

С.В. Яременко

В.А. Надгорная

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, иммунофенотип бластных клеток, маркерные признаки.

МАРКЕРНЫЕ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ БЛАСТОВ ПРИ Т-КЛЕТОЧНОМ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

Резюме. Острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ) Т-клеточного происхождения у детей составляют около 12% среди всех ОЛЛ. Они отличаются чрезвычайно тяжелым клиническим течением и неблагоприятным прогнозом. По морфоцитохимическим признакам невозможно разграничить Т-клеточные ОЛЛ от В-клеточных, поэтому важным является определение иммунофенотипа бластных клеток. У 168 детей с ОЛЛ в возрасте от 1 года до 14 лет проведено иммунофенотипирование бластных клеток; Т-ОЛЛ выявлен у 23 больных. Выявлены особенности фенотипа бластных клеток при Т-I, Т-II и Т-III подвариантах ОЛЛ у детей.

ВВЕДЕНИЕ

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) относится к числу наиболее частых злокачественных заболеваний, встречающихся у детей в возрасте до 15 лет. На его долю приходится около 25% всех форм новообразований различных органов и систем.

Цитологические и цитохимические признаки бластных клеток являются основой диагностики и классификации острых лейкозов. Основанная на простых цитоморфологических критериях и доступных цитохимических методах франко-американо-британская (ФАБ) классификация выделяет 3 типа ОЛЛ и 8 — острых миелоидных лейкозов [1]. Однако использования только цитоморфологических методов и цитохимических реакций недостаточно для разграничения лейкозов В- и Т-клеточного происхождения и идентификации острых лейкозов миелоидной природы, возникающих из наиболее ранних клеток-предшественников (ОМЛ M0, M5a, M6, M7), которые характеризуются сходной морфологией бластных клеток и отсутствием маркерных цитохимических признаков.

Имунофенотипирование стало важным элементом современной диагностики острого лейкоза, поскольку позволяет более чем в 99% случаев четко определить происхождение бластных клеток [2–5]. Ученые, входящие в Европейскую группу по иммунологической классификации лейкозов (EGIL), предлагают выделять четыре подварианта ОЛЛ В-клеточного и четыре Т-клеточного происхождения заболевания [6] (табл. 1).

Таблица 1

Подварианты ОЛЛ, выделяемые в соответствии с классификацией EGIL [6]	
В-клеточный вариант ОЛЛ	Т-клеточный вариант ОЛЛ
В-I (про-В)	Т-I (про-Т)
В-II (common)	Т-II (пре-Т)
В-III (пре-В)	Т-III (кортикальный)
В-IV (зрелый В)	Т-IV (зрелый Т)

Несмотря на то, что ОЛЛ Т-клеточного происхождения составляют 12–17% всех случаев ОЛЛ в разных странах, выделение их иммунофенотипических под-

вариантов является важным, поскольку, по сравнению с В-ОЛЛ, в клиническом плане они более неблагоприятны и хуже поддаются терапии, у больных отмечается низкий уровень безрецидивной продолжительности жизни и выживаемости в целом.

Ранее группу Т-клеточных ОЛЛ в соответствии со степенью дифференцировки бластных клеток подразделяли на два подварианта — «ранние» и «поздние» Т-ОЛЛ. Затем Т-ОЛЛ классифицировали в соответствии с зонами тимуса, в которых содержатся бластные клетки, — субкортикальный, кортикальный и медуллярный. Современная классификация выделяет подварианты Т-ОЛЛ в соответствии с основными стадиями внутри тимической дифференцировки лимфобластов, при этом каждая стадия характеризуется 1–2 определяющими иммунофенотипическими маркерами.

Подварианты Т-клеточных ОЛЛ мало различаются морфологически, как правило, бластные клетки относятся к L1-типу по ФАБ-классификации.

Независимо от возраста пациента и подварианта заболевания, большинство Т-клеточных ОЛЛ ассоциированы с гиперлейкоцитозом, поражением лимфатических узлов (75% случаев) и селезенки (69% случаев), а также наличием опухолевой массы в переднем средостении. Следует отметить, что согласно данным мировой статистики, мальчики болеют почти в 2 раза чаще, чем девочки (30 против 18% соответственно).

