

ПЕДИАТРИЯ

УДК 616-006.446-09

Т.Ю.Азовская, Л.Г. Фечина, С.В.Сазонов

ЧАСТОТА ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ

Онкогематологический центр Областной детской клинической больницы, г.Екатеринбург

Цитологические и цитохимические методы, применяемые для диагностики гемобластозов, не дают полной характеристики бластных клеток. Использование моноклональных антител (МКА) с целью оценки дифференцировочных антигенов лейкоцитов показало, что опухолевые клетки, несмотря на морфологическую схожесть, могут относиться к разным клеточным линиям и дифференцировочным стадиям. Использование МКА в проточной цитометрии позволяет определить принадлежность клеток к миелоидному или лимфоидному росту кроветворения, выделить в рамках острых лимфобластных лейкозов Т- и В-линейные иммуноподварианты, гибридные формы и определить степень зрелости клеток [2]. В настоящее время перечень МКА, применяемых для диагностики ALL, продолжает увеличиваться и включает в себя уже более 130 наименований. Цель данного исследования - оценить значимость используемых МКА для иммунологической диагностики гемобластозов.

Методом иммунофенотипирования изучались бластные клетки костного мозга в период установления диагноза до начала лечения.

Применяли вариант окраски клеток с использованием "двойной метки" с первичномеченными МКА фирмы "Becton Dickinson" (U.S.A.). Исследования проводили на проточном цитофлуорометре FACscan (Becton Dickinson). Использовали панель из 24 МКА (табл. 1).

Реакцию с МКА считали положительной при наличии в лейкозной популяции не менее 20,0% антигенпозитивных клеток [1]. Для накопления и анализа данных использовали программы LYSYS II, версия 1.1. и PAINT-A-GATE Plus. Дифференциальную диагностику иммунофенотипических подвариантов гемобластозов проводили в соответствии с иммунологической классификацией лейкозов [3,4].

Обследовано 103 ребенка с диагнозом "острый лейкоз". Среди всех обследованных у 86 детей (83,5%) выставлен диагноз: острый лимфобластный лейкоз (ALL), а у 17 (16,5%) - острый миелобластный лейкоз (AML). С помощью метода иммунофенотипирования в рамках ALL выделяли Т-линейные и В-линейные иммуноподварианты. В зависимости от степени зрелости в Т-линейных ALL идентифицировали пре-Т-ALL и Т-ALL, а в В-линейных - пре-В-ALL (О-ALL), Common-ALL. По данным наших исследований вариант В-ALL не был диагностирован. Частота его встречаемости по данным литературы составляет 0-3% [3]. Особую группу составили бифенотипические острые лимфобластные лейкозы (AML-L). Распределение исследованных случаев по иммуноподвариантам представлено на рисунке 1.

Таблица 1

Группы МКА, использованных для иммунофенотипирования острых лейкозов

Лимфоидные, Т-линейные	Лимфоидные, В-линейные	Миело-моноцитарные	Другие
CD2	CD19	CD11b	CD10
CD3	CD20	CD13	CD34
CD4	CD22	CD14	CD38
CD5	Kappa	CD15	HLA-DR
CD7	Lambda	CD33	CD71
CD8	IgM	CD42a	CD45/CD14
		CD61	

