

СТАТЬИ

УДК 616.4:616.1:616-006

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ И ЧАСТОТА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ У БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

^{1,2}Баратова Д.А., ^{2,3}Маматысаева У.А., ^{2,3}Мадемилова Ч.М.

¹АНМНО «Евразийский центр онкогематологии, иммунологии и терапии», Санкт-Петербург, e-mail: baratova@list.ru;

²АНО «Национальный регистр гемопоэтических стволовых клеток Киргизии», Санкт-Петербург;

³ГУ «Национальный центр онкологии и гематологии» Министерства здравоохранения, Бишкек

В статье представлены результаты исследований иммунотипирования (ИФТ) с помощью метода проточной цитофлуориметрии и определена частота выявляемости среди больных детей острого миелоидного лейкоза. Диагноз острый миелобластный лейкоз может быть установлен при наличии иммунофенотипа миелопероксидазы (МРО) и в случае отсутствия, а бластные клетки экспрессируют другие, менее специфичные миелоидные маркеры и исключен вариант острого лимфобластного лейкоза. При ИФТ методом проточной цитофлуориметрии, острый миелоидный лейкоз выявляется во всех детских возрастах, но при нашем наблюдении в возрастах от 12 лет до 12 лет 11 месяцев и от 16 лет – 16 лет 11 месяцев не выявлено ни среди женского, ни среди мужского пола – 0% случаев. Выявлено, в Кыргызской Республике среди больных детей наиболее распространенные варианты лейкозов: острый миелобластный лейкоз (М2) в 53% случаев и острый миеломонобластный лейкоз (М4) в 20% случаев и реже выявляется острый миелобластный лейкоз (М1) в 10% случаев, острый промиелоцитарный лейкоз (М3) в 10% и острый монобластный лейкоз (М5а, М5b) в 7% случаев. Выявляется острый миелоидный лейкоз среди больных детей женского пола киргизской национальности в 78% случаев, среди мужского пола в 83% случаев, и у больных детей женского пола среди жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики в 22% случаев, мужского пола в 17% случаев. Чаще обнаруживается у больных детей киргизской национальности острый миелобластный лейкоз (М2) в 69% случаев, острый промиелобластный лейкоз (М3) в 67% случаев, а среди больных детей жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики острый миелобластный лейкоз (М1) в 68% случаев, острый миелобластный лейкоз (М4) в 68% случаев и острый монобластный лейкоз (М5а, М5b) в 100% случаев. ИФТ по результатам дает свою целенаправленную характеристику бластных клеток и индивидуально с учетом предельной чувствительности методики.

Ключевые слова: проточная цитофлуориметрия, острый миелоидный лейкоз, дети, киргизская национальность

DIAGNOSTIC INDICATORS IMMUNOPHENOTYPING AND FREQUENCY OF THE PREVALENCE IN PATIENTS CHILDREN ACUTE MYELOID LEUKEMIA

^{1,2}Baratova D.A., ^{2,3}Mamatysaeva U.A., ^{2,3}Mademilova Ch.M.

¹ANMSO «Eurasian Center of Oncohematology, Immunology and Therapy», Saint-Petersburg, e-mail: baratova@list.ru;

²ANO «National register of hematopoietic stem cells Kirgizia», Saint-Petersburg;

³SI «National Center of Oncology and Hematology» Ministry of Health Kyrgyz Republic, Bishkek

