

А. С. Уланова^{1,2}, А. Л. Турабова¹, Н. А. Григорьева^{1,2}, И. А. Турабов², М. Ю. Рыков³

Иммунофенотипические и цитогенетические особенности острого лимфобластного лейкоза у детей: ретроспективное исследование

1. Архангельская областная детская клиническая больница им. П. Г. Выжлецова

2. ФГБУ «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России

3. ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России» (Сеченовский Университет)

Обоснование: для диагностики и прогнозирования острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) применяется комплекс клинических и лабораторных методов. Важную роль среди них играет хромосомный анализ. В клинической практике постоянно используются цитогенетические маркеры лейкозного клона. Современная классификационная система ВОЗ опухолей кроветворных и лимфоидных тканей, созданная на основе объединенного анализа клинических, цитоморфологических, иммунофенотипических и цитогенетических данных. Иммунофенотипирование бластных клеток с использованием моноклональных антител позволило значительно улучшить диагностику лейкозов за счет выявления степени дифференцировки опухолевых клеток.

Цель исследования: изучить структуру острого лимфобластного лейкоза на основании результатов иммунофенотипического и цитогенетического исследований, влияние встречающихся цитогенетических нарушений на прогноз при ОЛЛ в детской популяции Архангельской области.

Материалы и методы: в ретроспективном режиме историко-архивным методом проанализированы результаты обследования (цитогенетика, иммунофенотипирование) детского населения в возрасте от 0 до 17 лет с диагнозом острого лимфобластного лейкоза в Архангельской области за период с 01.01.2004 по 31.12.2018

Результаты: в результате иммунофенотипического исследования бластных клеток костного мозга больных с ОЛЛ выявлено, что преобладал В-линейный лейкоз (74,8%). Среди количественных аномалий были выявлены гиперпloidии, наблюдались дополнительные хромосомы 4, 10, 17. Среди структурных хромосомных аномалий больше всего случаев пришлось на t(12;21). Филадельфийская хромосома (Ph) (9;22) встретилась в 6,5% случаев.

Заключение: по данным проведенной работы в Архангельской области структура ОЛЛ детской популяции по иммунофенотипической характеристике не противоречит общероссийским тенденциям. В структуре установленных хромосомных аномалий в ходе исследования специфических отличий не выявлено. Все хромосомные изменения, которые имеют отрицательное влияние на прогноз заболевания, также проявляли свое негативное влияние на терапию и прогноз.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз у детей, иммунофенотипирование, цитогенетическое исследование, транслокации.

Обоснование.

Среди проблем современной педиатрии злокачественные новообразования занимают одно из ведущих мест. Ежегодно в России они выявляются более чем у 3500 детей, 30% среди которых составляют больные с острым лейкозом. [1] Заболеваемости этой патологией в Архангельской области (АО) в последние годы достигает 5 на 100000, значительно превысив этот показатель в ранее исследованном периоде (1982–1997 гг.). [2, 3, 4] В первую очередь это объясняется ростом заболеваемости острым лимфобластным лейкозом с 2,3 до 3,6 на 100 тыс., что явилось следствием более точной верификации диагноза благодаря использованию современных методов диагностики (иммунологических, цитогенетических, молекулярно-генетических и др.). [4]

Острый лимфобластный лейкоз — неопластическое заболевание, которое характеризуется преимуществом клональной экспансией лейкозных

клеток в костном мозге, лимфатических узлах, тимусе и селезенке. В основе развития ОЛЛ лежат разные соматические дефекты генов, в результате которых опухолевые клетки демонстрируют усиленную пролиферацию, удлинение срока жизни и сбой программы дифференцировки предшественников лимфопоэза. [5]

Современная классификационная система ВОЗ опухолей кроветворных и лимфоидных тканей создана на основе объединенного анализа клинических, цитоморфологических, иммунофенотипических и цитогенетических данных. [6]

Иммунофенотипирование бластных клеток с использованием моноклональных антител позволило значительно улучшить диагностику лейкозов за счет выявления степени дифференцировки опухолевых клеток. Различные иммунологические варианты ОЛЛ отличаются клиническим течением и чувствительностью к противоопухолевой терапии. [7]

Таблица 1. Выявленные транслокации в зависимости от варианта ОЛЛ и исхода заболевания.

