УДК 616.4:616.1:616-006

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ И ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ СРЕДИ БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

Баратова Д.А.[1,2], Маматысаева У.А.[2,3]

[1]АНМНО «Евразийский центр онкогематологии, иммунологии и терапии», Санкт-Петербург, e-mail: baratova@list.ru;
[2]АНО «Национальный регистр гемопоэтических стволовых клеток Киргизии», Санкт- Петербург;
[3]ГУ «Национальный центр онкологии и гематологии», Бишкек

В статье представлены результаты исследований иммунофенотипирования (ИФТ) с помощью метода проточной цитофлуориметрии и частоты выявляемости среди больных детей острых лимфобластных лейкозов: В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) и Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома). По частоте распространенности в Кыргызской Республике (Киргизии) среди больных детей выявляется В-ОЛЛ/лимфома в 83% случаев, для сравнения: Т-ОЛЛ/лимфома в 17% случаев. При дифференциальной диагностике выявляются чаще варианты иммунофенотипа В-common (BII) в 91% случаев и пре Т-ОЛЛ(TII) в 69% случаев. Среди больных детей кыргызской национальности выявлены в 11% случаев Т-ОЛЛ/лимфома и в 63% случаев В-ОЛЛ/лимфома, а среди больных детей жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики в 6% случаев Т-ОЛЛ/лимфома и в 20% случаев В-ОЛЛ/лимфома. По частоте выявляемости более распространенный В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/ лимфома): и среди больных детей женского пола в 88% случаев, и среди больных детей мужского пола в 80% случаев. В сравнении преобладает среди мужского пола Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома) в 20% случаев, а у детей женского пола несколько реже - в 12% случаев. В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) выявляется чаще среди больных детей мужского пола кыргызской национальности - в 67% случаев, а среди больных детей жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики в 94% случаев. Встречается Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома) чаще среди больных детей мужского пола кыргызской национальности в 87% случаев, а среди больных детей мужского пола жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики - в 88% случаев. Проведенные исследования методом проточной цитофлуориметрии позволяют определить вариант линейности иммунофенотипа и при правильной постановке диагноза и своевременно подобранной ПХТ-терапии, и при наличии HLA-идентичного здорового донора или плацентарной крови, провести близкородственную, неродственную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: иммунофенотипирование, проточная цитофлуориметрия, острый лимфобластный лейкоз у детей, кыргызская национальность.

DIAGNOSTIC INDICATORS OF IMMUNOPHENOTYPING AND FREQUENCY THE PREVALENCE AMONG PATIENTS CHILDREN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Baratova D.A.[1,2], Mamatysaeva U.A.[2,3]

[1]ANMSO "Eurasian Center of Oncohematology, Immunology and Therapy", Saint-Petersburg, e-mail: baratova@list.ru;
[2] ANO "National register of hematopoietic stem cells Kirgizia", Saint-Petersburg;
[3]SI"National Center of Oncology and Hematology" at the Ministry of Health KR, Bishkek

The article presents the results of immunophenotyping studies (IPT) by dint of method of flowing cytofluorimetry on frequency the detection in patients of children acute lymphoblastic leukemia (B-ALL/lymphoma) and (T-ALL/ lymphoma). In the Kyrgyz Republic (Kirgizia). B-ALL/lymphoma is detected in 83% of cases, compared with T-ALL/ lymphoma in 17% of cases. In differential diagnosis more often elicitation variants of the immunophenotype B-common (BII) in 91% of cases and pre-TALL(TII) in 69% of cases. Detection among patients children kirgiz nationality in 11% of cases of T-ALL and 63% cases of B-ALL and in 6% cases of T-ALL residents of the Russian-speaking population of the Kyrgyz Republic and in 20% of cases B-ALL. The frequency of detectability is more common B-ALL, and among female in 88% of cases, male in 80% of cases. In comparison, T-ALL predominates among males in 20% of cases, and female it is somewhat less frequent in 12% of cases. B-ALL is detected more often among male of kirgiz nationality in 67% of cases, and of residents Russian-speaking population of the Kyrgyz Republic in 94% of cases. T-ALL is more detected in male of kirgiz nationality in 87% of cases, and of residents of the Russian-speaking population of the Kyrgyz Republic in 88% of cases. The conduct immunophenotyping study by dint of the method of flow cytofluorimetry make it possible to determine the variant

of the immunophenotype linearity and, when correctly diagnosed and timely select polychemotherapy, and if there is an HLA-identical healthy donor or placental blood, spend transplant a closely related, unrelated bone marrow.
Keywords: immunophenotyping, flow cytofluorimetry, acute limfoblactic leukemi in children's, kirgiz nationality.