The article presents the results of immunotyping (IFT) studies using the method of flowing cytofluorimetry and determined frequency of the elicitation among patients children of acute myeloid leukemia. The diagnosis acute myeloblastic leukemia (AML) can be made at the availability of the IFT of myeloperoxidase (MPO) and in the absence, when the blast cells express other, less specific myeloid markers and is excluded the variant of acute lymphoblastic leukemia. At the IFT by dint of flowing cytofluorimetry in patients children, AML is detected at all ages, but with our observation at the ages of 12 years – 12 years 11 months and 16 years – 16 years 11 months not detected neither among the female and male -0% of cases. In the Kyrgyz Republic, among the patients children, the most common variants of leukemia were revealed: acute myeloblastic leukemia (M2) in 53% of cases and acute myelomonoblastic leukemia (M4) in 20% of cases and less often acute myeloblastic leukemia (M1) in 10% of cases, acute promyelocytic leukemia (M3) in 10% and acute monoblastic leukemia (M5a, M5b) in 7% of cases. AML is diagnosed in female patients of kirgiz nationality in 78% of cases, among male in 83% of cases, and in female patients of residents Russian-speaking population of the Kyrgyz Republic in 22% of cases, male in 17% of cases. The is revealed in patients children kirgiz nationality: acute myeloblastic leukemia (M2) in 69% of cases, acute promyeloblastic leukemia (M3) in 67% of cases, and also in patients children of the residents Russian-speaking population of the Kyrgyz Republic (Kirgizia) in 68% of cases acute myeloblastic leukemia (M1), acute myeloblastic leukemia (M4) in 68% of cases and acute monoblastic leukemia (M5a, M5b) in 100% of cases. Based on the results, the IFT gives its targeted characterization of blast cells and individually, taking into account the limiting sensitivity of the technique.

Keywords: flowing cytofluorimetry, acute myeloid leukemia, children's, kirgiz nationality

Острый лейкоз – это острое злокачественное заболевание системы крови, с поражением на уровне детерминированных родоначальных стволовых клеток или ран-

них клеточных предшественников, характеризующийся наличием бластных клеток в костномозговом пунктате или в периферической крови от 20% и более.

При постановке диагноза острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) цитогенетические, морфологические исследования по настоящее время остаются мощным инструментом в клинической практике, но для подробного изучения клеток костного мозга, метод проточная цитофлуориметрия имеет свои, несомненно, большие преимущества.

На сегодняшний день, при постановке диагноза острого миелоидного лейкоза с помощью метода проточной цитофлуориметрии, необходимо оценить иммунофенотипические особенности бластных клеток и определить вариант направленности миелоидной клеточной линейности и исключить Т и В-линейной или редкие варианты неясной линейности.

Клетки миелоидной линии развиваются в костном мозге из общего кроветворного предшественника. Ранними клетками моноцитарного ряда – это монобласты и промиелоциты. В норме их содержание в костном мозге, крайне низкое.

По данным автора [1] монобласты экспрессируют маркеры предшественников CD34, CD117 и HLA-DR, в последовательности появляются CD4, CD64, CD36, CD33, CD11c, CD11b, CD15, CD14 и в стадии промиелоцита интенсивность экспрессии данных маркеров увеличивается, а антигены ранней стадии дифференцировки (CD34, CD117) медленно исчезают. При диагностике острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), наиболее специфичным является обнаружение миелопероксидазы в цитоплазме опухолевых клеток.

Миелопероксидаза – линейно-специфический маркер миелоидной линии, лизосомальный фермент гранулоцитов. При иммунофенотипировании в случае не выявления миелопероксидазы, то для установления миелоидного варианта острого лейкоза, необходимо исследовать другие миелоидные антигены, включая маркеры редких форм ОМЛ (эритроидный, мегакариобластный), а также исключить лимфоидный вариант дифференцировки опухолевых клеток. С диагностической целью применяются определение линейной принадлежности опухолевых клеток наборы антител рекомендованные Международной группой экспертов Европейской сети лейкемии (ELN) [2], консорциума Еврофлор [3], и для дифференциальной диагностики классификации European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL) [4] и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [5].

Для подтверждения миелоидной направленности опухолевых (бластных) клеток необходимо оценить экспрессию миелоидных антигенов.

Как отмечают авторы [5], бластные клетки при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) чаще всего экспрессируют маркеры предшественников (CD34, CD117, HLA-DR) и в редких случаях терминальную дезоксирибонуклеотидил трансферазу-TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase), специализированная ДНК-полимераза, которая в норме добавляет N-нуклеотиды при реоранжировке генов Т и В клеточных рецепторов, увеличивая их вариабельность.

Встречается в 30% случаев при остром миелоидном лейкозе CD7, экспрессия данного антигена может коррелировать с неблагоприятным прогнозом [6].

Как отмечают авторы [7], в будущем найдет свое мощное направление иммунотерапия, вакциноотерапия, гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при лечении острых лейкозов и других злокачественных онкогематологических заболеваний.