Транслокации	ОЛЛ				Исходы п
	В-линейный		Т-линейный		
	п	%	п	%	
t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)	17	39,5	0	0	16 – в ремиссии 1 – умер
t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1	4	9,3	0	0	1 – умер 1 – рецидив 2 – в ремиссии
t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3(AF9),	2	4,6	0	0	2 – в ремиссии
t(10;11)(p13-15;q14-21)/MLL-MLLT10(AF10)			1	2,3	1 – в ремиссии
t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3-PBX1	3	6,9	0	0	1 – умер 2 – в ремиссии
t(5;14)(q35;q32)	0	0	1	2,3	1 – в ремиссии
t(8;14)(q24;q32)	0	0	1	2,3	1 – в ремиссии
Del(17)	1	2,3	1	2,3	1 – умер 2 – рецидив
Del(9)	3	6,9	0	0	1 – умер 2 – в ремиссии
случайные	5	11,6	0	0	5 – в ремиссии
гиперплоидия	4	9,3	0	0	4 – в ремиссии
Всего	39	90,4	4	9,2	39

Для диагностики и прогнозирования ОЛЛ применяется комплекс клинических и лабораторных методов. Важную роль среди них играет хромосомный анализ. В клинической практике постоянно используются цитогенетические маркеры лейкозного клона. [8]

При назначении лечения при ОЛЛ у детей ориентируются на прогностические факторы, и одно из самых важных значений среди них имеет цитогенетический тип лейкоза. [9]

Цель исследования: изучить структуру острого лимфобластного лейкоза на основании данных иммунофенотипического и цитогенетического исследований, оценить влияние встретившихся цитогенетических нарушений на прогноз течения заболевания.

Методы.

В ретроспективном режиме историко-архивным методом были проанализированы результаты обследования (цитогенетика, иммунофенотипирование) детей в возрасте от 0 до 17 лет с диагнозом острого лимфобластного лейкоза в Архангельской области за период с 2004г по 2018 г.

Проведен анализ результатов иммунофенотипического и цитогенетического исследований костного мозга детей в возрасте от 0 до 17 лет с диагнозом ОЛЛ в АО с 2004 по 2018 г.г. В качестве источников информации использовали:

- истории болезни и выписки из них детей, находившихся на лечении в онкологическом отделении химиотерапии опухолей АОДКБ (ф. 003, ф. 027-1/У);
- данные канцер-регистра Архангельского областного онкологического диспансера.

При установлении диагноза острый лейкоз всем пациентам проводилось:

- иммунофенотипирование бластных клеток костного мозга методом проточной цитофлуориметрии (ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева);

- цитогенетическое исследование бластных клеток костного мозга:

- о методом кариотипирования клеток и молекулярно-генетическое исследование методом ПЦР (2004–2015 г.г.) (ГБУЗ АО АОДКБ);

- о а также: молекулярно-генетическое исследование методом ПЦР и молекулярной цитогенетики (FISH) (ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева) (с 2006 г.).

Этическая экспертиза.

Локальный этический комитет ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России от 28.11.2018 г. Проведено рассмотрение пакета документов научно-клинического исследования по теме: «Медико-эпидемиологические аспекты острых лейкозов у детей Архангельской области, комплексная оценка лечения». Постановили: одобрение этического комитета.

Результаты.

В качестве объекта исследования выступали:

- истории болезни и выписки из них детей, находившихся на лечении в онкологическом отделении химиотерапии опухолей АОДКБ (ф. 003, ф. 027-1/У);
- результаты цитогенетического и иммунофенотипического исследований костного мозга.

За исследуемый период в Архангельской области было с 2004 по 2018 гг. зарегистрировано 160 случаев острого лейкоза у детей в возрасте 0–17 лет. По результатам иммунофенотипического исследования бластных клеток костного мозга распределение различных вариантов ОЛ было следующим: ОЛЛ — 123 (77%), ОМЛ — 34 (21,2%), бифенотипический лейкоз — 3 (1,8%).

В структуре ОЛЛ В-линейный лейкоз был диагностирован в 92 случаях (74,8%), Т-линейный — в 31 (25,2%). Во всех случаях В-линейного лейкоза бластные клетки экспрессировали молекулы CD19

и/или CD79a и/или цито-плазматическую CD22). Для T-линейного ОЛЛ была характерна экспрессия антигенов CD7, CD3.

