

DOI: 10.26693/jmbs06.01.056

УДК 616. 155.392-036.11

Винницька О. А., Дорош О. І., Дубей Л. Я., Дубей Н. В.

### ІМУНОФЕНОТИПОВИЙ ПРОФІЛЬ БЛАСТНИХ КЛІТИН ЯК МАРКЕР ДІАГНОСТИКИ РЕЦИДИВІВ ГОСТРОЇ ЛІМФОБЛАСТНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ У ДІТЕЙ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна

katerinalavra@gmail.com

У роботі досліджено імунофенотипування лейкоцитних клітин, проведено моніторинг мінімальної залишкової хвороби у дітей з гострою лімфобластною лейкемією за умов розвитку рецидивів та повної ремісії після застосування ALLIC-BFM 2009 цитостатичної терапії.

*Метою* роботи було визначення особливостей імунофенотипа бластних клітин кісткового мозку дітей з гострою лімфобластною лейкемією та оцінка прогнозу рецидивів. Терапію цитостатиками проводили за програмою міжнародної групи BFM – ALLIC-BFM 2009, затвердженої МОЗ України як галузевий стандарт.

Після завершення курсу хіміотерапії пацієнтів поділили на 2 групи: I група – пацієнти, у яких спостерігався рецидив захворювання; II група – пацієнти, у яких після завершення курсу хіміотерапії виявлена повна ремісія.

Встановлено, що після лікування на основі протоколу ALLIC-BFM 2009 у 88 % дітей виявлена повна ремісія, тоді як в 12% спостерігалися рецидиви.

У пацієнтів, у яких діагностовані рецидиви, у кістковому мозку виявлялося більше 6 % бластних клітин. При цьому, моніторингу хворих з гострою лімфобластною лейкемією показало, що у пацієнтів з рецидивом захворювання після закінчення базисного лікування спостерігається підвищення рівня мінімальної залишкової хвороби більше 1 %.

Імунофенотипування бластних клітин у пацієнтів з рецидивом показало експресію лінійно-незалежних антигенів HLA – 93 %, Anti-TdT – 91 %, CD10 – 78 %, CD38 – 91 % та CD34 – 57 % та В-лінійних антигенів – CD19, CD22, CD58, CD79a, серед яких найвища експресія виявлена для антигена CD19. У пацієнтів з повною ремісією знижується експресія CD34 до  $21 \pm 1,9$  %, TdT до  $22,5 \pm 2,8$  % та експресія CD10 до  $26 \pm 3,1$  %, що вказує на відновлення процесів диференціації та дозрівання бластних клітин.

Встановлено низький рівень експресії CD45 – 28 % при рецидивах гострої лімфобластної лейкемії та високий – 89 % при повній ремісії захворювання. Експресія антигенів, характерних для Т-клітинної гострої лімфобластної лейкемії у кістковому мозку пацієнтів з гострою лімфобластною лейкемією як в період рецидиву, так і ремісії не виявлена. Водночас, у пацієнтів з гострою лімфобластною лейкемією в період рецидиву відмічена на високому рівні експресія мієлоїдних антигенів – 47% CD33 та 39% CD13, тоді як у пацієнтів у період ремісії ці показники були на рівні 19% CD33 та 16% CD13.

**Ключові слова:** імунофенотип, бластні клітини, антигени, мінімальна залишкова хвороба, гостра лімфобластна лейкемія.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота є фрагментом НДР «Вивчення впливу екологосоціальних та мікроекологічних чинників на розвиток патологічного стану у дітей шляхом удосконалення методів ранньої діагностики, лікування, профілактики», № держ. реєстрації 1119U100141, шифр Ін.1900/0001/19.

**Вступ.** Біологічно гетерогенною групою пухлинних захворювань системи крові є гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ). Розвиток цієї патології відбувається внаслідок мутацій у стовбуровій клітині, внаслідок чого порушуються механізми проліферації та диференціювання незрілих лімфоїдних клітин кісткового мозку [1]. За цих умов неконтрольована проліферація клітин лейкоцитного клону починає переважати над нормальними клітинами гемопоєзу, що пригнічує процес кровотворення [2].

Походження лейкоцитного клону при ГЛЛ відбувається з лімфоїдних клітин-попередників, у яких, під час онтогенезу В- чи Т-лімфоцитів, відбулися порушення нормального розвитку [3].

Цитологічні та цитохімічні ознаки бластних клітин лежать в основі діагностики і класифікації

гострих лейкемій [4]. Для діагностики використовуються цитохімічні реакції, цитоморфологічні методи для відокремлення лімфобластних лейкемій В- і Т-клітинного походження. Імунофенотипування є важливим елементом сучасної діагностики гострих лейкемій, оскільки дозволяє чітко визначити походження бластних клітин [5]. Імунофенотипові особливості бластних клітин лежать в основі класифікації ГЛЛ, що характеризується локалізацією на поверхні лімфобластів певних диференційованих антигенів або їх комбінацій. У дитячому віці найбільш часто зустрічається В-клітинний ГЛЛ, морфологічним субстратом якого є незрілі клітини, комітовані в В-лінійному напрямку [6].

Морфологічне дослідження та імунофенотипування кісткового мозку відіграє важливу роль у моніторингу наявності лімфобластів лейкемічного типу, оскільки для встановлення діагнозу необхідне визначення ряду клітинних антигенів.

