

*В.О. Логінський**Г.Б. Лебедь**О.І. Дорош**А.В. Петрух**Р.С. Поліщук**О.В. Глинська**Я.І. Виговська**Інститут патології крові та  
трансфузійної медицини  
АМН України**Львівська обласна  
спеціалізована дитяча клінічна  
лікарня, Львів, Україна***Ключові слова:** *гостра  
лімфобластна лейкемія у дітей,  
імунофенотип, бластні клітини.*

## ІМУНОФЕНОТИПІЧНА ДІАГНОСТИКА ГОСТРОЇ ЛІМФОБЛАСТНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ У ДІТЕЙ

**Резюме.** Проаналізовано результати імунофенотипування бластних клітин кісткового мозку у 76 дітей з гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ). Відповідно до класифікації GALGB та EGIL, діагноз В-лінійної ГЛЛ встановлено у 63 хворих, Т-лінійної — у 13. У 41 випадку на лейкемічних клітинах виявлено комбінації аберантної (мієлоїдних) та/або асинхронної (Т-клітинних) коекспресії поверхневих маркерів.

### ВСТУП

Гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) — біологічно і клінічно гетерогенна група пухлинних захворювань крові, яким властива злаякісна проліферація незрілих лімфоїдних елементів кісткового мозку з ураженням неопластичними клітинами різних тканин і органів. Вважають, що лейкемічний клон при ГЛЛ походить з нормальних лімфоїдних клітин-попередників, у яких на ранніх стадіях онтогенезу В- чи Т-лімфоцитів відбулися порушення нормального розвитку [2, 6, 10, 12].

Сучасні методи вивчення лімфобластів при ГЛЛ включають, поряд з морфоцитохімічним аналізом, імунофенотипічні, цитогенетичні, молекулярно-біологічні дослідження злаякісного клону, оскільки в частині випадків (10–15%) використання тільки цитологічних і цитохімічних критеріїв виявилось недостатнім для проведення диференційної діагностики ГЛЛ та гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ), а також для розпізнавання В- чи Т-лінійних ГЛЛ. Виділення морфологічних типів лімфобластів відповідно до FAB-класифікації не відіграло суттєвої ролі у визначенні тактики лікування та прогнозу хвороби [3, 4, 9, 11, 12].

Для імунофенотипічної класифікації ГЛЛ враховують експресію на лімфобластах як окремих диференційних антигенів, так і їх комбінацій згідно з імунним варіантом захворювання. Відповідно до критеріїв, запропонованих Європейською групою з імунологічної класифікації лейкемії EGIL [2], В- і Т-ГЛЛ залежно від стадії зрілості неопластичних клітин умовно розділено на 4 типи. Крім того, лейкемічні клітини у дітей, хворих на ГЛЛ, також експресують антигени іншої лінії лімфопоезу і, за даними різних авторів, у 20–40% випадків — мієлоїдні маркери [1, 4, 5, 7].

Імунофенотипічний розподіл ГЛЛ не тільки дає уявлення про походження непластичного процесу, але й дозволяє вибрати і застосувати адаптовані про-

токоли лікування з урахуванням чутливості бластних клітин до хіміопрепаратів.

Проте, незважаючи на значний прогрес у лікуванні хворих з гемобластозами, проблема подальшого вивчення цих захворювань, маркерів пухлинного субстрату залишається актуальною.

Мета роботи — проаналізувати імунофенотипічний профіль бластних клітин у дітей, хворих на ГЛЛ, визначити лінійне спрямування і варіант захворювання з можливою подальшою оцінкою його прогностичного значення.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Представлено результати імунофенотипічних досліджень бластних клітин кісткового мозку до початку цитостатичної терапії, проведених у 76 дітей (40 дівчаток і 36 хлопчиків) віком 9 міс — 19 років, хворих на ГЛЛ, які перебували на лікуванні у Львівській обласній спеціалізованій дитячій клінічній лікарні (ЛОСДКЛ). Попередній діагноз ГЛЛ встановлювали на основі даних загальноклінічного обстеження пацієнтів, цитологічного і цитохімічного дослідження периферичної крові та кісткового мозку. Цитохімічні дослідження включали визначення вмісту мієлопероксидази, глікогену, ліпідів, лізосомальних ферментів (неспецифічної естерази, кислотої фосфатази) у бластних клітинах. Усі випадки були пероксидазонегативні. Бластні клітини, що тотально інфільтрували кістковий мозок, за критеріями FAB-класифікації у 55 (72,4%) хворих мали морфологію L<sub>1</sub>, у 10 (13,2%) — L<sub>2</sub>, у 8 (10,5%) — L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub> і у 3 (3,9%) дітей — L<sub>3</sub> тип.

