



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.8.4.010>
УДК 616.155. 392-053.2-078(476.2)



Ярец Ю.И.^{1,2}, Пугачева Ж.Н.¹, Сачилович Д.С.¹, Ромашевская И.П.^{1,2}, Ходулева С.А.²,
Демиденко А.Н.¹, Мицура Е.Ф.¹

¹ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека, Гомель, Беларусь

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Иммунофенотипическая характеристика острого лейкоза у детей Гомельской области

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование – Ярец Ю.И.; сбор материала, обработка, написание текста – Пугачева Ж.Н.; сбор материала, обработка, написание текста – Сачилович Д.С.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Ромашевская И.П.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Ходулева С.А.; сбор материала, обработка, написание текста – Демиденко А.Н.; сбор материала, обработка, написание текста – Мицура Е.Ф.

Подана: 15.08.2022

Принята: 25.10.2022

Контакты: artytut@mail.ru, gemd@mail.ru

Резюме

Острый лейкоз (ОЛ) является самой распространенной опухолью кроветворной ткани в детском возрасте. Исследование иммунофенотипа бластных клеток позволяет не только определить линейную принадлежность опухолевых клеток и выявить иммунологический вариант ОЛ, но и мониторировать результаты терапии, подтверждать рецидивы. Современная иммунологическая классификация предполагает использование стандартизированной панели моноклональных антител, что позволяет определить происхождение бластных клеток более чем в 98% случаев ОЛ. **Цель.** Оценить иммунологический фенотип острого лейкоза у детей в Гомельской области.

Материалы и методы. Использованы образцы костного мозга 57 пациентов. Исследование выполнялось на проточном цитофлюориметре FACS Canto II. Для определения линейной принадлежности опухолевых клеток использовалась скрининговая панель моноклональных антител. В последующем выполнялась постановка диагностической панели.

Результаты. Диагноз ОЛ был установлен у 57 пациентов (35 мальчиков и 22 девочки). Частота ОЛЛ составила 89% (n=51), ОМЛ – 11% (n=6). Большинство ОЛЛ были представлены В-клеточными вариантами (92%, n=47), Т-клеточные варианты встречались в 8% случаев (n=4). Случаи В-ОЛЛ включали: ВI – 1 (2%), ВII – 41 (88%), ВIII – 4 (8%), ВIV – 1 (2%, n=1). В группе В-ОЛЛ aberrантность выявлена у 22 пациентов (47%) и включала коэкспрессию CD123, CD13, CD25, CD33, CD65, суМРO, NG2. Для ОМЛ aberrантность характеризовалась экспрессией CD2, CD7, CD4, NG2, CD25. Среди 4 случаев Т-ОЛЛ aberrантность установлена у 3 пациентов в виде экспрессии CD10, CD33.

Заключение. Полученные данные о частоте встречаемости ОМЛ и ОЛЛ у детей в Гомельской области совпадают с данными литературы. Частота встречаемости ОЛ у детей до 5 лет выше, чем в других возрастных группах, при этом среди вариантов ОЛ

чаще встречается ВII-ОЛЛ. В значительной части случаев В-ОЛЛ опухоль имеет аберрантный фенотип с коэкспрессией маркеров других клеточных линий.

Ключевые слова: дети, острый лейкоз, иммунофенотипирование, проточная цитометрия

Yarets Y.^{1,2}, Pugacheva J.¹, Sachilovych D.¹, Romashevskaya I.^{1,2}, Choduleva S.², Demidenko A.¹, Mitsura E.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Immunophenotypic Characteristics of Acute Leukemia in Children of the Gomel Region

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design, editing – Yarets Y.; material collection, processing, text writing – Pugacheva J.; material collection, processing, text writing – Sachilovych D.; research concept and design, editing – Romashevskaya I.; research concept and design, editing – Choduleva S.; material collection, processing, writing text – Demidenko A.; collecting material, processing, writing text – Mitsura E.

Submitted: 15.08.2022

Accepted: 25.10.2022

Contacts: artyut@mail.ru, gemd@mail.ru

Abstract

Acute leukemia (AL) is the most common hematopoietic tissue tumor in childhood. The study of the immunophenotype of blast cells allows not only to determine the linear affiliation of tumor cells and identify the immunological variant of AL, but also to monitor the results of therapy, confirm relapses. Modern immunological classification involves the use of a standardized panel of monoclonal antibodies, which makes it possible to determine the origin of blast cells in more than 98% of AL cases.

Purpose. To evaluate the immunological phenotype of acute leukemia in children in the Gomel region.