Основною проблемою, що виникає після проведення поліхіміотерапії у дітей з ГЛЛ, в даний час залишаються рецидиви захворювання. Результат рецидиву може бути надзвичайно несприятливим як при проведенні поліхіміотерапії цитостатиками, так і трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин [7].

Розподіл бластних клітин за імунофенотипом при ГЛЛ не тільки дасть можливість з'ясувати походження неопластичного процесу, але й дозволить проаналізувати ефективність застосованої цитостатичної хіміотерапії.

В основі виникнення рецидивів лежить персистенція залишкових лейкемічних клітин або мінімальна залишкова хвороба (MRD, minimal residual disease) [8]. Визначення вмісту залишкових пухлинних клітин можливе тільки із застосуванням високочутливих методів дослідження. Одним з таких методів є метод багатопараметричної проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл. Цей метод заснований на ідентифікації лейкоз-асоційованого імунофенотипу пухлинних клітин на момент діагностики і потім відстеження клітин на етапах протипухлинної терапії [9].

**Мета роботи** – визначити особливості імунофенотипу бластних клітин кісткового мозку дітей з ГЛЛ та оцінити його прогностичне значення у розвитку рецидивів.

**Матеріал та методи дослідження.** У дослідження включені 105 дітей (62 – хлопчики, 43 – дівчинки) віком від 12 місяців до 16 років (медіана віку становила 6 років) з діагнозом ГЛЛ, які знаходились на лікуванні у гематологічних відділеннях КНП ЧОР «Чернівецька обласна дитяча лікарня», КНП ІОР «Івано-Франківська дитяча обласна клінічна лікарня», КНП РОР «Рівненська обласна дитяча лікарня». Хворі поступали на первинне стаці-

онарне лікування з 11.05.2012 р. до 13.06.2016 р. Контроль за віддаленими результатами припинено 1 липня 2019 р. У дослідження не включали дітей, що вибули з-під нагляду через відмову батьків продовжувати хіміотерапію, та хворих, що до початку програмної терапії отримували цитостатики/преднізолон.

У всіх дітей ГЛЛ діагностовано вперше. Діагностику ГЛЛ проводили відповідно до протоколу МОЗ України №364 від 20.07.2005 року, згідно якого обов'язковими діагностичними заходами були: пункція кісткового мозку з наступним цитологічним, цитохімічним, імуноцитологічним і цитогенетичним/молекулярно-генетичним дослідженням лейкемічних (бластних) клітин (паралельно морфологічні дослідження проводилися також на бластних клітинах периферійної крові). В момент встановлення діагнозу проводили люмбальну пункцію для вивчення кількості клітин у лікворі. Крім базисного клінічного обстеження, при якому визначали ознаки геморагічного синдрому, інфекцій, порушень з боку внутрішніх органів, неврологічний статус, проводилося ультразвукове дослідження (УЗД) органів черевної порожнини, рентгенологічне дослідження органів грудної клітки та можливих (за клінічними симптомами) місць скелетних уражень, комп'ютерна томографія (КТ) або магнітно-резонансна томографія (МРТ) голови. Визначали також наявність або відсутність хромосомних аномалій та експресію прогностично важливих онкогенів.

Терапію цитостатиками проводили за програмою міжнародної групи BFM – ALLIC-BFM 2009, затвердженої МОЗ України як галузевий стандарт.

Повну ремісію захворювання констатували при ліквідації усіх проявів проліферативного синдрому, відсутності лейкемічних клітин у лікворі та при наявності <5% бластних клітин у пунктаті кісткового мозку. Якість ремісії контролювали шляхом вивчення мінімальної резидуальної хвороби молекулярно-генетичним або імуноцитологічним методами.

*Рецидив захворювання у пацієнтів фіксували за клінічними ознаками та лабораторними змінами, які повторювали розпал захворювання.*

Після завершення курсу хіміотерапії пацієнтів поділили на 2 групи: I група – пацієнти, у яких спостерігався рецидив захворювання (12 пацієнтів); II група – пацієнти, у яких після завершення курсу хіміотерапії виявлена повна ремісія (93 пацієнти).

Імунофенотипова діагностика ГЛЛ ґрунтувалася на детальному вивченні антигенів мембрани і цитоплазми злоякісних клітин, тобто виявленні експресії на бластних клітинах лінійно-специфічних і стадієспецифічних маркерів, за допомогою панелі моноклональних антитіл (МКАТ). Сукупність поверхневих і цитоплазматичних маркерів у

більшості випадків ГЛЛ були основою встановлення лінійної належності, виділення стадій зрілості прекурсорів В- чи Т-лімфоцитів.

Визначення імунофенотипових характеристик бластних клітин проводили до лікування та після проведення першого курсу хіміотерапії.

В якості матеріала використовували зразки КМ. Імунофенотипування проводили на свіжих зразках аспірата КМ методом проточної цитофлуориметрії [9]. Для цього з використанням градієнта щільності (Histopaque-1077 (Sigma)) зі зразка тканини КМ, який отриманий після діагностичної пункції, виділяли мононуклеарне кільце. Потім відбирали отримані клітини, проводили лізування еритроцитів і двічі відмивали в розчині фосфатного буфера. Отриману суспензію клітин в концентрації 1 млн / мл вносили в сухі чисті пробірки (по 100 мкл) і додавали МКАТ в кількості, зазначеній фірмою-виробником в інструкції по застосуванню.