По результатам цитогенетического исследования бластных клеток костного мозга при ОЛЛ хромосомные нарушения обнаружены в 43 случаях (26.8%) (табл. 1).

Из группы количественных аномалий была выявлена гиперплоидия (наблюдались дополнительные хромосомы 4,10,17) в 4 случаях (9,3%).

У всех пациентов, которые вошли в эту группу, отмечен ранний ответ на терапию, сохранная ремиссия по настоящее время, рецидивов не зафиксировано.

В группу случайных перестроек (5 случаев) были определены изменения, не имеющие диагностической значимости и не оказывающие никакого влияния на определение тактики лечения и прогноз.

В нашем исследовании t(12;21) определена у 17 пациентов. Данная транслокация является благоприятным прогностическим фактором. У всех пациентов данной группы в процессе лечения была зафиксирована ремиссия, один пациент умер на этапе консолидации, так как имел отягощенный генетический фон — синдром Дауна; остальные пациенты живы по настоящее время, рецидивы не зафиксированы.

Филадельфийская хромосома (Ph) (9;22) выявлена в 4 случаях. В ходе нашего исследования: один пациент умер в процессе противорецидивной терапии, также у данного пациента была выявлена del(17), которая сама по себе имеет отрицательное влияние на достижение и сохранение ремиссии. У второго пациента развился поздний костномозговой рецидив, в настоящее время находится в процессе противорецидивной терапии. У остальных пациентов достигнуты ремиссии и сохранены по настоящее время.

У детей с диагнозом ОЛ обнаруживают транслокации, вовлекающие локус 11q23. В нашей работе на данную группу хромосомных аномалий пришлось 3 случая. К настоящему времени накопились факты, не позволяющие включать все изменения района 11q23 в группу прогностически неблагоприятных аномалий кариотипа. У всех пациентов данной группы была достигнута ремиссия, сохранна по настоящее время.

На долю транслокации t(1;19)(q23; p13.3) в нашем исследовании пришлось 3 случая. При ОЛЛ у детей этот цитогенетический маркер служит независимым фактором высокого риска рецидивов с поражением ЦНС. У пациентов данной группы была достигнута ремиссия и сохранна по настоящее время. Один пациент умер в процессе консолидирующей терапии в результате возникших инфекционных осложнений.

Пациенты, имеющие хромосомный дефект del(17p), составили 2 случая. Один пациент умер от рецидивирования заболевания, после проведения аллогенной родственной трансплантации; один пациент закончил лечение, затем развился поздний внекостномозговой рецидив, по настоящее время находится на терапии.

Обсуждение.

В результате исследования по полученным данным иммунофенотипического исследования бластных клеток костного мозга большую часть случаев пришлось на ОЛЛ, в структуре ОЛЛ лидирующее значение составил В-линейный лейкоз. Среди количественных аномалий была выявлена гиперплоидия. Среди структурных хромосомных аномалий больше всего случаев пришлось на t(12;21).

Прогнозирование острого лейкоза путем выявления экспрессии иммунофенотипических маркеров на лейкозных клетках методом проточной цитометрии имеет решающее значение для обеспечения индивидуализированного лечения и улучшения исходов в педиатрической практике. [10, 11] Современная диагностика ОЛЛ должна включать цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование, а также определение ДНК-индекса — цитометрического показателя, отражающего количественные хромосомные аномалии в опухолевых клетках. На практике более оправданной представляется целенаправленная идентификация клинически значимых генетических aberrаций. [12]

Среди острых лейкозов у детей отмечается преобладание острого лимфоидного лейкоза (ОЛЛ), доля которого составляет 75–85%. [2,3,13] Что и подтверждается результатами нашей работы, а также преобладание В-линейного лейкоза, что тоже не противоречит общероссийским тенденциям.

Одним из благоприятных прогностических факторов считается транслокация t(12;21). Эта транслокация обнаруживается у 25% детей с пре-В-ОЛЛ. [14] Результаты нашего исследования также не противоречат общим тенденциям и составили 30% всех случаев. Один пациент из данной группы имел отягощающий генетический фон — синдром Дауна и умер на этапе консолидации. Важно отметить, что у детей с синдромом Дауна чаще развивается тяжелая системная токсичность, такая как миелосупрессия, мукозит и гепатоксичность после воздействия антифолатного агента, что приводит к тяжелым инфекционным осложнениям. [15]

Структурные хромосомные аномалии обнаруживаются чаще при острых лейкозах, перестройки обычно представлены транслокациями.