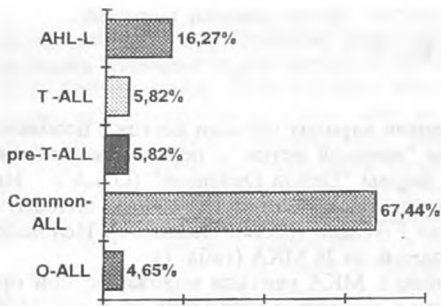


Рисунок. Частота встречаемости иммунофенотипических вариантов ALL

Т-линейные острые лимфобластные лейкозы Pre-T-ALL

При данном иммунофенотипическом варианте ALL определяются CD7, CD2 и CD5 в 100,0% случаев. Уровни экспрессии дифференцировочных антигенов, выявляемых при помощи МКА, были достоверно высокими и составляли $89,8 \pm 0,9$, $80,8 \pm 11,7$ и $91,2 \pm 1,5\%$ соответственно. CD3 определяли в 80,0% случаев, но уровень его экспрессии на blasts был ниже и составил только $35,3 \pm 3,6\%$. CD4+ и CD8+ клетки присутствовали во всех случаях pre-T-ALL, хотя данные по уровню экспрессии были достоверно различны ($57,2 \pm 11,1$ и $83,4 \pm 6,3\%$). Установлен факт коэкспрессии на клетках как CD4, так и CD8 антигенов с частотой $56,3 \pm 3,4\%$. CD38 определяли в 80,0% случаев с высоким уровнем экспрессии на клетках ($96,5 \pm 1,5\%$). Антигены к HLA-DR, CD34 и CD38 в диагностически значимом проценте не были выявлены ни в одном случае с pre-T-иммуноподвариантом. Коэкспрессию CD10 отмечали на CD7+CD3- и CD7+CD19+/- клетках в 80,0% случаев с уровнем экспрессии $68,3 \pm 5,2\%$.

T-ALL

При иммунофенотипировании клеток костного мозга больных с данным вариантом ALL экспрессия CD10, CD34 антигенов не выявляется. CD7 и CD3 определяли в 100,0% случаев, причем средние значения уровня их экспрессии достаточно высоки ($82,4 \pm 6,3$ и $89,4 \pm 4,6\%$ соответственно). Отмечалась не только коэкспрессия CD7 и CD3 антигенов, но и наличие CD3+CD7- клеток, что указывало на зрелость клеток. Средние значения экспрессии CD2 и CD5 антигенов были диагностически значимыми лишь в 80,0 и 60,0% случаев и ее уровни составили $84,5 \pm 5,2$ и $57,6 \pm 18,9\%$ соответственно. Следует отметить, что средний уровень экспрессии CD5 антигена в отдельных случаях незначительно превышал диагностически значимые цифры.

Не было выявлено различий между pre-T-ALL и T-ALL по экспрессии антигена актива-

ции CD38. В обоих случаях данный антиген выявлялся в 80,0% случаев с высокими показателями экспрессии на клетках ($87,5 \pm 6,6$ и $96,3 \pm 1,5\%$ соответственно).

Миелоидные антигены в диагностических значениях на клетках при обоих иммунофенотипических вариантах не определялись. Следовательно, для Т-линейных ALL характерным является отсутствие коэкспрессии миелоидных антигенов на Т-лимфоцитах.

В-линейные острые лимфобластные лейкозы Pre-pre-B-ALL

Клетки не экспрессировали CD 10 (CALLA-антиген) и CD20. Ни в одном из случаев не выявлена коэкспрессия лимфоцитами антигенов миелоидного ряда. Не обнаружены Т-клеточные маркеры. CD19 и CD22 определялись в 100,0% случаев с высокими показателями экспрессии ($80,4 \pm 11,3$ и $50,0 \pm 8,3\%$). С такой же частотой обнаружен стволовый клеточный маркер CD34 (уровень экспрессии - $57,2 \pm 5,4\%$). Одновременная коэкспрессия CD19 и CD34 позволяет предположить, что неопластическая трансформация произошла на начальных этапах дифференцировки гемопоэтических клеток.

Common-ALL

Во всех случаях отмечалась коэкспрессия CD19 с CD10 в сочетании с HLA-DR. При этом показатели экспрессии данных антигенов на клетках были стабильно высокими ($88,3 \pm 1,2\%$; $83,4 \pm 1,5$ и $90,1 \pm 1,1\%$ соответственно). CD20 и CD22 определяются в 50,0 и 100,0% случаев с показателями экспрессии на клетках ($48,7 \pm 4,6$ и $85,3 \pm 1,6\%$ соответственно). Отмечена коэкспрессия CD20 и CD22 на уровне единичного лимфоцита и экспрессия этих антигенов на разных клетках. В 82,8% случаев клетки лейкозного пула имеют стволовый клеточный происхождение, т. е. определен CD34 с высокими показателями экспрессии ($73,5 \pm 3,3\%$). Таким образом, в состав лейкозного клона Common-ALL входят две популяции клеток: CD 34+ и CD34-. CD38 и HLA-DR выявлены в 100,0% случаев, показателями экспрессии на клетках $88,8 \pm 3,0$ и $90,1 \pm 1,1\%$ соответственно.