На сегодняшний день заболевание острый лейкоз волнует всех, встречается и в развивающихся, и в развитых странах и выявляется у людей всех рас, как среди взрослого населения, так и среди детей.

Острый лейкоз – это острое злокачественное заболевание системы крови, с поражением на уровне детерминированных родоначальных - стволовых клеток или ранних клеточных предшественников, характеризующимся наличием опухолевых (бластных) клеток в костномозговом пунктате или в периферической крови от 20% и более.

Как отмечают авторы [1], при постановке диагноза «острый лейкоз» цитогенетические, цитохимические, морфологические исследования остаются мощным инструментом в клинической практике, но для подробного изучения клеток костного мозга метод проточной цитофлуометрии и при правильном сборе материала имеет, несомненно, большие преимущества.

В обосновании иммунофенотипического диагноза при острых лейкозах с помощью метода проточной цитофлуориметрии необходимо оценить особенности иммунофенотипических характеристик опухолевых клеток и определить вариант направленности Т и В, и исключить миелоидную и редкие варианты неясной линейности.

При В-лимфобластном лейкозе к В-клеточным маркерам относят CD19, CD79a, (cyCD79a), CD22(cyCD22), CD10,CD20. Фенотипы CD19+CD10+ при остром В-лимфобластном лейкозе являются наиболее распространенными.

При острых лимфобластных лейкозах (Т-лимфобластный лейкоз/лимфома) опухолевые клетки имеют фенотип, сходный с Т-линейными предшественниками. К ранним маркерам при Т-ОЛЛ относятся CD 99,CD34, CD1a, терминальная дезоксинуклеотидил трансфераза (TdT), cyCD3, CD7.

При диагностике необходимо в первую очередь оценить цитоплазматическую экспрессию CD_3, который является единственным линейно-специфическим антигеном Т-линии.

Для определения линейной принадлежности опухолевых клеток применяются наборы антител, по рекомендации консорциума Еврофлоу [2], Европейской сети лейкемии [3], а также используются для дифференциальной диагностики классификации Европейской группы иммунологической характеристики острых лейкозов (EGIL) [4] и Всемирной организации здравоохранения (WHO) [5].

Однако нам, клиницистам, после постановки диагноза и определения варианта клеточной линейности необходимо сделать правильный подбор терапии (ПХТ).

Для целенаправленного лечения при онкогематологических заболеваниях у больных детей и у взрослых и для достижения хорошего результата от проведенной полихимиотерапии необходимо проводить иммунофенотипирование по системе HLA - главного комплекса гистосовместимости. Проведение близкородственной, неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток позволяется при наличии HLA – идентичного здорового донора или плацентарной крови [6].

На сегодняшний день трансплантация костного мозга дает лучшие результаты для увеличения выживаемости при лечении онкогематологических заболеваний.

Целью нашего исследования является определить частоту распространенности и провести ранний диагностический анализ иммунофенотипа опухолевой клеточной линейности при острых лимфобластных лейкозах у больных детей в Кыргызской Республике (Киргизии).

Материал и методы исследования

В группу исследования с ноября 2016 года по декабрь 2018 года вошли с острым лимфобластным лейкозом - 70 пациентов-детей (женского пола - 25, мужского пола - 45), все граждане Кыргызской Республики (Киргизии), в возрасте от 1,5 года до 16 лет, из них 52 кыргызской национальности и жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) - 18 пациентов-детей (женского пола - 3, мужского пола - 15), проходившие обследование в отделении детской онкологии Национального центра онкологии и гематологии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики и в отделении детской гематологии Ошской межобластной клинической детской больницы г. Ош; в г. Санкт-Петербург на базе Евразийского центра онкогематологии, иммунологии и терапии больные консультированы врачами-гематологами. Иммунофенотипирование с помощью проточной цитофлуориметрии проводилось в г. Бишкек, Кыргызская Республика (Киргизия) [1].

