

# Diagnostyka i monitorowanie leczenia białaczek - w świetle najnowszych metod laboratoryjnych

**Białaczki stanowią heterogenną grupę nowotworów układu krwiotwórczego. Są one spowodowane nieprawidłowym, klonalnym rozrostem komórek krwi wywodzących się z różnych linii komórkowych i o różnym stopniu dojrzałości. Choroby nowotworowe krwi najczęściej wykrywa się przypadkowo u chorych, którzy mieli zleczone wykonanie badań laboratoryjnych z innych powodów. W diagnostyce białaczek bardzo istotne jest ustalenie z jakiej linii komórkowej wywodzi się nowotwór, jaka jest dojrzałość nieprawidłowych komórek oraz określenie ich cech morfologicznych, immunofenotypowych i charakterystycznych mutacji genowych.**

Stosowanie nowych technik diagnostycznych umożliwia szybkie rozpoznanie typu choroby, prognozowanie, określenie czynników ryzyka, wybór optymalnego leczenia oraz monitorowanie efektów leczenia.

Aktualnie stosowane metody diagnostyczne w hematologii opierają się na:

- cytomorfologii uzupełnionej cytochemią i badaniami histologicznymi
- immunofenotypowaniu
- cytogenetyce wraz metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH)
- metodach biologii molekularnej, począwszy od amplifikacji specyficznych sekwencji DNA do mikromacierzy jednonukleotydowych polimorfizmów DNA [1].

## **Badania morfologiczne**

Morfologia krwi obwodowej jest badaniem przesiewowym wykonywanym rutynowo u chorych z podejrzeniem chorób hematologicznych. W przypadku otrzymania wyników odbiegających istotnie od normy poddaje się ocenie mikroskopowej rozmaz krwi obwodowej a także rozmaz szpiku. Aby stwierdzić, czy występują nieprawidłowości w hematopoezie, ocenia się odsetek komórek poszczególnych linii hematopoezy z uwzględnieniem ich faz rozwoju oraz obecność patologicznych komórek pochodzenia szpikowego i pozaszpikowego. Badanie histopatologiczne bloczka kostnego pobranego metodą trepanobiopsji pozwala na ocenę komórkowości szpiku, jego architektoniki oraz naciekania przez komórki patologiczne [4]. Aktualnie mikroskop nie jest uważany za wystandaryzowane narzędzie diagnostyczne, ze względu na różne techniki przygotowywania rozmazów oraz subiektywną ocenę stosunkowo niewielkiej liczby komórek [3].

*Pomimo znacznego rozwoju metod analitycznych, ocena mikroskopowa rozmazów jest nadal powszechnie stosowana w celu ukierunkowania dalszej diagnostyki.*

## **Badania cytochemiczne**

Badania cytochemiczne do tej pory dostarczały wielu informacji pozwalających ukierunkować dalszy proces diagnostyczny. Metody te wykorzystują fakt, że w różnych liniach komórkowych oraz na poszczególnych etapach dojrzewania komórek krwi występuje różna aktywność enzymów, obecność lub brak swoistych ziarnistości, zróżnicowana zawartość lipidów lub ilości glikogenu.

Intensywny rozwój diagnostyki immunologicznej i biomolekularnej spowodował, że badania cytochemiczne, charakteryzujące się mniejszą czułością i swoistością, aktualnie tracą na znaczeniu [4].

## **Badania metodą cytometrii przepływowej**

Cytometria przepływowa jest metodą, która umożliwia wczesną diagnostykę białaczek, poprzez oznaczenie różnych populacji komórek na podstawie ich cech morfologicznych oraz badania fenotypu. Jest bardzo czułą techniką badawczą, gdyż analizowane są pojedyncze komórki w populacji składającej się z kilku

tysięcy obiektów [5].