Materials and methods. Bone marrow samples from 57 patients were used. The study was performed on a FACS Canto II flow cytometer. To determine the linearity of tumor cells, a screening panel of monoclonal antibodies was used. Subsequently, the diagnostic panel was installed.

Results. AL was diagnosed in 57 patients (35 boys and 22 girls). The frequency of ALL was 89% (n=51), AML – 11% (n=6). The majority of ALL were represented by B-cell variants (92%, n=47), T-cell variants occurred in 8% of cases (n=4). B-ALL cases included: BI – 1 (2%), BII – 41 (88%), BIII – 4 (8%), BIV – 1 (2%, n=1). In the B-ALL group, aberrations were detected in 22 patients (47%) and included co-expression of CD123, CD13, CD25, CD33, CD65, cyMPO, NG2. For AML, aberration was characterized by the expression of CD2, CD7, CD4, NG2, CD25. Among 4 cases of T-ALL, aberration was found in 3 patients in the form of expression of CD10, CD33.

Conclusion. The obtained data on the incidence of AML and ALL in children in the Gomel region coincide with the literature data. The incidence of AL in children under 5 years of



age is higher than in other age groups, while BII-ALL is more common among AL variants. In a significant proportion of B-ALL cases, the tumor has an aberrant phenotype with co-expression of markers from other cell lines.

Keywords: children, acute leukemia, immunophenotyping, flow cytometry

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый лейкоз (ОЛ) является самой распространенной опухолью кроветворной ткани в детском возрасте и составляет более трети онкологических заболеваний у детей. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) занимает до 90% случаев ОЛ, из которых В-линейный вариант встречается у 85–90% пациентов. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) составляет около 1/5 всех ОЛ у детей. Частота ОМЛ увеличивается с возрастом ребенка, достигая максимума у взрослых.

На сегодняшний день благодаря разработке и внедрению новейших диагностических технологий, использованию современных протоколов лечения общая 5-летняя выживаемость пациентов составляет более 75% случаев [1].

Современная классификационная система ВОЗ опухолей кроветворных и лимфоидных тканей создана на основе объединенного анализа клинических, цитоморфологических, иммунофенотипических и цитогенетических данных [2]. Определение иммунологических вариантов лейкоза проводят согласно критериям European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) [3].

Иммунофенотипирование бластных клеток является определяющим моментом в диагностике ОЛ, их классификации в соответствии с линейной принадлежностью и стадией дифференцировки лейкемических клеток, а также выделении прогностически важных подтипов, выборе методов рационального лечения и его мониторинга. Учитывая присутствие большого количества иммунофенотипических маркеров на различных клетках, особое значение будет иметь оптимальный подбор лабораторной панели моноклональных антител, позволяющих точно определить линейную принадлежность, стадию дифференцировки и функциональное состояние клетки. С другой стороны, выявление специфического профиля мембранных и цитоплазматических антигенов бластных клеток миелоидного или лимфоидного происхождения дает возможность заранее предполагать наличие определенной генетической аномалии, что облегчает задачу для дальнейших генетических исследований и способствует более быстрому установлению диагноза [4].

Вышесказанное определяет актуальность настоящего исследования, которое направлено на анализ особенностей иммунофенотипа лейкозных клеток.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить иммунологический фенотип острого лейкоза у детей в Гомельской области.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 57 образцов костного мозга пациентов детского возраста (от 15 дней до 15 лет, медиана возраста 4 года), поступивших на стационарное лечение в онкогематологическое отделение для детей ГУ «Республиканский

Таблица 1
Панель скрининговых моноклональных антител и их характеристика
Table 1
Panel of screening monoclonal antibodies and their characterization

CD-маркер	Характеристика
CD45	Общий лейкоцитарный антиген. Используется при острых лейкозах для разграничения гейта бластных клеток
CD10	Общий антиген ОЛЛ. Нейтральная эндопептидаза. Присутствует на поверхности ранних лимфоидных клеток и служит для идентификации common-B лейкоза
CD19	Линейный маркер всех В-лимфоцитов. Экспрессия обнаруживается на стадии про-В-клетки и сохраняется на протяжении всей жизни В-лимфоцита
CD34	Антиген гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников
CD33	Маркер миелоидного ряда
CD117	Линейно не ограниченный маркер
CD4	Маркер Т-клеток, маркер моноцитарного ряда
CD7	Т-клеточный антиген

Таблица 2
Используемые маркеры (селективное гейтирование по CD45)
Table 2
Markers used (CD45 selective gating)