Иммунофенотипирование с помощью метода проточной цитофлуориметрии

Материалом для исследования был костный мозг. Больным произведена пункция грудины. При получении материала необходимо соблюдать технику сбора. И для информативного, качественного результата пункционный анализ не должен быть с примесью крови и механически в пробирках с ЭДТА не разрушать клетки во время пробоподготовки к иммунофенотипированию. Иммунофенотипирование лейкозных (бластных) клеток проводят на проточном цитофлуометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител Beckman Coulter.

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя анализ

стандартных критериев. χ2 -квадрат использовали для оценки достоверности различий по встречаемости определенных признаков между исследуемой группой. Определение величины «р», соответствующей найденному значению χ2–квадрат, велось на компьютерной программе с учетом одной степени свободы. Все математические расчеты и общий статистический анализ полученных исследований проводили с помощью персонального компьютера с использованием пакета прикладных программ для электронных таблиц Microsoft - Excel^{M} Версия 7,0 для Windows 95, для Windows 2010, Statistica 5.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении нами исследований диагноз «острый лимфобластный лейкоз» устанавливался на основании общих клинических данных и комплексных лабораторно-диагностических показателей. Диагностирование иммунофенотипированием с помощью метода проточной цитофлуориметрии даёт возможность определить вариант Т- и В-линейной направленности.

Сравнительная характеристика частоты встречаемости варианта иммунофенотипа при В-лимфобластном лейкозе/лимфоме (В-ОЛЛ) и Т-лимфобластном лейкозе/лимфоме (Т-ОЛЛ) в Кыргызской Республике (Киргизии) (по классификации Европейской группы иммунологической характеристики острых лейкозов) [4]

В-ОЛЛ п=58		Т-ОЛЛ п=12	
pro В-ОЛЛ(BI)	5%	pro Т-ОЛЛ(TI)	0%
B-common (BII)*	91%	pre Т-ОЛЛ(TII)*	67%
pre В-ОЛЛ(BIII)	0%	кортикальный (TIII)	25%
В-ОЛЛ(BIV)	4%	Т-ОЛЛ(TIV)	8%

Примечание:*р< 0,001.

Как видно из представленной таблицы, в Кыргызской Республике (Киргизии) по частоте распространенности выявляется В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ): про В-ОЛЛ (BI) в 5% случаев, B-common (BII) в 91% случаев, пре В-ОЛЛ (BIII) в 0% случаев, В-ОЛЛ (BIV) в 4% случаев и Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ): про Т-ОЛЛ (TI) в 0% случаев, пре Т-ОЛЛ (TII) в 67% случаев, кортикальный (TIII) в 25% случаев, Т-ОЛЛ (TIV) в 8% случаев.

По значимости отличий между встречаемостью В-лимфобластного лейкоза/лимфомы (В-ОЛЛ): B-common (BII), пре В-ОЛЛ (BIII) и Т-лимфобластного лейкоза/лимфомы (Т-ОЛЛ): про Т-ОЛЛ (TI), пре Т-ОЛЛ (TII), и имеются статистически высоко достоверные различия, где

p< 0,001.

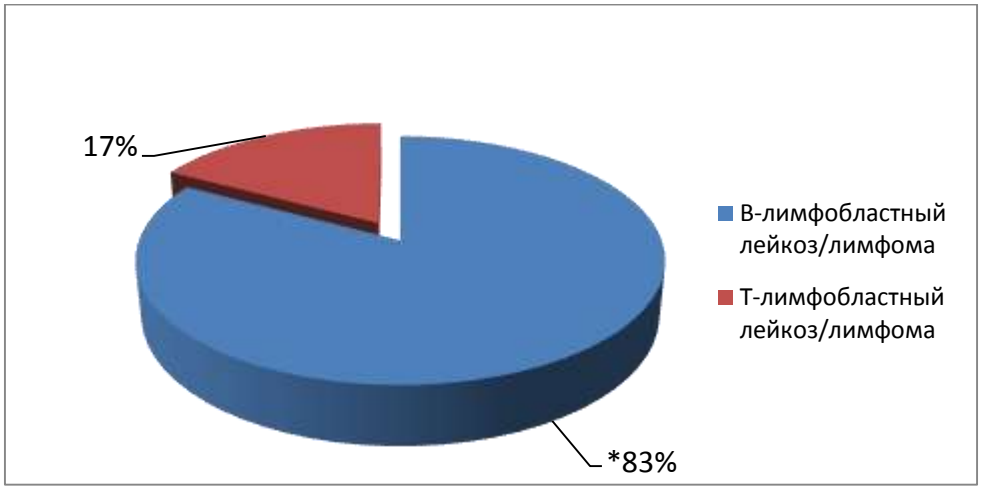

*Рис. 1. Частота распространенности в Кыргызской Республике (Киргизии) среди больных детей острых лимфобластных лейкозов: В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/ лимфома), Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома), *p<0,0001*