*Dzięki możliwości szybkiej analizy wielu antygenów zmienionej nowotworowo komórki, wieloparametrowa cytometria stała się podstawą diagnostyki hematologicznej.*

Głównym celem przeprowadzania badań metodą cytometrii przepływowej u chorych na białaczki jest:

- określenie fenotypu komórek białaczkowych
- ustalenie typu lub podtypu immunologicznego w celu klasyfikacji choroby i podania choremu leczenia celowanego
- wyszukiwanie fenotypów aberrantnych, czyli charakterystycznych dla danego typu białaczki lub samego chorego
- monitorowanie leczenia, obejmujące badanie choroby resztkowej na podstawie fenotypu aberrantnego, oznaczonego podczas diagnostyki [4].

Najnowsze badania, mające na celu rozwój metod cytometrycznych, dążą do zwiększenia czułości metody, rozszerzenia paneli diagnostycznych, ograniczenia czasu przygotowania materiału do badań oraz uproszczenia analizy wyników. W tym celu prowadzi się prace dążące do utworzenia w szczelnie zamkniętych probówkach odpowiednio zmieszanych kombinacji „gotowych do użycia” przeciwciał. W jednej próbce pomiarowej mogą się znajdować przeciwciała sprzężone z 8 - 10 fluorochromami, które stanowią podstawowy panel diagnostyczny lub panele umożliwiające diagnostykę określonych typów białaczek. Równocześnie prowadzi się prace umożliwiające zastosowanie materiału badawczego bez wcześniejszego przygotowania (lizenzy erytrocytów oraz przemywania), co może ograniczać wpływ czynników zewnętrznych na jakość próbki oraz zminimalizować straty komórek [3].

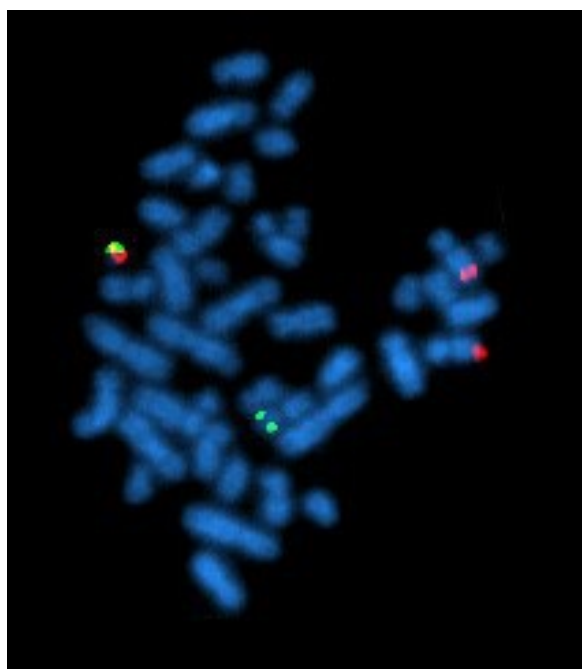
### **Badania cytogenetyczne**

Badania cytogenetyczne wraz z metodą FISH są wykonywane na poziomie pojedynczej komórki. Obejmują one analizę kariotypu, nieprawidłowości w strukturze chromosomów a także umożliwiają wykrycie aberracji obejmujących fragmenty chromosomów. Badania te pozwalają również na ocenę lokalizacji poszczególnych genów lub fragmentów DNA, ocenę liczby kopii genów i występujących rearanżacji genowych [3]. W przeciwieństwie do metody cytometrycznej, czułość w badaniach cytogenetycznych jest niska, ze względu na

stosunkowo małą liczbę analizowanych komórek [4].

Analiza kariotypu odgrywa bardzo ważną rolę w:

- ustaleniu lub uściśleniu rozpoznania określonego wcześniej na podstawie badań immunofenotypowych
- klasyfikacji białaczek i ich zróżnicowaniu np. pomiędzy przewlekłą białaczką szpikową z chromosomem Ph<sup>+</sup> a innymi nowotworami mieloproliferacyjnymi Ph<sup>-</sup>
- ocenie rokowania np. translokacje t(8;21) i t(15;17) rozpoznane w ostrej białaczce szpikowej rokują korzystniej niż prawidłowy kariotyp komórek nowotworowych, natomiast delecje długich ramion chromosomów 5 i 7 - niekorzystnie
- wyborze odpowiedniej metody leczenia, gdyż w większości białaczek korzystnie rokujące aberracje pozwalają na zastosowanie leczenia standardowego, a niekorzystnie rokujące na konieczność przeszczepienia szpiku
- monitorowaniu leczenia poprzez określenie remisji choroby w badaniu FISH
- ocenie ewolucji kariotypu, gdyż pojawienie się nowych aberracji chromosomowych, wtórnych do pierwotnej zmiany genetycznej jest niekorzystną zmianą i może świadczyć o progresji choroby [4].