Імунофенотипічні дослідження проведені в клінічній лабораторії ЛОСДКЛ за допомогою методу проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл (МКАТ) («Becton Dickinson», США, і «Дак», Данія), спрямованих з флюорохромами флюоресцеїн-

ізотіоціанатом (FITC) або фікоеритрином (PE). Панель МКАТ включала 17 типів, спрямованих до антигенів різних кластерів диференціації (CD): лінійно-незалежні — CD45, CD34; В-лінійні — CD19, CD20, CD22, CD10; Т-лінійні — CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8; міелоїдні — CD13, CD33, CD15, CD14; еритроїдні — глікофорин А. Маркування клітин МКАТ проводили на апараті FACScan («Becton Dickinson», США), результати оцінювали згідно з рекомендаціями фірми-виробника з калібруванням проточного цитометра CaliBRITE Beads, програмним забезпеченням AutoCOMP та за умови негативного ізотипічного контролю. В дослідженнях застосовано також подвійне маркування з використанням наступних комбінацій МКАТ: CD19/CD34, CD19/CD33, CD19/CD38, CD10/CD38, CD10/CD19, CD10/CD34, CD33/CD34. Імунофлюоресценцію антигену реєстрували в тих випадках, коли частка бластів, що експресують даний маркер, складала не менше 20% для лімфоїдних і 30% — для міелоїдних маркерів.

Для оцінки лінійності бластних клітин застосовували критерії діагностики GALGB [5]. Принципи імунофенотипічної діагностики групи EGIL враховували частково, оскільки в дослідженнях не визначали цитоплазматичні маркери. Випадки експресії комбінації антигенів були класифіковані як ВМу, ВМуТ, ТМу ГЛЛ.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час проведення цитохімічного дослідження в усіх хворих у бластних клітинах було встановлено відсутність пероксидази та ліпідів. Гранулярний тип PAS-реакції виявлено у 68 хворих, у бластах 8 дітей вона мала дрібногранулярний характер. Негативну реакцію на неспецифічну естеразу спостерігали у 64 дітей, хворих на ГЛЛ, у 12 — вона була слабко-дифузною. У 59 хворих у бластах кислу фосфатазу не виявили, у 17 — реакція була дифузною і слабко-вираженою. У 10 хворих відзначено позитивну гранулярну реакцію на кислу фосфатазу; у цих хворих при подальшому імунофенотипічному дослідженні діагностовано Т-ГЛЛ.

На основі аналізу антигенної структури мембрани лейкемічних клітин у дітей, хворих на ГЛЛ, та з урахуванням критеріїв класифікації ГЛЛ за GALGB і частково — EGIL, В-лінійну ГЛЛ діагностовано у 63 (82,9%) дітей, Т-лінійну — у 13 (17,1%). В-клітинну лейкемію діагностували за експресією В-клітинних маркерів CD19 чи CD20, Т-клітинну — як CD2-чи CD7-позитивну без В-антигенного маркування. На цій підставі виділено 4 варіанти В-лінійної та 4 — Т-лінійної ГЛЛ.

Варіанти В-клітинної ГЛЛ:

**В<sub>1</sub> (про-В):** CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD20<sup>-</sup>sCD22<sup>-</sup> — у 8 хворих;

**В<sub>2</sub> (common В):** CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD20<sup>±</sup>sCD22<sup>±</sup> — у 40 хворих;

**В<sub>3</sub> (пре-В):** CD34<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>sCD22<sup>±</sup> — у 12 хворих;

**В<sub>4</sub> (зрілий В):** CD34<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>sCD22<sup>+</sup>sIgM<sup>+</sup> — у 3 хворих.