Ідентифікацію антигенів проводили з використанням широкої панелі МКАТ (Vecton Dickinson, США і DAKO, Данія). МКАТ, які використовували у дослідженні були кон'юговані з флюорохромами флюоресцеїн-ізоціанатом (FITC) або фікоеритрином (PE). Панель МКАТ включала 22 типи, спрямованих до різних кластерів диференціації (CD):

- лінійно-незалежні – CD34, HLA-DR, CD38, CD10, Anti-TdT;
- В-лінійні – CD19, CD20, CD22, CD79a, CD58;
- Т-лінійні – CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8;
- міелоїдні – CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, CD117.

У дослідження включено цитоплазматичний маркер сCD3.

Оцінку результатів проводили на проточному цитометрі BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) в гейті бластних клітин, які ідентифікували за фізичними параметрами світлорозсіювання (FSC і SSC) [10]. Антигенпозитивними вважали випадки з експресією маркера більше 20% пухлинних клітин для лімфоїдних та лінійно-незалежних і 30 % для міелоїдних маркерів.

Моніторинг відповіді пацієнтів на перший етап хіміотерапії проводили на основі імуноцитологічного визначення мінімальної залишкової – резидуальної – пухлини (MRD) на 8-, 15- та 33-й день цитостатичної терапії. MRD враховували як один із показників під час розподілу пацієнтів на досліджувані групи.

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України

№ 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. Батьки пацієнтів були інформовані щодо цілей, організації, методів дослідження та підписали інформовану згоду щодо участі у ньому. Дослідження виконувалося з мінімальними психологічними втратами з боку пацієнтів.

Для проведення статистичної обробки результатів дослідження використовували табличний редактор Microsoft Excel і пакет програм по статистичній обробці даних Statistica for Windows. Для оцінки відмінностей середніх значень між групами пацієнтів використовували параметричні (критерій Стюдента (t-критерій)) та непараметричні (критерій  $\chi^2$  Пірсона) методи оцінки даних.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Онкогематологічні захворювання у дітей характеризуються складністю диференційної діагностики та різноманітністю клінічного перебігу, та вимагають комплексних програм хіміотерапії [11]. Під час раціонального вибору оптимальної схеми цитостатичної терапії у дітей з ГЛЛ необхідно враховувати мультифакторний характер захворювання в межах однієї нозологічної групи. Неконтрольоване розмноження лімфобластних клітин, які утворюються внаслідок активації протоонкогена в клітинах-попередниках гемопоєзу, призводить до росту пухлинного клону та поширення трансформованих клітин по всьому організму [12]. Тому, визначення рівня бластних клітин у КМ має важливе значення для моніторингу онкохворих під час застосування цитостатичної хіміотерапії.

Результати проведених досліджень показали, що у дітей з ГЛЛ, до проведення курсу хіміотерапії, в мієлограмах КМ виявлено  $46 \pm 4,5$  % бластних клітин (рис. 1).

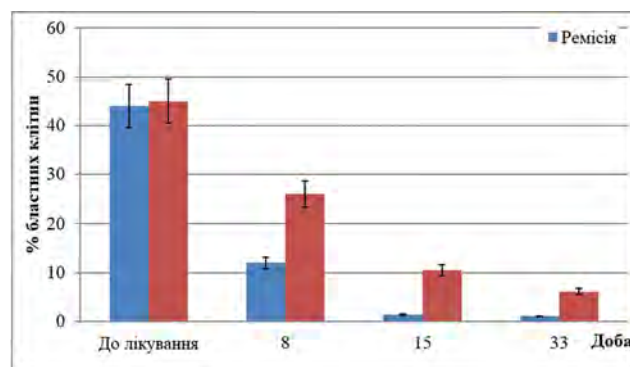


Рис. 1. Рівень бластних клітин у кістковому мозку дітей з гострою лімфобластною лейкемією за умов застосування ALLIC-BFM 2009 терапії

Не виключено, що бластні клітини в КМ містять генетичний дефект, що призводить до порушення клітинного поділу і диференціювання. Такі бластні клітини (анаплазовані бласти) не перетворюються в зрілі функціональні клітини, а інтенсивно проліферують, утворюючи клітини з тим же генетичним дефектом. Проліферація бластних клітин та

витіснення нормального кровотворення обумовлює клінічні прояви лейкемії у дітей [13]. Застосування цитостатичної терапії є досить ефективним, оскільки проявляє цитолітичну дію по відношенню до бластних клітин КМ.

Застосування ALLIC-BFM 2009 терапії показало її ефективність у 88 % дітей, що призводило до повної ремісії. Приблизно у 12 % дітей виявлена часткова резистентність до хіміопрепаратів, що проявлялося рецидивом захворювання (рис. 2).