Как видно из представленного рисунка 1, при сравнительной характеристике частоты распространенности острых лимфобластных лейкозов в Кыргызской Республике (Киргизии) среди больных детей в 83% случаев выявляется В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) и в 17% случаев Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома).

По значимости отличий в Кыргызской Республике распространен В-лимфобластный лейкоз/лимфома по сравнению с контрольной группой (Т-лимфобластным лейкозом/ лимфомой) и имеет статистически достоверные различия, где *p<0,0001.

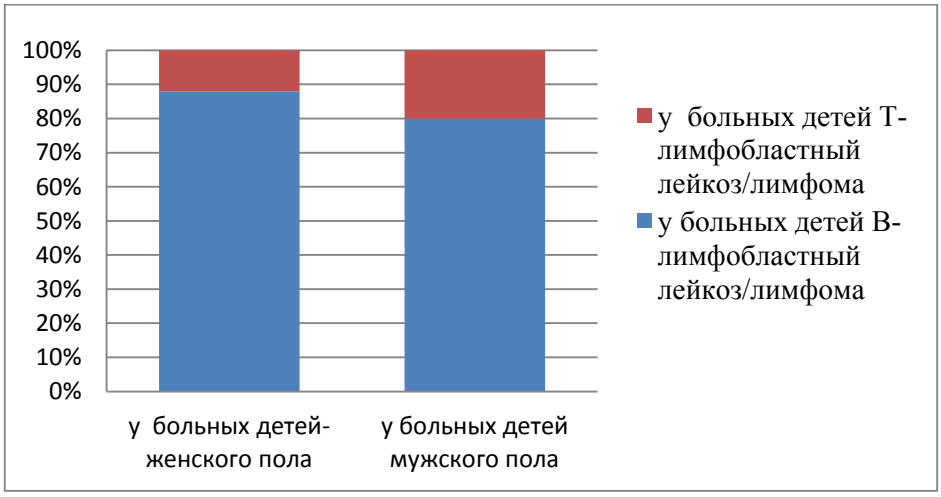

Рис. 2. Распространенность в Кыргызской Республике (Киргизии) острых лимфобластных лейкозов (В-лимфобластный лейкоз/лимфома и Т-лимфобластный лейкоз/лимфома) среди больных детей женского и мужского пола

По данным из представленного рисунка 2, в Кыргызской Республике (Киргизии) острый В-лимфобластный лейкоз/лимфома выявляется несколько чаще и среди женского и мужского пола по сравнению с острым Т-лимфобластным лейкозом/лимфомой. По распространенности выявляется среди детей женского пола в 12% случаев Т-лимфобластный лейкоз/лимфома и в 88% случаев В-лимфобластный лейкоз/лимфома, а у детей мужского пола Т-лимфобластный лейкоз/лимфома в 20% случаев и В-лимфобластный лейкоз/лимфома в 80% случаев.

По значимости отличий чаще выявляется у больных детей женского и мужского пола острый В-лимфобластный лейкоз/лимфома по сравнению с контрольной группой (острым Т-лимфобластным лейкозом/лимфомой) и имеет статистически достоверные различия, где $p<0,0001$.