**Ryc.1.** Badanie FISH obrazujące translokację t(9;22)(q34;q11) i powstanie genu fuzyjnego bcr/abl w przewlekłej białaczce szpikowej.

*Źródło Wikimedia Commons, autor  
Pmx, licencja CC BY-SA 3.0*

*Badania cytogenetyczne są jednym z głównych laboratoryjnych narzędzi stosowanych w międzynarodowych standardach postępowania diagnostyczno-terapeutycznego.*

O istotności badań cytogenetycznych świadczy między innymi system klasyfikacji nowotworów hematologicznych WHO, który opiera się na zmianach genetycznych charakterystycznych dla białaczek i chłoniaków [4].

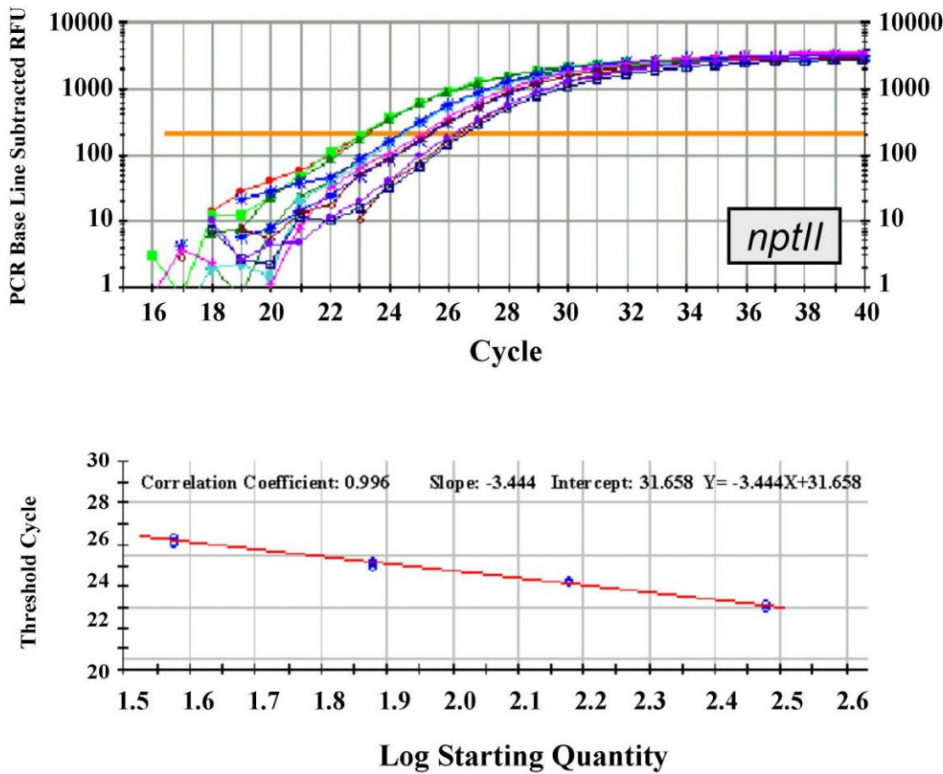
Rozwój badań cytogenetycznych zamierza w kierunku zwiększenia czułości poprzez analizę większej liczby komórek będących w metafazie lub interfazie oraz wykrycia nowych zmian genetycznych, które będą istotne w leczeniu [3].