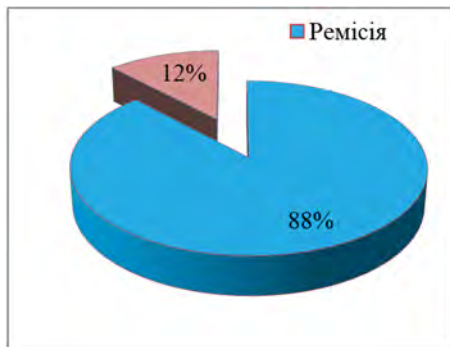


Рис. 2. Розподіл дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію за частотою появи рецидивів

Встановлено, що у пацієнтів з виявленими рецидивами кількість бластних клітин знижувалася в процесі проведення цитостатичної терапії ALLIC-BFM 2009, однак після першого курсу хіміотерапії їхній рівень становив 6 % (рис. 1). Оскільки бластні клітини – це незрілі клітини, які під час дозрівання перетворюються в функціональні клітини крові, то підвищений їхній рівень в КМ, після проведення курсу хіміотерапії, вказує на порушення процесів кровотворення – бластні клітини не дозрівають у функціонально-активні клітини крові [14, 15].

Аналіз зміни кількості бластів у пунктаті КМ в пацієнтів з ремісією показав, що в процесі проведення першого курсу хіміотерапії, виявлено різке зниження кількості бластів. Так, вже на 8-й день хіміотерапії кількість бластів знижувалася у 2,2 рази порівняно з групою пацієнтів, у яких спостерігався рецидив захворювання (рис. 1). Після закінчення курсу цитостатичної терапії рівень бластів в КМ за умов повної ремісії становив  $1,03 \pm 0,212$  %, що свідчить про сприятливий перебіг захворювання та задовільний стан кровотворної тканини. При цьому в периферійній крові виявлено нормальне співвідношення всіх паростків кровотворення, при кількості еритроцитів більше  $3,5 \times 10^{12}/л$ , при кількості тромбоцитів більше  $160 \times 10^9/л$ , при кількості лейкоцитів менше  $10 \times 10^9/л$  та при відсутності екстрамедулярних вогнищ лейкемічного зростання.

Отже, підвищення рівня бластних клітин у КМ свідчить про рецидив захворювання, оскільки активна проліферація бластів відбувається в результаті порушення міжклітинної сигналізації або здатністю клітин уникати апоптичної загибелі, що

і свідчить про резистентність пухлинного клону до дії цитостатиків.

Тому проведення курсу цитостатичної хіміотерапії вимагає ретельного моніторингу адекватної відповіді пацієнта на лікування та оцінки ступеня MRD, який проводять високоточними засобами сканування хворих або методами цитогенетичного, молекулярно біологічного та імунофенотипового аналізу.

Визначення MRD як незалежного критерію оцінки відповіді організму дитини на терапію у групі пацієнтів з повною ремісією показало зниження показника в динаміці проведення хіміотерапії. Мінімальний показник MRD відмічався після закінчення курсу хіміотерапії (33-я доба) (рис. 3).

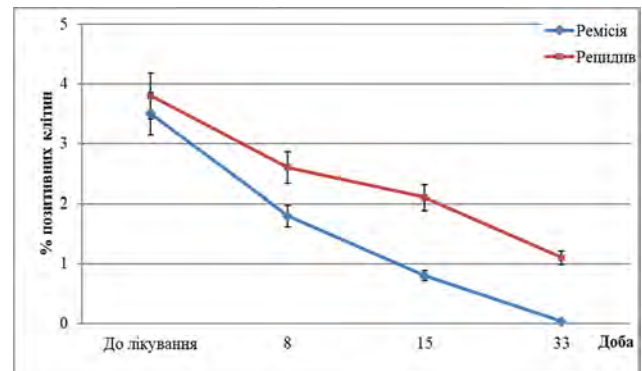


Рис. 3. Моніторинг MRD у дітей з гострою лімфобластною лейкемією під час проведення цитостатичної терапії ALLIC-BFM 2009

Водночас у пацієнтів, у яких в подальшому був виявлений рецидив захворювання, зниження MRD спостерігалось, однак не досягало значень характерних для пацієнтів з ремісією. Оскільки визначення MRD полягає у виявленні залишкових лейкемічних бластів [16], які не розпізнаються морфологічно, то підвищенні його значення відразу після закінчення курсу хіміотерапії свідчать про ризик росту пухлинного клону.

Отже, як показують результати наших досліджень ризик розвитку рецидиву вищий у тих хворих, у яких після завершення цитостатичної терапії рівень MRD складав 1 % і більше, в порівнянні з пацієнтами, чий рівень MRD був менше 1 % – у цієї групи пацієнтів спостерігалася повна ремісія.

Сьогодні виділяють різні підходи до класифікації ГЛЛ, одна з яких (FAB-класифікація) враховує морфологічні типи бластних клітин. Розрізняють три морфологічні типи лімфобластів: L1 – маленькі однорідні бластні клітини, L2 – великі бластні клітини різної будови та L3 – великі вакуолізовані бластні клітини, які лежать в основі класифікації T- та B-лінійних ГЛЛ. Тому, для імунофенотипічної класифікації ГЛЛ та оцінки лінійності лімфобластів у хворих дітей враховували експресію окремих диференційних антигенів на поверхні бластних клітин.



Дослідження антигенної структури лейкемічних клітин у дітей з ГЛЛ показало, що у 90 (85,7%) дітей діагностовано В-лінійну ГЛЛ, а у 15 (14,3 %) – Т-лінійну ГЛЛ (**табл. 1**).