Наличие филадельфийской хромосомы, выявленное при диагностике ОЛЛ, делает прогноз течения заболевания как у взрослых, так и у детей крайне неблагоприятным. Наблюдается четкая зависимость частоты встречаемости Ph+ ОЛЛ от возраста. Разные авторы сходятся во мнении, что данная нозологическая форма редко встречается в детском возрасте (2–5%), в то время как у взрослых ее частота достигает 25% и более, увеличиваясь на 10% каждую декаду жизни. [16] В нашем исследовании на данную транслокацию пришлось 6,5%, средний возраст дебюта ОЛЛ пациентов составил 14.5 лет. Независимо от возраста, обнаружение филадельфийской (Ph) хромосомы при ОЛЛ является фактором неблагоприятного прогноза. Результаты лечения детей из

менились: в 1960 г. сообщалось о 5-летней выживаемости только 3% детей; в 2008 г. N. Seibel в своем обзоре указывает, что 5-летняя выживаемость среди больных до 15 лет составляет 88%. [17] Эти результаты достигнуты благодаря появлению новых лекарственных препаратов и внедрению режимов интенсивной терапии. Начало XXI в. ознаменовалось внедрением в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназ, применение которых радикально изменило результаты терапии. Первым из препаратов-ингибиторов ABL-тирозинкиназы был иматиниб (Гливек). [18] К настоящему времени у 50% наших пациентов этой группы, получавших терапию с иматинибом, достигнута сохранная ремиссия.

Перестройка 11q23 характерна для ОЛЛ у детей 1 года жизни и встречается в 65% случаев в этом возрасте. Самой частой является транслокация t(4;11), несколько реже выявляются транслокации t(11;19) и t(9;11). [19] В нашем исследовании на долю данной группы транслокаций в ходе исследования пришлось 13%. С возрастом частота этих транслокаций снижается, вероятность их обнаружения у подростков и взрослых составляет 1–2 и 4–9% соответственно. Средний возраст данной группы составил 2.6 года.

Заключение

По данным проведенной работы структура ОЛ детской популяции по иммунофенотипической характеристике в Архангельской области не противоречит общероссийским тенденциям. В структуре установленных хромосомных аномалий в ходе исследования специфических отличий не выявлено. Определено незначительное повышение доли Филадельфийской хромосомы (по данным авторов встречается до 5%). Все хромосомные изменения, которые имеют отрицательное влияние на прогноз заболевания, также проявляли свое негативное влияние на терапию и прогноз.

Список литературы.

1. Malignant neoplasms in Russia (morbidity and mortality) in 2018. Edited by A. D. Kaprin, V. V. Starinsky, G. V. Petrova.— М., Federal state budgetary institution of Moscow research oncological Institute named after P. A. Herzen of the Ministry of health of Russia.— 2019.— 250 p.
2. Turabov I. A. Oncological morbidity of children's population in the European North of Russia/ Children's Oncology.— М., 2003, no. 4.— P. 29–36
3. Turabov I. A., Kudryavtsev V. A., Kustyshev I. G., Denshchikov B. V. Oncological morbidity of children in the North of Russia (prevalence, structure)/ human Ecology.— Arkhangelsk, 1999, no. 2.— Pp. 61–64.
4. I. A. Turabov, A. V. Kudryavtsev, M. Yu. Rykov, A. A. Karpunov, A. S. Ulanova Oncological morbidity of children in the Arkhangelsk region and the Nenets Autonomous district: ecological research ONCOPE-DIATRY / 2019 / volume 6 / no. 2
5. Rukavitsyn O. A. Hematology: national guide. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 776 PP.