На сегодняшний день, при правильной постановке диагноза «острый лейкоз», с определением направленности миелоидного варианта линейности и своевременном подборе ПХТ, необходимо провести аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Своевременное проведение высокотехнологичного метода терапии гаплоидентичной (родитель, брат, сестра или плацентарная кровь) [7], или близкородственной, неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, позволяет при наличии совместимого HLA-идентичного здорового донора [8].

Целью нашего исследования является выявление частоты распространенности и своевременный диагностический анализ иммунофенотипа опухолевой (бластной) клеточной линейности при остром миелоидном лейкозе у больных детей в Кыргызской Республике (Киргизии).

Материалы и методы исследования

В группу исследования с ноября 2016 г. по декабрь 2019 г. вошли 30 пациентов детей (женского пола – 16, мужского пола – 14) с острым миелоидном лейкозом, из них больные дети киргизской национальности – 24 (женского пола – 14 и мужского пола – 10) и жителей русскоязычного населения (смешанная нация и разной национальности) Кыргызской Республики (Киргизии) – 6 пациентов детей, из них детей (женского пола – 2, мужского пола – 4), все граждане Кыргызской Республики (Киргизии), в возрасте от 1,5 года до 16 лет, проходившие обследование в отделении детской онкологии Национального центра онкологии и гематологии Министерства здравоохранения Кыр-

гизской Республики и в отделении детской гематологии Ошской межобластной клинической детской больницы г. Ош, в г. Санкт-Петербурге больные консультированы врачами гематологами на базе Евразийского центра онкогематологии, иммунологии и терапии.

Метод с помощью проточной цитофлуориметрии использовался впервые, и проводилось иммунофенотипирование в г. Бишкек (Кыргызская Республика (Киргизия)).

Метод с помощью проточной цитофлуориметрии

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

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя анализ стандартных критериев. χ^2 -квадрат, использовали для оценки достоверности различий по встречаемости определенных признаков между исследуемой группой. Определение величины «р», соответствующей найденному значению. χ^2 -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 – ExcelTM Версия 7,0 для Windows 95, для Windows-2010, Statistica-5.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении нами исследований, диагноз острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) устанавливался на основании клинических данных и комплексных ряда общих и специальных лабораторно-диагностических показателей.

По результатам наших исследований в Кыргызской Республике (Киргизии) с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) у больных детей по возрастным показателям среди мужского пола выявляется в возрастных от 1,5 года до 1 года 11 месяцев, от 3 лет – 3 лет 11 месяцев, 8 лет – 8 лет 11 месяцев, 10 лет – 10 лет 11 месяцев и от 14 лет до 14 лет 11 месяцев и среди женского пола от 7 лет до 7 лет 11 месяцев, 9 лет – 9 лет 11 месяцев, 11 лет – 11 лет 11 месяцев и от 13 лет до 13 лет 11 месяцев, практически в 100% случаев. Выявляются среди женского пола в возрастных от 2-х лет до 2 лет 11 месяцев в 77% случаев, в 4 года до 4 года 11 месяцев в 50% случаев, от 5 лет – 5 лет 11 месяцев в 32% случаев, в 6 лет – 6 лет 11 месяцев в 50% случаев и в 15 лет – 15 лет 11 месяцев в 50% случаев, а среди мужского пола в возрастных от 2-х лет – 2 лет 11 месяцев в 23% случаев, в 4 года – 4 года 11 месяцев в 50% случаев, в 5 лет – 5 лет 11 месяцев в 68% случаев, в 6 лет – 6 лет 11 месяцев в 50% случаев, в 15 лет – 15 лет 11 месяцев в 50% случаев.