**Таблиця 1** – Розподіл дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію за типом бластних клітин

Вид лейкемії	Кількість випадків до лікування, %	Кількість випадків після лікування, %	
		Рецидив	Ремісія
В-клітинна ГЛЛ	90 (85,7)	12 (11,4)	78 (74,3)
Тільки В-клітинні антигени	65 (61,9)	8 (7,6)	57 (54,3)
В+Т-антигени	6 (5,7)	1 (0,95)	5 (4,7)
В+Му-антигени	19 (18,1)	3 (2,9)	16 (15,2)
Т-клітинна ГЛЛ	15 (14,3)	0	15 (14,3)
Т+Му-антигени	15 (14,3)	0	15 (14,3)

Серед В-лінійної ГЛЛ у 65 (61,9 %) пацієнтів виявлено тільки В-клітинні антигени, у 6 (5,7 %) В+Т-антигени, у 19 (18,1 %) В+Му-антигени. Незалежно від виявленого типу В-клітинної ГЛЛ у переважної більшості пацієнтів спостерігалася ремісія, однак у всіх типах В-лінійної ГЛЛ були виявлені і рецидиви (**табл. 1**). Щодо Т-клітинної ГЛЛ, то цей вид лейкемії спостерігався тільки у 15 (14,3 %) хворих дітей, причому після проведення цитостатичної хіміотерапії у всіх пацієнтів з Т-лінійною ГЛЛ виявлена ремісія (**табл. 1**).

З отриманих результатів видно, що під час вибору тактики лікування та прогнозу хвороби виділення морфологічних типів лімфобластів суттєвої ролі не відіграє. Імунофенотипування бластних клітин після проведення курсу хіміотерапії ALLIC-BFM 2009 може мати важливе значення для виявлення ранніх рецидивів захворювання.

Імунофенотипування бластних клітин полягало в детальному вивченні антигенів на поверхні плазматичної мембрани цих клітин. За допомогою панелі МКАТ на злоскісних клітинах виявляли стадіє-специфічні та лінійно-специфічні антигени, що є основою для визначення функціонального стану клітин, встановлення лінійної належності та визначення стадії зрілості прекурсорів В- та Т-лімфоцитів.

Досліджуючи антигенний склад бластних клітин встановлено, що після проведення ALLIC-BFM 2009 цитостатичної терапії найвищий рівень експресії виявлений для лінійно-незалежних та В-лінійних антигенів бластних клітин. Так, аналіз імунофенотипу лінійно-незалежних лімфобластів показав експресію HLA – 93±8,4 %, Anti-TdT – 91±7,1 %, CD10 – 78±7,2 %, CD38 – 91±7,9 % та CD34 – 57±4,3 % у пацієнтів у період рецидиву (**табл. 2**). Експресія антигенів CD10 та CD38 показала, що вони нерівномірно розподілялися в популяції В-лімфобластів. Відомо, що наявність мар-

кера CD38 не пов'язана з клінічною картиною, що спостерігається при ГЛЛ та не впливає на загальну виживаність хворих. Водночас, для пацієнтів, на клітинах яких визначається експресія CD34 характерне менше виживання [17].

**Таблиця 2** – Гетерогенність експресії антигенів бластних клітин кісткового мозку дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію після проведення цитостатичної терапії

Вид антигена (CD)	Частка бластів (%), на поверхні яких знаходився антиген	
	Рецидив захворювання	Повна ремісія
<i>Лінійно-незалежні антигени</i>		
CD34	57±4,3	21±1,9
HLA	93±8,4	64±5,2
TdT	91±7,1	22,5±2,8
CD10	78±7,2	26±3,1
CD38	91±7,9	90,5±9,4
CD45	28±2,1	89±7,6
<i>В-лінійні антигени</i>		
CD79a	58±6,4	36,5±4,1
CD22	78±8,3	83,5±7,3
CD19	98±9,3	56±4,9
CD58	87±7,6	73±8,4
<i>Мієлоїдні антигени</i>		
CD33	47±5,6	19±2,1
CD13	39±4,3	16±1,3

Аналізуючи імунофенотип бластних клітин, можна встановити стадію їх дозрівання. Відомо, що в ході нормального гемопоезу для кожного етапу дозрівання В-лімфоцитів характерний певний спектр експресії антигенів. На самій ранній стадії (стадія про-В-лімфоцитів) В-попередники експресують CD34 і TdT, спостерігається низька інтенсивність експресії CD10, при цьому відзначається повна відсутність антигену CD20 [18]. По мірі дозрівання клітин відбувається поступова втрата таких маркерів, як CD34 і TdT та CD10 [19]. Саме такі зміни виявлені у пацієнтів з повною ремісією, у яких знижується експресія CD34 до 21±1,9 %, TdT до 22,5±2,8 % та експресія CD10 до 26±3,1 % (**табл. 2**). Виявлений факт вказує, що під час ремісії в КМ відновлюються процеси диференціації та дозрівання бластних клітин.

На наступній стадії гемопоезу поступово з'являється експресія CD20 (у наших дослідженнях антиген CD20 не ідентифікувався), та виражена експресія антигену CD38. У пацієнтів з ремісією експресія CD38 була на рівні 90,5±9,4% (**табл. 2**).

При переході на стадію зрілих В-лімфоцитів відбувається втрата експресії CD10, CD38, збільшується рівень експресії маркера CD22 [20]. У наших дослідженнях такі зміни у хворих з рецидивами та з повною ремісією виявлено незначно,

очевидно через те, що бластні клітини КМ аналізували одразу після закінчення курсу хіміотерапії, коли у пацієнтів з ремісією виявлялася незначна (<5 %) кількість бластів в КМ та відсутність бластів та клітин з паличками Ауера в крові.