Учитывая тяжесть течения Т-ОЛЛ у детей, была предпринята попытка определения маркерных иммунофенотипических признаков, характерных для каждого из подвариантов Т-ОЛЛ.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наличие маркерных признаков на бластных клетках анализировали по экспрессии ряда дифференцировочных антигенов Т-лимфоцитов: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Для проведения иммунофенотипирования использовали выделенные в градиенте плотности мононуклеары костного мозга

и периферической крови, а при отсутствии жидкого материала иммуноцитохимическую реакцию проводили непосредственно в мазках костного мозга.

Имунофенотипирование проведено иммуноцитохимическим авидин-биотиновым методом со щелочной фосфатазой в качестве метки. Из 191 ребенка с ОЛЛ у 23 (12%) диагностирован ОЛЛ Т-клеточного происхождения (табл. 2).

Таблица 2

Подварианты Т-ОЛЛ, выделенные в группе обследованных детей	
Подвариант Т-клеточного ОЛЛ	Количество больных (%)
Про-Т (Т-I)	5 (20)
Пре-Т (Т-II)	10 (45)
Кортикальный Т (Т-III)	6 (25)
Зрелый Т (Т-IV)	2 (5)

Следует особо подчеркнуть, что дети, отнесенные к группе про-Т (Т-I), были в возрасте от 1 года 8 мес до 7 лет. С увеличением возраста чаще определяли подвариант Т-ОЛЛ из более зрелых клеток и подвариант из кортикальных тимоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определяющим маркером Т-клеточных ОЛЛ является антиген CD3. На ранних стадиях дифференцировки Т-лимфоцитов он обнаруживается в цитоплазме, а по мере созревания клеток экспрессируется на поверхностной мембране, то есть это антиген, указывающий на коммитацию клетки в направлении Т-клеточной дифференцировки. Наличие другого пан-Т-клеточного маркера — CD7 — не является строго специфичным для Т-ОЛЛ, поскольку его экспрессия в сочетании с HLA-DR и CD34 характерна для лейкозов миелоидной природы с минимальными признаками дифференцировки бластных клеток (ОМЛ M0, M5a). Дополнительные Т-клеточные маркеры — CD2, CD5, CD4 и CD8 дают информацию о конкретной стадии дифференцировки бластной клетки с определенным иммунологическим фенотипом (табл. 3). Но блок дифференцировки может произойти и на промежуточной стадии созревания лимфоцита, при этом клетки характеризуются так называемым переходным фенотипом.

Таблица 3

Характеристика иммунофенотипа бластных клеток при различных подвариантах ОЛЛ Т-клеточного происхождения

Про-Т (Т-I)	Пре-Т (Т-II)	Кортикальный Т (Т-III)	Зрелый Т (Т-IV)
TdT	TdT	TdT	TdT
(HLA-DR)	CD7	CD7	CD7
(CD34)	цитCD3	цитCD3	CD5
CD7	CD5	CD5	CD2
цитCD3	CD2	CD2	CD3
(CD5)	CD8	CD1a	TCR α/β или TCR γ/δ
		CD4/CD8	

Примечание. Полужирным шрифтом выделены определяющие маркеры.

Мы выделили редкие иммунофенотипические подварианты Т-ОЛЛ у детей (табл. 4).

Таблица 4

Происхождение бластных клеток при редких иммунофенотипических подвариантах Т-ОЛЛ у детей

Стадия дифференцировки	Экспрессируемые маркеры
Стволовая клетка лимфопоэза	HLA-DR ⁺ , CD34 ⁺ , CD7 ⁺
СК \Rightarrow про-Т (Т-I)	HLA-DR ⁺ , CD34 ⁺ , CD7 ⁺ , цитCD3 ⁺
про-Т (Т-I) \Rightarrow пре-Т (Т-II)	HLA-DR ⁺ , CD34 ⁺ , CD10 ⁺ , CD7 ⁺ , цитCD3 ⁺ , CD8 ⁺
про-Т (Т-I) \Rightarrow пре-Т (Т-II)	HLA-DR ⁺ , CD7 ⁺ , цитCD3 ⁺ , CD2 ⁺ , CD4 ⁺
пре-Т (Т-II)	HLA-DR ⁺ , CD7 ⁺ , цитCD3 ⁺ , CD5 ⁺
пре-Т (Т-II)	HLA-DR ⁺ , CD7 ⁺ , цитCD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD2 ⁺

У больной в возрасте 7 лет бластные клетки имели морфологию L2-типа по ФАБ-классификации; экспрессировали CD7- и CD34-антигены, слабо реагировали с моноклональными антителами (МКАТ) к HLA-DR и не реагировали с какими-либо другими МКАТ к Т- или В-клеточным дифференцировочным антигенам, то есть иммунофенотипически бласты имели характеристику стволовой клетки лимфопоэза; важным в данной ситуации было проведение цитохимической реакции на кислую фосфатазу: локализация продукта реакции в виде одной или нескольких ярких гранул в зоне аппарата Гольджи является характерной для Т-клеток [7, 8].