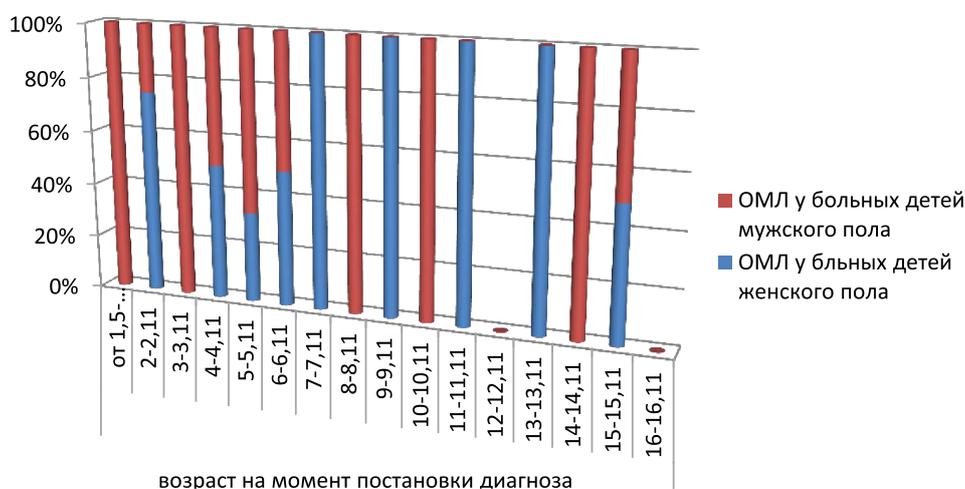


Рис. 1. Сравнительная возрастная характеристика частоты выявляемости в Кыргызской Республике у больных детей женского и мужского пола острого миелоидного лейкоза

При нашем наблюдении в возрастах от 12 лет до 12 лет 11 месяцев и от 16 лет до 16 лет 11 месяцев не выявлено ни среди женского пола, ни среди мужского пола – 0% случаев, данные представлены на рис. 1.

По значимости отличий, в Кыргызской Республике (Киргизии) острый миелоидный лейкоз у больных детей чаще выявляется среди мужского пола по сравнению с контрольной группой (женского пола) и имеет статистически достоверные различия, где $p < 0,005$.

По частоте распространенности среди больных детей киргизской национальности выявляется острый миелобластный лейкоз (вариант M1) в 32% случаев, острый миелобластный лейкоз (вариант M2) в 69% случаев, острый промиелобластный лейкоз (вариант M3) в 67% случаев, острый миелобластный лейкоз (вариант M4) в 32% случаев, острый монобластный лейкоз (вариант M5a, M5b) в 0% случаев, данные представлены на рис. 2. В сравнении среди больных детей жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) выявляется острый миелобластный лейкоз (вариант M1) в 68% случаев, острый миелобластный лейкоз (вариант M2) в 31% случаев, острый промиелобластный лейкоз (вариант M3) в 33% случаев, острый миелобластный лейкоз (вариант M4) в 68% случаев, острый монобластный лейкоз (вариант M5a, M5b) в 100% случаев.

По значимости отличий, в Кыргызской Республике (Киргизии) по вариантам течения заболевания острый миелобластный лейкоз (вариант M1) и острый миелобластный лейкоз (вариант M4) реже выявляется и практически не выявляется острый моно-

бластный лейкоз (вариант M5a, M5b) среди больных детей киргизской национальности по сравнению с больными детьми жителей русскоязычного населения Киргизии, и имеют статистически высоко достоверные различия, где $p < 0,0001$.

Как видно, из представленного рис. 3, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) у больных детей среди женского пола киргизской национальности выявляется в 78% случаев, а среди мужского пола в 83% случаев.

А среди больных детей женского пола жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) выявляется в 22% случаев, среди мужского пола в 17% случаев.

По значимости различий, по распространенности в Кыргызской Республике (Киргизии) острый миелоидный лейкоз чаще диагностируется среди больных детей (женского и мужского пола) киргизской национальности по сравнению с контрольной группой (женского и мужского пола) больными детьми жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии) и имеют статистически достоверные различия $p < 0,005$.

По данным наших исследований, как видно из представленного рис. 4, выявляются среди больных детей в Кыргызской Республике (Киргизии) наиболее распространенные – острый миелобластный лейкоз (M2) в 53% случаев, острый миеломонобластный лейкоз (M4) в 20% случаев и несколько реже выявляется острый промиелоцитарный лейкоз (M3) в 10% случаев, острый миелобластный лейкоз (M1) в 10% случаев и острый монобластный лейкоз (5a, 5b) в 7% случаев.