### **Badania biomolekularne**

Badania biomolekularne charakteryzują się wysoką czułością i swoistością, przez co są ważnym narzędziem diagnostyki różnicowej oraz monitorowania leczenia nowotworów. W diagnostyce hematologicznej wykorzystuje się reakcje PCR, RT-PCR, real-time PCR, nested PCR, sekwencjonowanie DNA, hybrydyzacje kwasów nukleinowych oraz mikromacierze DNA [6].

Badania metodami biologii molekularnej są przeprowadzane w celu:

- potwierdzenia nowotworowego charakteru proliferujących komórek
- rozpoznania choroby niemożliwej do wykrycia przy pomocy innych metod - cytomorfologicznych, cytometrycznych
- potwierdzenia rearanżacji/aberracji chromosomowych wykrytych w badaniach cytogenetycznych
- oceny skuteczności leczenia za pomocą swoistych starterów PCR, o sekwencji komplementarnej do zmienionego genu
- określenie rokowania na podstawie wykrytych mutacji genowych, istotnych dla ustalenia celowanego leczenia [6].



**Ryc.2.** Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, real-time PCR umożliwia oznaczenie ilościowe kopii badanego fragmentu genu. Źródło Wikimedia Commons, autor Provero G et al., licencja CC-BY-2.0

Obecnie badania biomolekularne wykorzystuje się do wykrywania mutacji genów zaangażowanych w proliferację komórkową lub odpowiedzialnych za dojrzewanie komórek, genów fuzyjnych będących wynikiem translokacji lub delecji (np. BCR-ABL, PML-RAR $\alpha$ ), mutacji punktowych powodujących brak wrażliwości na określone leki celowane albo odpowiedzialnych za aktywację kinaz tyrozynowych [4].

*Rozwój metod biomolekularnych zmierza w kierunku automatyzacji procesów izolacji DNA, sekwencjonowania, amplifikacji i analizy danych, co pozwoli na skrócenia czasu wykonania badania.*

Najnowsze metody biomolekularne dążą do eliminacji artefaktów pomiarowych, dyskryminacji pomiędzy mutacjami znanymi i nieznanymi, odróżnienia polimorfizmów genetycznych od mutacji i oceny funkcjonalnych konsekwencji wykrytych mutacji. Aktualnie w biologii molekularnej opracowywane są panele diagnostyczne mogące określić architekturę genetyczną każdej białaczki, co

będzie pomocne w śledzeniu skuteczności leczenia każdego pacjenta [3].

**Najnowsze metody diagnostyki laboratoryjnej białaczek obejmują ocenę procentowego udziału oraz immunofenotypu nieprawidłowych komórek a także wykrycie mutacji odpowiedzialnych za zmiany nowotworowe. Obserwując postęp, jaki dokonał się w ciągu kilku ostatnich lat w metodach biologii molekularnej nasuwa się pytanie, czy wszystkie stosowane do tej pory metody będą w przyszłości zastąpione przez sekwencjonowanie i analizę nukleotydów A, T, G i C? W chwili obecnej diagnostyka laboratoryjna w hematologii podąża w kierunku większej specjalizacji i automatyzacji badań, zwiększenia czułości analiz oraz przedstawienia wyników w sposób umożliwiający lepsze prognozowanie, rozwój terapii celowanych i monitorowanie leczenia pacjentów.**

Piśmiennictwo:

1. Jędrzejczak W. i wsp. [Praktyka hematologiczna](#). Termedia Wyd. Med. Poznań 2015.
2. Kyrzcz-Krzemień S. i wsp. [Podstawy hematologii](#). Wyd: Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Katowice 2010.
3. Bene MC. et al. [Leukemia diagnosis: today and tomorrow](#). Eur J Haematol 2015; 95 (4): 365-73.
4. Dmoszyńska A. i wsp. [Wielka interna - hematologia](#). Medical Tribune Polska. Warszawa 2011.
5. Sędek Ł. i wsp. [Techniczne aspekty cytometrii przepływowej](#). Diagn. Lab. 2010; 46 (4): 415-420.
6. Soverini S. et al. [Present and future of molecular monitoring in chronic myeloid leukaemia](#). Br J Haematol, 7 Mar 2016.

Data publikacji: 14.12.2016r.