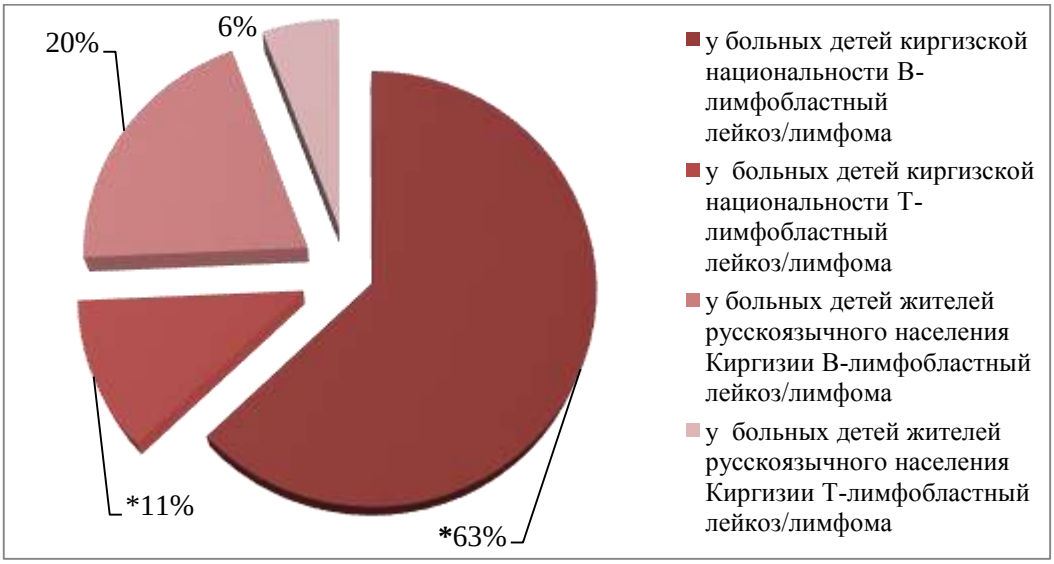

*Рис. 3. Сравнительная характеристика частоты распространенности В-лимфобластного лейкоза/лимфомы (В-ОЛЛ/лимфома) и Т-лимфобластного лейкоза/лимфомы (Т-ОЛЛ/ лимфома) среди детей кыргызской национальности и жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии), *p<0,005*

Как видно из представленного рисунка 3, выявляется Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/ лимфома) среди больных детей кыргызской национальности в 11% случаев и В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) в 63% случаев, а среди больных детей жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) выявляется в 6% случаев Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома) и В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) в 20% случаев.

По значимости отличий острый В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) и острый Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома) чаще преобладают среди больных детей кыргызской национальности по сравнению с контрольной группой и имеют

статистически достоверные различия, где p<0,005.

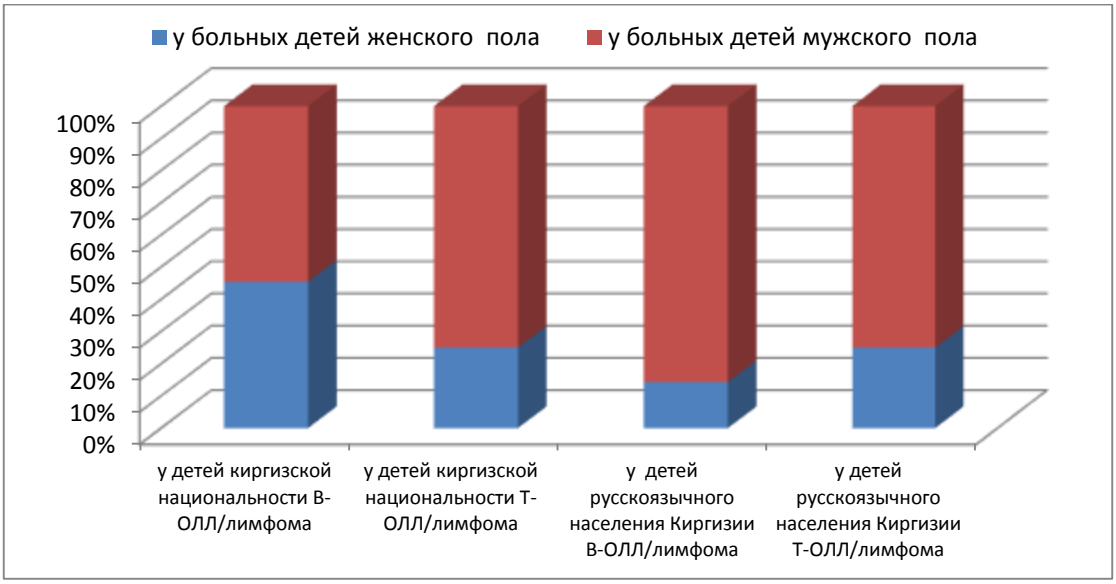

Рис. 4. Частота распространенности острых лимфобластных лейкозов среди больных детей женского и мужского пола кыргызской национальности и жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии)

По результатам из представленного рисунка 4, среди больных детей кыргызской национальности женского пола выявляется В-ОЛЛ/лимфома в 33% случаев и среди мужского пола в 67% случаев и Т-ОЛЛ/лимфома среди женского пола в 13% случаев и среди мужского пола в 87% случаев.