6. I. A. Sukhina V. Yu. Nikitin S. N. Kolyubaeva A. M. Ivanov V. N. Semelev D. A. Gornostaev Yu. V. Nikitin M. E. Meshkova Immunophenotypic profile of tumor cells in acute leukemia with repeated genetic anomalies //Laboratory service. 2015;4(1): 3–15
7. Pluzhnikova G. E. Correlation of immunophenotype and karyotype of blast cells in the dynamics of program polychemotherapy in children with acute leukemia. Dissertation work for the degree of candidate of biological Sciences 16 October 2008
8. G. I. Mentkevich, S. a mayakova Leukemia in children Moscow 2009
9. S. A. mayakova, V. S. Nemirovchenko, A. V. Popa Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of children with acute leukemia Moscow 2014
10. Riley R. S., Massey D., Jackson-Cook C. et al. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2002;16(2):245–99
11. Clinical Significance of CD34 & CD10 Expression in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Amritha Malini G1,*, Rajeevan K2, Ajith Kumar VT3, Sathi PP4, Aravindan KP5 Indian Journal of Pathology and Oncology, October-December 2017;4(4):564–569
12. A. Maschan, N. V. Myakova Acute lymphoblastic leukemia in children // Oncogematology 1–2, 2006
13. Rykov M. Yu., Baibarina E. N., Chumakova O. V., Polyakov V. G. Epidemiology of malignant neoplasms in children in the Russian Federation. Analysis of main indicators and ways to overcome statistical data defects.— Oncology. 2017, volume 4, no. 3.— Pp. 159–177
14. A. V. Michurin Cytogenetic and molecular genetic factors and prognosis of acute lymphoblastic leukemia Clinical Oncohematology. 2017;10(3):317–23
15. Acute leukemia in children with Down syndrome Ana C. Xavier1 and Jeffrey W. Taubhaematologica |2010; 95(7)
16. K. I. Zarubina, E. N. Parovichnikova, O. A. Gavrilina, A. N. Sokolov, V. V. Troitskaya, L. A. Kuzmina, V. E. Mamonov, G. M. Galstyan, V. G. Savchenko Toxicity and effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in combination with chemotherapy in the resistant course of acute Ph-positive lymphoblastic leukemia (literature review and clinical case) Oncohematology 3*2017 volume 12]
17. Seibel N. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents: Peak and Pitfalls. ASH Educational Pr. Book Hematology, 2008; 374–80.
18. M. A. Volkova Ph-positive acute lymphoblastic leukemia Oncohematology volume 2 no. 1 January-March 2009.
19. Caur G. a Molecular biological diagnostics and monitoring of minimal residual disease in the treatment of acute leukemia in children of the first year of life Thesis for the degree of doctor of medical Sciences Yekaterinburg 2015

A. S. Ulanova^{1,2}, A. L. Turabova¹, N. A. Grigoryeva^{1,2}, I. A. Turabov², M. Yu. Rykov³

Immunophenotypic and cytogenetic features of acute lymphoblastic leukemia in children: a retrospective study

1. Vyzhletsov Arkhangelsk Regional Children's Clinical Hospital

2. Northern State Medical University

3. I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

Background. A complex of clinical and laboratory methods is used for the diagnosis and prognosis of leukemia. Chromosomal analysis plays an important role among them. The clinic is constantly used cytogenetic markers of the leukemia clone. Modern classification system of WHO tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, created on the basis of a combined analysis of clinical, cytomorphological, immunophenotypic and cytogenetic data. Immunophenotyping of blast cells using monoclonal antibodies made it possible to significantly improve the diagnosis of leukemia by detecting the degree of differentiation of tumor cells.

Aim: to study the structure of acute leukemia detected by immunophenotypic and cytogenetic studies, the influence of cytogenetic disorders occurring on the prognosis of AL in the child population in the Arkhangelsk Regional Children's Clinical Hospital.

Methods: in retrospective mode, the results of the survey (cytogenetics, immunophenotyping) of the child population aged 0 to 17 years with a diagnosis of acute leukemia in the Arkhangelsk region for the period from 01.01.2004 to 31.12.2018 were analyzed by historical and archival method.

Results: as a result of immunophenotypic study of blast cells of the bone marrow, most of the cases were ALL, in the structure of ALL the leading value was B-linear leukemia. Among the quantitative anomalies, hyperploidy was detected, and additional chromosomes 4, 10, 17 were observed. Among structural chromosomal abnormalities, the most cases occurred on t(12; 21). The Philadelphia chromosome (Ph) (9;22) is a rare and amounted to 6.5%.

Conclusion: according to the data of the work carried out in the Arkhangelsk region, the structure of the AL of the child population according to the immunophenotypic characteristic does not contradict the all-Russian trends. No specific differences were found in the structure of established chromosomal abnormalities during the study. All chromosomal changes that have a negative impact on the prognosis of the disease also showed their negative impact on therapy and prognosis.

Key words: acute leukemia in children, immunophenotyping, cytogenetic study, translocations.