Характерной особенностью данного иммуноподварианта ALL является наличие коэкспрессии с миелоидными антигенами. Одновременного сочетания этих антигенов на одних клетках не обнаружено. В образцах, где была положительная реакция с МКА гранулоцитарного ростка, отмечали наличие одного из типов лимфоцитов: CD19+CD33+; CD19+CD13+; CD19+CD15+. Наиболее часто определяли CD13+ (20,7%), другие антигены встречались значительно реже (CD15+ в 6,9, CD33+ в 3,4%), хотя показатели уровней экспрессии были практически одинаковы ($53,2 \pm 5,8$, $74,0 \pm 8,2$ и $52,0 \pm 3,1\%$ соответственно). Наблюдались единичные случаи коэкспрессии на Common-

лимфобластах Т-линейных антигенов CD2 и CD7. При этих вариантах отмечен высокий процент их коэкспрессии с CD19 и CD10, что указывало на нарушение иммунологической дифференцировки лимфобластов, а не на наличие клеток двух линий.

ANL-L

В 100,0% случаев и с высокими показателями экспрессии антигена на бластах ($75,3 \pm 5,0\%$) определяется CD34, что указывает на наличие блока дифференцировки клеток на уровне стволовой клетки. Положительная в 100,0% случаев реакция с CD19, CD22 определяла линейность данного клона лейкозных клеток, причем экспрессия В-линейных антигенов была достаточно выраженной ($85,3 \pm 3,5$; $75,2 \pm 6,7\%$). Предположение, что фенотип бластов соответствует Common, подтверждало присутствие во всех образцах CALLA антигена (уровень экспрессии - $77,6 \pm 6,2\%$). Экспрессия CD20 была достаточно слабой ($18,0 \pm 5,3\%$) и обнаруживалась на клет-

ках лишь в 21,4% случаев. CD38 и HLA-DR представлены в 100,0% с равнозначными показателями экспрессии ($85,3 \pm 4,6$ и $84,5 \pm 4,2\%$). Одновременно с экспрессией В-клеточных антигенов на лимфобластах с высоким уровнем экспрессии определяли CD 33+ и CD 13+ ($63,5 \pm 6,2$ и $60,3 \pm 5,7\%$ соответственно). Применяемый метод "двойной" метки окраски клеток с первичномеченными МКА позволил расценить это явление как коэкспрессию миелоидных антигенов на лимфобластах. При этом, при наличии CD19+ CD33+ клеток были обнаружены CD19+CD33- клетки, но отсутствовали CD19-CD33+ бласты. Подобные закономерности отмечены и для коэкспрессии CD13 и CD22 антигенов.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены иммунофенотипы подвариантов ALL у детей и значимость использованных МКА для их диагностики (табл. 2).

Таблица 2

Частота экспрессии антигенов на бластных клетках при различных иммунофенотипических подвариантах ALL у детей

МКА*	Null-ОЛЛ	Common-ОЛЛ	ANL-L	пре-Т-ОЛЛ	Т-ОЛЛ
CD2	—	—/+	—	+	+/-
CD3	—	—	—	+/-	+
CD4	—	—	—	+	-/+
CD5	—	—	—	+	+/-
CD7	—	—/+	—	+	+
CD8	—	—	—	+	-/+
CD19	+	+	+	+/-	-/+
CD20	—	—/+	-/+	—	—
CD22	+	+	+	—	—
CD10	—	+	+	+	—
CD34	+	+/-	+	—	—
HLA-DR	+	+	+	--	—
CD38	+	+	+	+	+
CD13	—	+/-	+	—	—
CD33	—	-/+	+	—	—

Примечание: + антигены экспрессируются в 100% случаев; +/- экспрессия антигенов >50% случаев; -/+ экспрессия антигенов в 20 - 50% случаев;

* - частота экспрессии неуказанных антигенов из диагностической панели МКА - менее 20% случаев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тулицин Н.Н. Иммунофенотипическая характеристика гемобластозов человека и ее клиническое значение: Автореф. дис... докт мед. наук. М., 1992. 58 с.
2. Adorf D. et al. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies// Leukemia. 1996. N 10. P. 877-895.
3. Ludwig W.D., Raghavachar A. Thiel. Immunophenotypic classification of acute

lymphoblastic leukaemia// Bailliere's Clin. Haematol. 1994. N 7. P 235-262.

4. Riehm H. et al. Multizentrische therapiestudie der Gesellschaft für Padiatrische Onkologie und Hamatologie ALL-BFM 90. Hannover. 1991. 106 p.

Авторы выражают благодарность старшему лаборанту О.М.Смоленковой за помощь в проведении исследований.