Низький рівень експресії CD45 при рецидивах –  $28 \pm 2,1$  % та високий при ремісії  $89 \pm 7,6$  % свідчить про наявність клітин на ранніх та пізніх стадіях дозрівання у досліджуваних групах відповідно, оскільки експресія CD45 спостерігається на самій ранній стадії диференціювання і збільшується в міру дозрівання клітин.

Серед В-лінійних антигенів висока експресія виявлена для антигена CD19 –  $98 \pm 9,3$  %, а також для антигенів: CD22 –  $78 \pm 8,3$  %, CD58 –  $87 \pm 7,6$  %. Нижчий рівень експресії спостерігався для CD79a –  $58 \pm 6,4$  (табл. 2).

Експресований CD19 на мембранах бластів у пацієнтів з рецидивами може стати мішенню для терапії пухлин лімфоїдного походження через його високий рівень експресії, що варто враховувати при виборі подальшої тактики лікування [16, 21].

Оскільки, такі маркери, як CD19, CD79a і HLA-DR, позитивні протягом усіх етапів диференціювання В-лімфоцитів [22], то вони зустрічаються у пацієнтів як з рецидивами, так і ремісією (табл. 2)

Отже, в результаті роботи встановлено, що у пацієнтів з рецидивом захворювання зустрічаються імунофенотипові аберації, не властиві нормальним гемопоетичним клітинам. Асинхронна експресія маркерів диференціювання спостерігається в більшості дітей з рецидивом ГЛЛ (табл. 2), що необхідно враховувати при моніторингу хворих під час та після проведення цитостатичної хіміотерапії.

Дослідження експресії антигенів, характерних для Т-клітинної ГЛЛ показало їхню відсутність як у пацієнтів з рецидивами, так і у пацієнтів з ремісією. Водночас, у пацієнтів з рецидивом була виявлена експресія мієлоїдних антигенів – CD33 ( $47 \pm 5,6$  %) та CD13 ( $39 \pm 4,3$ %) (табл. 2).

Наявність експресії антигену CD13 була виявлена в 15 (14,3 %) хворих дітей. Експресія, антигену CD33 спостерігалася у 2 (1,9 %) хворих дітей до проведення курсу хіміотерапії. Після застосування ALLIC-BFM 2009 цитостатичної терапії у 14 (13,3 %) та у 1 (0,95 %) дітей з ремісією експресувалися антигени CD13 та CD33 відповідно. У пацієнтів з рецидивами експресія CD13 та CD33 (рис. 4).

Експресія мієлоїдних маркерів CD33 та CD13 при лімфобластних лейкозах може бути пов'язана з тим, що бластні клітини відповідають раннім тим-цитам, однак їх не можна враховувати як діагнос-

тичні маркери виявлення ранніх рецидивів. Встановлено, що більш тривале виживання хворих на ГЛЛ співвідноситься з експресією на бластних клітинах CD33 [22, 23].

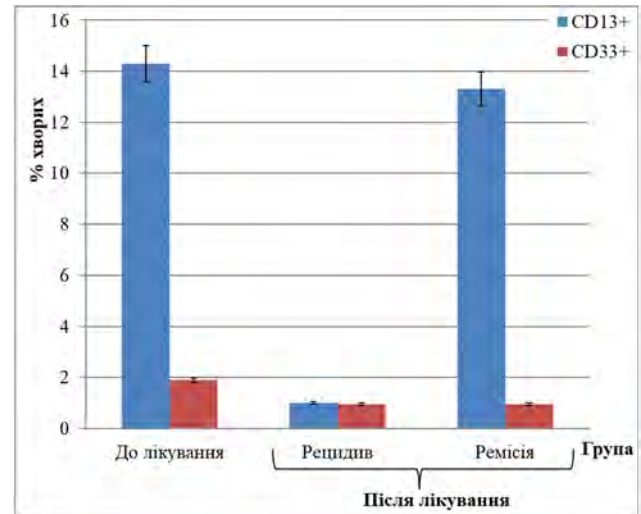


Рис. 4. Розподіл пацієнтів з гострою лімфобластною лейкозею за наявністю мієлоїдних антигенів у клітинах кісткового мозку

**Висновки.** Аналіз імунофенотипу бластних клітин КМ, з використанням МКАТ, допомагає визначити форму ГЛЛ, що дозволяє спрогнозувати перебіг захворювання. Наявність MRD є незалежним несприятливим прогностичним фактором розвитку рецидиву, що необхідно враховувати під час застосування комплексної цитостатичної терапії.

Виявленні зміни параметрів експресії мембранних антигенів відображають процеси, що відбуваються всередині клітини. Це дає можливість припустити, що популяція В-лімфоїдних пухлинних клітин у пацієнтів з рецидивами неоднорідна, існують субпопуляції з різними фізичними та функціональними характеристиками, з різним ступенем сприйнятливості та резистентності до проведеної терапії.