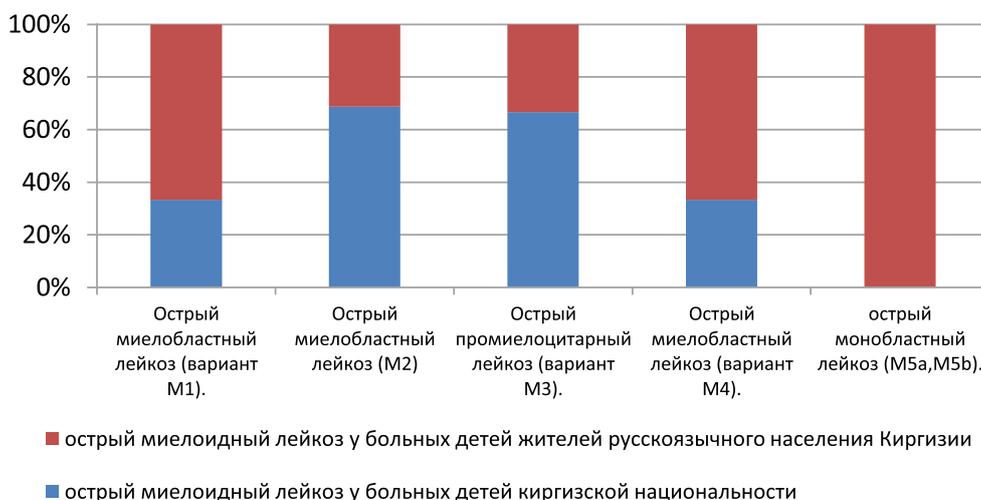


Рис. 2. Варианты острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) среди больных детей киргизской национальности и жителей русскоязычного населения Кыргызской Республики (Киргизии)

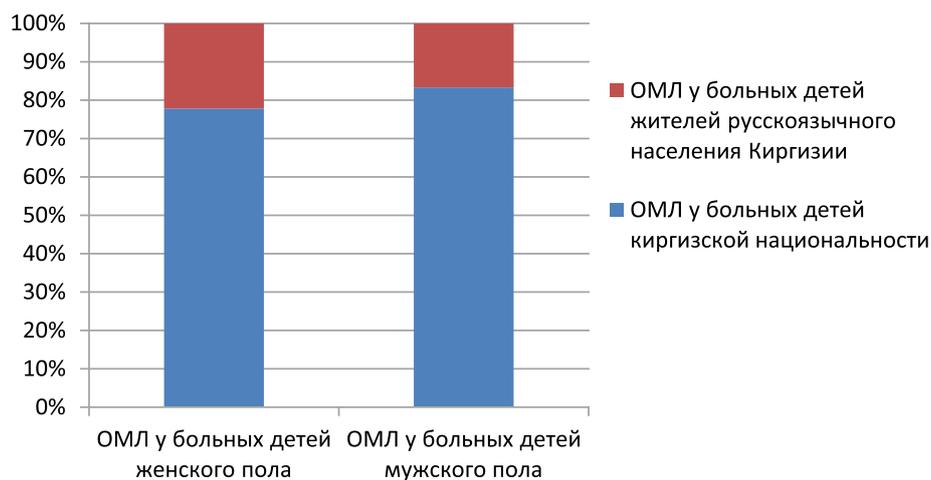


Рис. 3. Распространенность среди женского и мужского пола у больных детей острого миелоидного лейкоза в Кыргызской Республике (Киргизии)

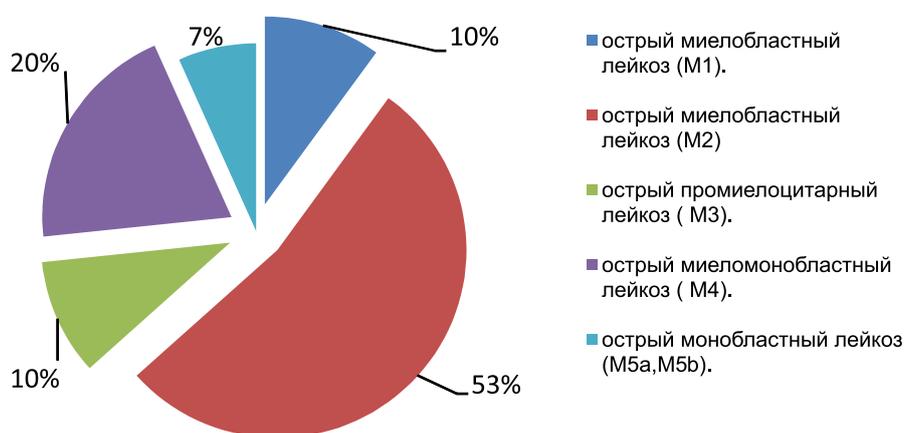


Рис. 4. Частота распространенности в Кыргызской Республике среди больных детей иммунологических вариантов острого миелоидного лейкоза (ОМЛ)

По значимости различий между вариантами ОМЛ и частоты выявляемости, наиболее распространенный и чаще диагностируется острый миелобластный лейкоз (вариант M2) и имеет статистически высоко достоверное различие, где $p < 0,005$.