Варіанти Т-клітинної ГЛЛ:

**Т<sub>1</sub> (про-Т):** Dr<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD2<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>sCD3<sup>-</sup>CD1<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> — у 2 хворих;

**Т<sub>2</sub> (пре-Т):** Dr<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>sCD3<sup>-</sup>CD1<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> — у 2 хворих;

**Т<sub>3</sub> (кортикальний Т):** Dr<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>sCD3<sup>-</sup>CD1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>iCD8<sup>+</sup> — у 5 хворих;

**Т<sub>4</sub> (зрілий Т):** Dr<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>sCD3<sup>+</sup>CD1<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> — у 4 хворих.

Лінійний розподіл В- і Т- маркерів представлено в таблиці. Із 63 хворих з В-клітинною ГЛЛ у 26 (34,2%) виявлено експресію тільки В-клітинних антигенів, у 23 (30,3%) — аберантну експресію міелоїдних антигенів, у 6 (7,9%) — на В-бластах верифіковано асинхронні Т-клітинні маркери, а у 8 (10,5%) — коекспресію на лейкемічних В-клітинах одночасно Т-клітинних та міелоїдних антигенів. Т-лінійну ГЛЛ встановлено в 11,8% хворих дітей і у 4 (5,3%) хворих Т-бласти мали одночасно аберантні міелоїдні маркери.

Таблиця

Лінійний розподіл бластних клітин у хворих на ГЛЛ

Лінійний розподіл	Кількість випадків, %
В-клітинна ГЛЛ	63 (82,9)
Тільки В-клітинні антигени	26 (34,2)
В + Т-антигени	6 (7,9)
В + Му-антигени	23 (30,3)
В + Т + Му-антигени	8 (10,5)
Т-клітинна ГЛЛ	13 (17,1)
Тільки Т-антигени	9 (11,8)
Т + Му-антигени	4 (5,3)

Імунофенотипічна діагностика ГЛЛ ґрунтується на детальному вивченні антигенів мембрани і цитоплазми злоякісних клітин, тобто виявленні експресії на бластних клітинах лінійно-специфічних і стадіє-специфічних маркерів за допомогою панелі МКАТ, які розпізнають окремі епітопи клітинних білків-антигенів. Сукупність поверхневих і цитоплазматичних маркерів у більшості випадків ГЛЛ є основою для встановлення лінійної належності, визначення стадії зрілості прекурсорів В- чи Т-лімфоцитів, функціонального стану клітин. Для встановлення імунофенотипу лімфобластів можуть бути використані різні методи (імуноцитохімічні, імунофлюоресцентні). Завдяки удосконаленню методів проточної цитометрії та імунофлюоресцентної мікроскопії стало можливим проведення детального визначення імунофенотипічної різноманітності ГЛЛ. На основі концепції відповідності фенотипу злоякісних клітин фенотипу нормального клітинного аналога на кожному рівні диференціації стало можливим виділити низку імунних варіантів, що визначають клітинну природу лейкемії і рівень блока диференціації в неопластичній популяції, хоча істинно лейкемієасоційованих маркерів не знайдено [2, 8, 12].

Аналізуючи лінійний розподіл і частоту експресії окремих маркерів В- і Т-клітинних імунофенотипічних підгруп, слід відзначити, що при В-лінійних ГЛЛ дещо частіше спостерігали коекспресію на В-бластах міелоїдного маркера, частіше CD13 (у 62%

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

пацієнтів), ніж CD33 (у 52% пацієнтів). Крім того, лейкоцитарні клітини фарбували МКАТ до CD15 у 7 із 16 дітей, а у 6 — відзначали експресію глікофору А, що за даними доступної літератури є несприятливою прогностичною ознакою [12]. Експресію моноцитарного маркера CD14 констатували на лейкоцитарних клітинах в 1 з 20 хворих. В частині випадків на В-бласти виявляли коекспресію Т-лінійно-асоційованих антигенів: CD5, CD7, CD3.

Імунофенотип бластних клітин при Т-лінійних ГЛЛ характеризувався експресією відповідно Т-клітинних маркерів (CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD4, CD8). На Т-бласти не виявляли В-клітинних маркерів, проте у 3 з 10 хворих спостерігали коекспресію мієлоїдних антигенів CD33 та у 6 з 11 — CD13. Тільки у 3 пацієнтів з Т-лінійною ГЛЛ відзначали експресію антигена CD10, проте, на відміну від В-ГЛЛ, наявність чи відсутність цього маркера при Т-лінійних ГЛЛ не має прогностичного значення [9].