В ході антилейкемічного лікування відбувається зниження показників середньої інтенсивності флуоресценції лейкоз асоційованих антигенів, що слід враховувати під час проведення моніторингу MRD: застосовувати комбінації антигенів, враховувати інтенсивність флуоресценції маркерів, контролювати популяції з нестандартним фенотипом.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші дослідження щодо встановлення взаємозв'язку між цитогенетичними та молекулярно-генетичними ознаками пухлинного клону дадуть можливість визначити ступінь злоскісності процесу, та модифікувати програми лікування.

## References

1. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med.* 2015 Oct 15; 373(16): 1541-52. doi: 10.1056/NEJMra1400972

2. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 2017 Nov 16; 60(1): 4-12. doi: 10.1111/ped.13457
3. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2017 Mar 20; 35(9): 975-983. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7836
4. Loghavi S, Kutok JL, Jorgensen JL. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2015 Jan 05; 144(3): 393-410. doi: 10.1309/AJCPAN7BH5DNYWZB
5. Chiu H, Trisal P, Bjorklund C, Carrancio S, Toraño EG, Guarinos C, et al. Combination lenalidomide-rituximab immunotherapy activates anti-tumour immunity and induces tumour cell death by complementary mechanisms of action in follicular lymphoma. *Br J Haematol*. 2019 Feb 14; 185(2): 240-253. doi: 10.1111/bjh.15797
6. Glowala-Kosińska M, Chwieduk A, Nieckula J, Saduś-Wojciechowska M, Grosicki S, Rusin A, et al. Association of circulating regulatory T cell number with the incidence and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2013 May 17; 91(2): 122-8. doi: 10.1111/ejh.12144
7. Leahy AB, Elgarten CW, Grupp SA, Maude SL, Teachey DT. Tisagenlecleucel for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018 Sept 05; 18(10): 959-971. doi: 10.1080/14737140.2018.1512411
8. Gökbuget N, Dombret H, Bonifacio M, Reichle A, Graux C, Faul C, et al. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018 Apr 05; 131(14): 1522-1531. doi: 10.1182/blood-2017-08-798322
9. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Jan 19; 129(3): 347-357. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307
10. Glier H, Novakova M, Te Marvelde J, Bijkerk A, Morf D, Thurner D, et al. Comments on EuroFlow standard operating procedures for instrument setup and compensation for BD FACS Canto II, Navios and BD FACS Lyric instruments. *J Immunol Methods*. 2019 Dec; 475: 112680. doi: 10.1016/j.jim.2019.112680
11. Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec 02; 2016(1): 580-588. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.580
12. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016 May 27; 35: 48. doi: 10.1186/s40880-016-0108-0
13. Stein AS, Kantarjian H, Gökbuget N, Bargou R, Litzow MR, Rambaldi A, et al. Blinatumomab for acute lymphoblastic leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Apr 16; 25(8): 1498-1504. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.04.010
14. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, et al. Fixed duration of venetoclax-rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia eradicates minimal residual disease and prolongs survival: post-treatment follow-up of the MURANO phase III study. *J Clin Oncol*. 2019 Feb 01; 37(4): 269-277. doi: 10.1200/JCO.18.01580
15. Czyz A, Nagler A. The role of measurable residual disease (MRD) in hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies focusing on acute leukemia. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 28; 20(21): 5362. doi: 10.3390/ijms20215362
16. Pillai V, Muralidharan K, Meng W, Bagashev A, Oldridge DA, Rosenthal J, et al. CAR T-cell therapy is effective for CD19-dim B-lymphoblastic leukemia but is impacted by prior blinatumomab therapy. *Blood Adv*. 2019 Nov 18; 3(22): 3539-3549. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000692
17. Gritsova LY. Evaluation of minimal residual disease in b-lineage acute lymphoblastic leukemia using euroflow approaches. *Clinical oncohematology*. 2017 Jan 29; 10(2): 158-168.
18. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(12): a008250. doi: 10.1101/cshperspect.a008250
19. Zevedo Portilho N, Pelajo-Machado M. Mechanism of hematopoiesis and vasculogenesis in mouse placenta. *Placenta*. 2018 Sept; 69: 140-145. doi: 10.1016/j.placenta.2018.04.007
20. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity*. 2016 Feb 24; 44(3): 439-449. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.024
21. Ying Z, Huang XF, Xiang X, Liu Y, Kang X, Song Y, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med*. 2019 Apr 22; 25(6): 947-953. doi: 10.1038/s41591-019-0421-7
22. Katz BZ, Herishanu Y. Therapeutic targeting of CD19 in hematological malignancies: past, present, future and beyond. *Leuk Lymphoma*. 2013 Sept 03; 55(5): 999-1006. doi: 10.3109/10428194.2013.828354
23. Gorczyca W, Sun ZY, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic pattern of myeloid populations by flow cytometry analysis. *Methods Cell Biol*. 2011; 103: 221-66. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00010-3

УДК 616. 155.392-036.11

**ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК КАК МАРКЕР ДИАГНОСТИКИ РЕЦИДИВА ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ****Винницкая Е. А., Дорош О. И., Дубей Л. Я., Дубей Н. В.**

**Резюме.** В работе исследовано иммунофенотипирование лейкозных клеток, проведен мониторинг минимальной остаточной болезни у детей с острой лимфобластной лейкемией в условиях развития рецидивов и полной ремиссии после применения ALLIC-BFM 2009 цитостатической терапии.

**Целью** работы было определение особенностей иммунофенотипа бластных клеток костного мозга детей с острой лимфобластной лейкемией, и оценка его прогностического значения в развитии рецидивов.