В сравнении: у больных детей женского пола жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) выявляется В-ОЛЛ/лимфома в 6% случаев и среди мужского пола в 94% случаев и Т-ОЛЛ/лимфома среди женского пола в 12% случаев и среди мужского пола в 88% случаев.

По значимости отличий В-лимфобластный лейкоз/лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) и Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома) выявляются чаще среди больных детей мужского пола кыргызской национальности и жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) по сравнению с контрольной группой (больных детей женского пола кыргызской национальности и жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии), и имеются статистически достоверные различия p< 0,0001.

Заключение

Таким образом, при острых лимфобластных лейкозах (В-лимфобластный лейкоз/лимфома и Т-лимфобластный лейкоз/лимфома) основная роль иммунофенотипирования с помощью метода проточной цитофлуориметрии - выявить вариант Т- и В-линейной направленности опухолевых (бластных) клеток.

По данным наших результатов, в Кыргызской Республике (Киргизии) среди больных детей из острых лимфобластных лейкозов чаще выявляется В-лимфобластный лейкоз/лимфома по сравнению с Т-лимфобластным лейкозом/лимфомой. Выявляется В-лимфобластный лейкоз/ лимфома (В-ОЛЛ/лимфома) и Т-лимфобластный лейкоз/лимфома (Т-ОЛЛ/лимфома) среди детей и женского и мужского пола. По частоте распространенности В-ОЛЛ/лимфома и Т-ОЛЛ/лимфома выявляется реже среди больных детей женского пола кыргызской национальности, так и среди больных детей жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии).

Для выявления особенностей течения и частоты распространенности острых лейкозов у детей в Кыргызской Республике (Киргизии) необходимо дальнейшее исследование, что даст возможность для своевременной постановки диагноза и варианта линейности, подбора терапии и целенаправленного лечения при планировании неродственной, близкородственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

На сегодняшний день пересадка гемопоэтических стволовых клеток при острый лимфобластных лейкозах дает наилучшие результаты, в частности у детей.

Выводы

1. Необходимо исследовать костный мозг у больных детей при острых лимфобластных лейкозах с помощью метода проточной цитофлуометрии.
2. Скрининговое исследование опухолевых (бластных) клеток для определения линейной направленности.
3. Выявить иммунологический вариант при остром лимфобластном лейкозе.
4. Иммунофенотипирование с помощью метода проточной цитофлуориметрии дает возможность своевременно выявить характерный иммунофенотип опухолевой (бластной) клетки и подобрать эффективную программу химиотерапии.

Список литературы

1. Baratova D.A., Mamatysaeva U.A. Diagnosis immunophenotype at patients children with acuteleukemia by dint of methods flow cytofluorimetry. International journal of applied and fundamental research. 2018. № 6. [Электронный ресурс]. URL http://www.science-sd.com/478 (дата обращения: 30.05.2019).
2. Van Dongen J.M., Lhermitte I., Bottcher S. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes.14th EHA Congress. Berlin. 2009. P. 10-155.
3. Dohner H., Estey E., Grimwade D. Diagnosis and management of AML in adults:2017 ELN

recommendations from an international expert panel. Blood. 2017. vol. 129. P. 421-447.

4. Bene M.C., Gastoldi G., Knapp W. Proposals for the immunological classification of acute leukemia European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL)Leukemia 1995. vol. 9. P. 1783 -1786.

5. Swerdlow S.H., Compo E., Harris N. World Health Organization(WHO)Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.International Agency for Research on cancer. 2017. P. 1-100.

6. Баратова Д.А. Исследование пуповинной крови на цитомегаловирусную инфекцию и наличие вируса Эпштейна-Барр методом ПЦР // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: материалы IV международной конференции, посвященной 85летию Санкт-Петербургского института имени Пастера и 120 летию Парижского института Пастера (Санкт- Петербург, 2- 4 июня 2008 г.). СПб.: Издательство ООО «Литография», 2008. С. 76.