Заклучение

Таким образом, при остром миелоидном лейкозе важно выявление миелоидных маркеров, которые отражают ранние степени дифференцировки клеток для установления диагноза острого лейкоза. Иммунофенотипирование в диагностике вариантов миелоидной направленности опухолевых (бластных) клеток, для подтверждения миелоидной направленности необходимо оценить экспрессию миелоидных антигенов. Иммунофенотипирование с помощью

проточной цитофлуориметрии при остром миелоидном лейкозе является одним из чувствительным методом в дифференциальной диагностике с учетом правильной, подробной характеристики десятки и сотни бластных клеток, и для постановки диагноза, позволяет выявить характерный иммунофенотип наличие миелопероксидазы (MPO), что диктует о необходимости своевременного подбора эффективной программы химиотерапии и после проведенной терапии при достижении полной ремиссии, выявления минимальной остаточной болезни.

Для определения варианта линейности и выявления частоты распространенности, и особенности течения острого миелоидного лейкоза у детей в Кыргызской Республике (Киргизии), необходимо проводить

исследование методом с помощью проточной цитофлуориметрии. При остром миелоидном лейкозе, несмотря на изучение подробной характеристики бластных клеток, позволяющий выявить характерный иммунофенотип с помощью метода проточной цитофлуориметрии, для подтверждения диагноза необходимо параллельно проводить цитогенетические, молекулярно-генетические и морфологические исследования.

По частоте распространенности острый миелоидный лейкоз встречается у больных детей и среди женского, и среди мужского пола, и течение заболевания более агрессивное, в связи с чем необходимо при своевременной установке диагноза, определить направленность миелоидной линейности. Подбор и проведение полихимиотерапии, и пересадка гемопоэтических стволовых клеток, в частности у детей дает наилучшие результаты при наличии HLA-идентичного здорового донора.

Выводы

1. Исследовать костный мозг у больных детей с острым миелоидным лейкозом с помощью метода проточной цитофлуориметрии и параллельно проводить цитогенетические, цитохимические, морфологические исследования.

2. Скрининговое исследование опухолевых (бластных) клеток для определения линейной направленности.

3. Определить направленность – вариант миелоидной линейности и исключить лимфоидный вариант линейности.

4. Иммунофенотипирование методом проточной цитофлуориметрии позволяет выявить характерный миелоидной линейности иммунофенотип опухолевых (бластных) клеток и своевременно выбрать эффективную программу химиотерапии.

Список литературы

1. Gorczyca W. Flow cytometry neoplastic hematology. Morphologic-immunophenotypic correlation. Informa healthcare. 2014. P. 20–45.

2. 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.

3. 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.

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 Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on cancer. 2017. P. 1–100.

6. Rohrs S., Scherr M., Romani J. Cd7 in acute myeloid leukemia: correlation with loss of wild – type CEBPA, consequence of epigenetic regulation. *Journal Hematology Oncology*. 2010. P. 3–15.

7. Baratova D.A., Toichubaev M.A. Immunogenetic indicators of placental blood on the system HLA-main complex histocompatibility (192nd Scientific Federation Conference, 4th Global Conference and Expo on Vaccines Research & Development, February 10–11, 2020. Lisbon, Portugal). P. 50–51.

8. Баратова М.А., Баратова Д.А., Джапаркулова А.Д., Нурлыханов Е.Б. Иммуногенетические аспекты антигенов HLA-аллелей главного комплекса гистосовместимости больных множественной миеломой и доноров гемопоэтических стволовых клеток // *Современные проблемы науки и образования*. 2014. № 5. [Электронный ресурс]. URL: [http:// www.science-education.ru/119-14892](http://www.science-education.ru/119-14892) (дата обращения: 14.02.2020).