Классы маркеров	Моноклональные антитела
Цитоплазматические маркеры (позитивная экспрессия – не менее 10% клеток)	cyCD3,cyCD22,cyCD79a,cyMPO,cyIgM, cyTdT
Поверхностные мембранные маркеры (позитивная экспрессия – не менее 20% клеток)	CD2, CD3,CD5,CD7,CD10,CD19,CD20,CD11c CD11b,CD13,CD14,CD15,CD33,CD64,CD65, CD117,CD34, CD56, HLA-DR
Дополнительные маркеры для Т-линии	CD1a,CD4,CD8,TCR α/β, TCRγ/δ, CD99
Дополнительные маркеры для В-линии	Kappa chain, Lambda chain, CD24,CD22
Дополнительные маркеры для миелоидной линии	CD71, CD61, CD42b, CD235a, CD36
Дополнительные маркеры для выявления лейкоз-ассоциированного фенотипа	CD38, CD90, CD123

научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» в 2017–2021 гг. Всем пациентам был установлен диагноз ОЛ на основании морфологического исследования костного мозга.

Иммунофенотипирование выполнялось на проточном цитофлуориметре FACS Canto II, оснащенный тремя лазерами 488 нм, 633 нм, 405 нм (Becton&Dickinson, США), методом 8-цветной проточной цитометрии, анализ полученных данных проводился в приложении BD FACSDiva 6.1.3. Для первичного определения линейной принадлежности опухолевых клеток и выбора дальнейшей диагностической панели моноклональных антител использовалась предварительная скрининговая панель, разработанная в клинко-диагностической лаборатории ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» и включающая основные маркеры для дифференцировки лимфоидной и миелоидной линии: CD19, CD34, CD7, CD33, CD45, CD10, CD117, CD4 (табл. 1).

После установления с помощью скрининговой панели линии лейкозных клеток на следующем этапе использовались дополнительные панели моноклональных антител (табл. 2).



■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики полученных иммунофенотипов разных клеточных линий ОЛ представлены в табл. 3.

Диагноз ОЛ был установлен у 35 мальчиков и 22 девочек. Частота ОЛЛ составила 89% (n=51), ОМЛ – 11% (n=6). Большинство ОЛЛ были представлены В-клеточными вариантами (92%, n=47), Т-клеточные варианты встречались в 8% случаев (n=4) (рис. 1).

Чаще всего ОЛ был диагностирован в группе детей в возрасте от 0 до 5 лет – 34 случая, среди них В-линейный ОЛЛ составил 32 случая и ОМЛ – 2. В возрастной группе от 10 до 15 лет выявлено 18 случаев ОЛ (В-ОЛЛ – 12, Т-ОЛЛ – 3, ОМЛ – 3), от 6 до 9 лет – 4 случая ОЛ (В-ОЛЛ – 3, Т-ОЛЛ – 1), в возрасте старше 15 лет – 1 случай ОМЛ.

Случаи В-ОЛЛ распределились следующим образом: ВI – 1 (2%), ВII – 41 (88%), ВIII – 4 (8%), ВIV – 1 (2%, n=1) (рис. 2).

Известно, что лейкоэмические бласты при В-ОЛЛ могут демонстрировать иммунофенотипические aberrации, что определяет их лейкоз-ассоциированный фенотип и включает асинхронную экспрессию (одновременная экспрессия антигенов разных стадий дифференцировки), aberrантную экспрессию миелоидных маркеров (CD13, суМРО, CD33, CD15) или Т-линейных маркеров (CD2, CD3, CD4, CD8, CD5), увеличение или снижение экспрессии специфических маркеров [5].

Таблица 3
Варианты ОЛ и их иммунофенотипические профили
Table 3
OL variants and their immunophenotypic profiles

Вариант	Скрининговые маркеры	Дополнительные (подтверждающие) маркеры
В-линейный ОЛЛ	CD19+, CD10+	Kappa chain, Lambda chain, CD24, CD22
Т-ОЛЛ	CD7+, CD4+	CD1a, CD4, CD8, TCR α/β, TCRγ/δ, CD99
ОМЛ	CD117+, CD33+	CD71, CD61, CD42b, CD235a, CD36

