnostiki reaktivnih in neoplastičnih obolenj bezgavk smo na Onkološkem inštitutu v Ljubljani začeli uporabljati citometrično imunofenotipizacijo konec leta 1998. Postavili smo metodologijo za citometrično imunofenotipizacijo celičnih in tkivnih vzorcev bezgavk, vranice, kostnega mozga in telesnih tekočin (plevralni, perikardialni in abdominalni eksudat, likvor, periferna kri). S citometrično imunofenotipizacijo določimo imunofenotip limfomskih celic v 1 – 2 urah. Pri bolnikih, ki so življenjsko ogroženi, je diagnostični postopek z odvzgom vzorca, barvanjem in pregledom končan v 2 - 4 urah, kar omogoča takojšen začetek zdravljenja. Z uporabo citometrične imunofenotipizacije smo izboljšali zanesljivost in specifičnost citopatološke diagnoze limfoproliferativnih bolezni. Kakšna bo vloga citopatološke preiskave in citometrične imunofenotipizacije v primarni diagnostiki limfomov, še ni jasno. Ena vodilnih hematopatologinj, Nancy Lee Harris, meni, da bi citopatološka preiskava, podprta z uporabo dodatnih sodobnih metod, lahko postala neodvisna diagnostična metoda v primarni diagnostiki limfomov (12).

2. Frable WJ, Kardos TF. Fine Needle Aspiration Biopsy. Applications in the Diagnosis of Lymphoproliferative Diseases. *Am J Surg Pathol* 1988; 12 (Suppl 1): 62-72.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA: A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84 (5): 1361-92.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. WHO classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-49.
5. Jaffe ES. World Health Organisation classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissue. A progress report. *Am J Clin Pathol* 1999; 111 (Suppl.1): S8-12.
6. Jančar J. Progress in the classification of myeloid and lymphoid neoplasms. From REAL to WHO concept. *Adv Clin Path* 2000; 4: 59-76.
7. Norton AJ. Diagnostic immunohistochemistry update. 10th meeting of European association for haematopathology, London 2000. Abstracts, 0-29.
8. Robins DB, Katz RL, Swan F Jr, Atkinson EN, Ordonez NG, Huh YO. Immunotyping of lymphoma by fine-needle aspiration. A comparative study of cytopsin preparations and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(5): 569-76.
9. Liu K, Stern RC, Rogers RT, Dodd LG, Mann KP. Diagnosis of haematopoietic processes by fine-needle aspiration in conjunction with flow cytometry: A review of 127 cases. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 1-10.
10. Ormerod MG. Flow cytometry. Oxford University Press, London 2000.
11. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker JW, Picker L, Stetler-Stevenson M. U.S.-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Data Analysis and Interpretation. *Cytometry* 1997; 30: 236-44.
12. Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB. Fine-Needle Aspiration Biopsy in the Diagnosis and Classification of Primary and Recurrent Lymphoma: A Retrospective Analysis of the Utility of Cytomorphology and Flow Cytometry. *Mod Pathol* 2001, 14 : 4472-81.

Literatura:

1. Gascoyne RD. Establishing the diagnosis of lymphoma: from initial biopsy to clinical staging. *Oncology* 1998; 12 (10 (Suppl 8)): 11-6.