Терапию цитостатиками проводили по программе международной группы BFM – ALLIC-BFM 2009, утвержденной МОЗ Украины как отраслевой стандарт.

После завершения курса химиотерапии пациентов разделили на 2 группы: I группа – пациенты, у которых наблюдался рецидив заболевания; II группа – пациенты, у которых после завершения курса химиотерапии обнаружена полная ремиссия.

Установлено, что после получения лечения на основе протокола ALLIC-BFM 2009 в 88% детей выявлена полная ремиссия, тогда как в 12% наблюдались рецидивы.

У пациентов с диагностированными рецидивами, в костном мозге оказывалось более 6% бластных клеток. При этом, мониторинг больных с острой лимфобластной лейкемией показало, что у пациентов с рецидивом заболевания после окончания базисного лечения наблюдается повышение уровня минимальной остаточной болезни более 1%.

Имунофенотипирование бластных клеток у пациентов с рецидивом показало экспрессию линейно-независимых антигенов HLA – 93%, Anti-TdT – 91%, CD10 – 78%, CD38 – 91% и CD34 – 57% и B-линейных антигенов – CD19, CD22, CD58, CD79a, среди которых самая высокая экспрессия обнаружена для антигена CD19. У пациентов с полной ремиссией снижается экспрессия CD34 до 21±1,9%, TdT до 22,5±2,8%, и экспрессия CD10 до 26±3,1%, что указывает на восстановление процессов дифференциации и созревания бластных клеток.

Установлен низкий уровень экспрессии CD45 – 28% при рецидивах острой лимфобластной лейкемии и высокий – 89% при полной ремиссии заболевания. Экспрессия антигенов, характерных для T-клеточной острой лимфобластной лейкемии в костном мозге пациентов с острой лимфобластной лейкемией как в период рецидива, так и ремиссии не выявлено. В то же время, у пациентов с острой лимфобластной лейкемией в период рецидива отмечена на высоком уровне экспрессия миелоидных антигенов – 47% CD33 и 39% CD13, тогда как у пациентов в период ремиссии эти показатели были на уровне 19% CD33 и 16% CD13.

**Ключевые слова:** иммунофенотип, бластные клетки, антигены, минимальная остаточная болезнь, острая лимфобластная лейкемия у детей.

UDC 616. 155.392-036.11

**Immunophenotypic Profile of Blast Cells as a Marker for Diagnosis of Relapsed Children Acute Lymphoblastic Leukemia****Vynnytska O. A., Dorosh O. I., Dubey L. Ya., Dubey N. V.**

**Abstract.** Immunophenotyping of leukemia cells was studied in this work; minimal residual disease was monitored among children with acute lymphoblastic leukemia under conditions of relapse and complete remission after the application of ALLIC-BFM 2009 cytostatic therapy.

The study showed that after application of ALLIC-BFM 2009 therapy, 88% of children had complete remission, and 12% had relapses. Among patients with relapses, the number of blast cells in the bone marrow was at a high level (more than 6%). Monitoring of patients during therapy established an increase in the minimal residual disease level of more than 1% after treatment in patients with recurrent disease.

Immunophenotyping of blast cells among patients with relapse showed the expression of linear independent antigens HLA (93%), Anti-TdT (91%), CD10 (78%), CD38 (91%) and CD34 (57%) and B-linear antigens: CD19, CD22, CD58, CD79a, the highest expression was found for the CD19 antigen. A low level of expression of CD45 (28%) was recorded with relapses of acute lymphoblastic leukemia and high (89%) level was with complete remission of the disease. We did not detect expression of antigens characteristic of T-cell acute lymphoblastic leukemia in bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia, both with relapses and with remission. At the same time, the expression of myeloid antigens (CD33 and CD13) was noted among acute lymphoblastic leukemia patients.



Among patients, the incidence of acute lymphoblastic leukemia was the most pronounced in children aged from 3 to 6 years – 37 patients (35.2%) and aged from 6 to 9 years – 26 (24.8%) patients. The highest incidence was found among patients with chromosomal translocation TEL / AML – 22 (21%) patients with a median age 5 years. In second place, the frequency of mutations is the translocation of E2A / PBX1. BCR / ABL translocation was less common. It was noted in 1.9% of patients, but the expression of this gene indicated a bad course of the disease, as patients after cytostatic therapy under the ALLIC BFM 2009 program had a recurrence. Recurrence was also observed in patients with TEL/AML chromosomal translocation.

Determination of minimal residual disease showed its increased level in patients with chromosomal aberrations BCR / ABL and TEL/AML throughout the treatment phase. In addition, patients in these groups were diagnosed with initial leukocytosis followed by leukopenia after a course of chemotherapy. Patients of all groups showed a decrease in hemoglobin.

The biggest changes in clinical and laboratory parameters were found between patients with chromosomal translocations BCR/ABL and TEL/AML, as evidenced by the development of relapses in patients of these groups. The low level of association between karyotype disorders, with the formation of AF4/MLL and E2A/PBX1, and clinical and laboratory parameters in patients with acute lymphoblastic leukemia may indicate that the isolated clonal disorders are independent prognostic factors for the course of the disease.

**Keywords:** immunophenotype, blast cells, antigens, minimal residual disease, childhood acute lymphoblastic leukemia.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 18.12.2020 р.

*Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*