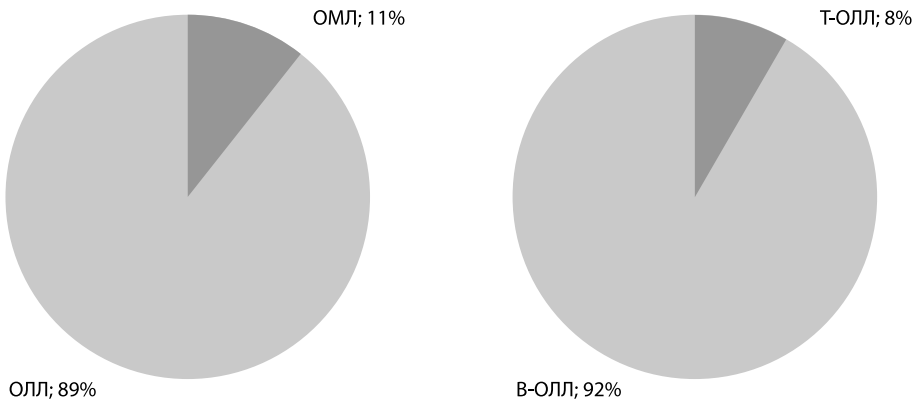


Рис. 1. Структура вариантов острого лейкоза у детей по результатам иммунофенотипирования
Fig. 1. The structure of variants of acute leukemia in children according to the results of immunophenotyping

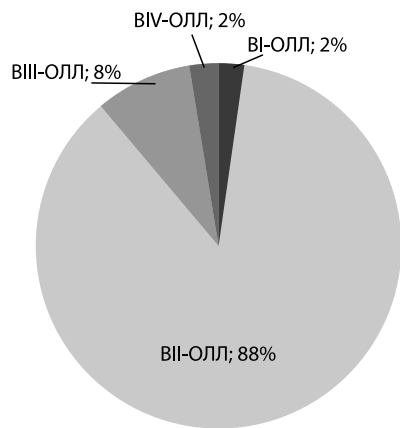


Рис. 2. Структура вариантов В-ОЛЛ по результатам иммунофенотипирования
Fig. 2. The structure of B-ALL variants according to the results of immunophenotyping

В группе В-ОЛЛ аберрантность была выявлена у 22 пациентов (47%). Из них – у 6 пациентов отмечалась коэкспрессия одновременно более одного нелинейно специфического маркера. Чаще всего обнаруживалась коэкспрессия CD123 – 12 случаев, CD13 – 9 случаев, CD25 – 3 случая, CD33 – 2 случая, CD65 – 1 случай, суМРО – 1 случай, NG2 – 1 случай (данные приведены без учета сочетания коэкспрессии нескольких маркеров в одной опухоли) (табл. 4).

Среди 6 случаев ОМЛ аберрантность была выявлена у 4 пациентов и характеризовалась экспрессией CD2, CD7, CD4, NG2, CD25. Среди 4 случаев Т-ОЛЛ (ТII-ОЛЛ=3, ТIII-ОЛЛ=2) аберрантность установлена у 3 пациентов в виде экспрессии CD10, CD33.

Таблица 4
Случаи коэкспрессии нелинейно специфических маркеров при В-ОЛЛ (B-ALL)
Table 4
Cases of co-expression of non-linear specific markers in B-ALL (B-ALL)

Маркер	BI	BII	BIII	BIV
CD123 (линейно не ограниченный маркер)	–	12	–	–
CD13 (антиген миелоидного ряда)	–	8	1	–
CD25 (субъединица α рецептора IL-2)	1	2	–	–
CD33 (антиген миелоидного ряда)	1	3	–	–
CD65 (антиген миелоидного ряда)	–	1	–	–
суМРО (миелопероксидаза, маркер миелоидного ряда)		–	1	–
NG2 (нейрон-глиальный антиген)	1	–	–	–
CD11b (антиген миеломоноцитарного ряда)	–	1	–	–
CD15 (антиген миеломоноцитарного ряда)	1	–	–	–



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные о частоте встречаемости ОМЛ и ОЛЛ у детей в Гомельской области совпадают с данными литературы. Частота встречаемости ОЛ у детей до 5 лет выше, чем в других возрастных группах, при этом среди вариантов ОЛ чаще встречается ВП-ОЛЛ. В значительной части случаев В-ОЛЛ опухоль имеет aberrantный фенотип с коэкспрессией маркеров других клеточных линий.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Movchan L. (2012) Leukemia-associated immunophenotype of tumor cells in childhood B-precursors acute lymphoblastic leukemia. *Oncohematology*, no 1, pp. 22–28. (in Russian)
2. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. (2008) *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press, 439 p.
3. Bene M., Castoldi G., Knapp W. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, vol. 9, no 10, pp. 1783–1786.
4. Sukhina I., Nikitin V., Kolyubaeva S. (2015) Neoplasm cell's immunophenotypic profile in cases of the acute leukaemia with recurrent genetic abnormalities. *Laboratory Service*, no 1, pp. 3–15. (in Russian)