Слід відзначити, що антиген HLA-DR в основному виявлявся на неопластичних клітинах при В-клітинній ГЛЛ, порівняно з Т-клітинною. Щодо маркера CD38, то частіше експресію його констатували при В-лінійних ГЛЛ. У літературі відзначається, що наявність цього маркера не пов'язана з клінічною картиною в межах імунологічної підгрупи і не впливає на загальну виживаність хворих на ГЛЛ [9, 11].

Застосування для аналізу 2- чи 3-параметрових комбінацій МКАТ дозволяє отримати більш повну інформацію про фенотипічні аберації досліджуваних субстратів. Тому першою Європейською групою з імунологічної класифікації лейкемії розглянуто і запропоновано систему підрахунку для визначення біфенотипічних ГЛ, при яких враховується різний ступінь специфічності маркерів [2]. Для доведення коекспресії антигенів на одних і тих же клітинах, фенотипування з використанням мультипараметрових МКАТ є несуттєвим у випадку, якщо сума відсотка лейкоцитарних клітин, позитивних з мієлоїдними і лімфоїдними маркерами, при одинарному фенотипуванні є більшою за 120 [2].

Таким чином, удосконалення імунологічних методів досліджень з використанням МКАТ дозволяє визначити варіант гострої лейкемії серед, здавалось би, морфологічно однорідних нозологічних форм з подальшим вивченням можливості використання отриманих результатів для прогнозування перебігу хвороби.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Basso G, Rondelli R, Covezzoli A, Putti M. The role of immunophenotype in acute lymphoblastic leukemia of infant age. *Leuk. Lymphoma* 1994; **15** (1–2): 51–60.

2. Бене МК, Кастолди Г, Напп В и др. Предложения для иммунологической классификации острых лейкозов. *Гематол и трансфузиол* 1996; **41** (6): 43–5.

3. Bradstock K. The diagnostic and prognostic value of immunophenotyping in acute leukemia. *Pathology* 1993; **25** (4): 367–74.

4. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotyping detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998; **16** (12): 3774–81.

5. Czuczman MS, Donge RK, Stewart CC, et al. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 8364. *Blood* 1999; **93** (11): 3931–8.

6. Estrov Z, Re G, Zipf T. Immature and differentiated neoplastic populations in acute lymphoblastic leukemia of childhood: biological and clinical implications. *Leuk Lymphoma* 1993; (11): 1–7.

7. Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, et al. Leukemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: detection in remission marrow predict outcome. *Brit J Haematol* 1999; **105** (1): 241–55.

8. Коленкова ГВ. Маркеры острого лейкоза в диагностике и прогнозе заболевания у детей. *Гематол и трансфузиол* 2002; **47** (2): 28–34.

9. Курдюков БВ, Тупицын НН, Маякова СА. Зависимость прогноза заболевания от иммунологической характеристики острого лимфобластного лейкоза у детей. *Педиатрия* 1997; (2): 65–70.

10. Глузман ДФ, Абраменко ИВ, Скляренко ЛМ, Надгорная ВА. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. Киев: Морион, 1998. 336 с.

11. Ленская РВ, Коленкова ГВ, Тимаков АМ. Клиническое значение характера экспрессии CD-антигенов бластных клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей. *Эксперим онкол* 2000; **22** (3): 191–4.

12. Тупицын НН. Иммунодиагностика гемобластозов. В: Клиническая онкогематология. Москва: Медицина, 2001: 124–31, 156–70.

### IMMUNOPHENOTYPIC DIAGNOSES OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN

V.O. Loginsky, G.B. Lebed, O.I. Dorosh, A.V. Petrukh, R.S. Polischuk, O.V. Glynska, Y.I. Vygovska

**Summary.** The results of immunophenotyping of blast cells from bone marrow in 76 children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) have been analyzed. According to GALGB and EGIL classifications B-lineage ALL was detected in 63 patients and T-lineage ALL was confirmed in 13 patients. Combinations of aberrant (myeloid) and/or asynchronous (T-cell) markers coexpression were revealed in 41 cases.

**Key Words:** acute lymphoblastic leukemia in children, immunophenotype, blast cells.

**Адреса для листування:**

Логінський В.О.

79044, Львів, вул. Генерала Чупринки, 45

Інститут патології крові та

трансфузійної медицини АМН України