У больного в возрасте 5 лет бластные клетки L1-типа, тотально инфильтрирующие костный мозг, слабо экспрессировали HLA-DR, CD34, только в части бластных клеток отмечалась слабая экспрессия CD3 в цитоплазме при наличии пан-Т-клеточного антигена CD7. По иммунофенотипическим признакам бласты были отнесены к клеткам, занимающим промежуточное положение между стволовой клеткой лимфопоэза и клетками субкортикальной зоны тимуса. Следует особо отметить, что экспрессию антигена HLA-DR чаще определяли при В-клеточном ОЛЛ (92%) и редко — при Т-клеточном ОЛЛ (19%); наличие CD34 при Т-ОЛЛ является скорее исключением, чем правилом.

У ребенка в возрасте 1 года 8 мес фенотип бластных клеток характеризовался слабой экспрессией антигенов CD34 и CD10 — маркеров стволовых клеток, при наличии реакции с CD7, цитCD3, CD8. В 30% случаев при Т-ОЛЛ отмечали экспрессию антигена CD10, однако, в отличие от В-ОЛЛ, наличие или отсутствие этого маркера не является прогностически значимым признаком при Т-ОЛЛ. Между CD10⁺- и CD10⁻-случаями Т-клеточных ОЛЛ не наблюдали значительных отличий, кроме случаев, когда морфологически бласты относили к L2-типу по ФАБ-классификации. При этом прогноз был хуже [9].

У ребенка в возрасте 11 лет с выраженными клинико-гематологическими признаками ОЛЛ (гиперлейкоцитозом, гиперплазией периферических лимфатических узлов, органомегалией и наличием опухоли средостения) иммунофенотип бластных клеток характеризовался экспрессией CD7 и цитоплазматического CD3, а также слабой реакцией с МКАТ к антигенам CD2 и CD4 в части клеток, при отсутствии реакции на CD5 и экспрессии CD8. В данном случае можно говорить о «переходном» фенотипе (Т-I \Rightarrow Т-II), когда клетка при наличии основных пан-Т-клеточных маркеров (CD7 и CD3) только начинает экспрессировать антигены CD2 и CD4 и не реагирует с МКАТ к другим антигенам, характерным для этого подварианта Т-ОЛЛ.

У 2 больных в возрасте 8 и 6 лет определен Т-II подвариант Т-клеточного ОЛЛ, поскольку бласты экспрессировали CD2-, CD5- и CD8-антигены (см. табл. 4).

Определение антигена CD2 на лейкоэмических клетках, согласно анализу, проведенному в Национальном институте рака (США), помогает выделить в отдельные группы пациентов с Т-ОЛЛ с лучшим и худшим прогнозом. Для пациентов, которые вошли в группу стандартного риска (1-я группа), отсутствие антигена CD2 было значительно худшим прогности-

ческим признаком, чем его наличие у больных из группы высокого риска (2-я группа). Пятилетняя «бессобытийная» выживаемость в 1-й группе составила 55,9%, во 2-й — 78,3% [10]. Таким образом, процент CD2⁺-лейкемических клеток при Т-клеточном ОЛЛ служит прогностическим фактором «бессобытийной» выживаемости после химиотерапии.

Наличие уникального маркера CD1a позволяет точно определить Т-III подвариант ОЛЛ, поскольку этот антиген экспрессирован только на кортикальных тимоцитах.

Известно, что во время селекции Т-клеток в кортикальной зоне тимуса более чем 90% тимоцитов элиминируются путем апоптоза. Базируясь на этой концепции, ученые из Дюссельдорфа (Германия) предложили выделять в отдельную группу Т-ОЛЛ с фенотипом кортикальных тимоцитов (CD1a и/или CD4⁺CD8⁺) как селекционно-обусловленные, а все другие иммунофенотипы Т-ОЛЛ как неселекционно-обусловленные. При этом отмечали большую «бессобытийную» выживаемость в течение 5 лет в группе больных с селекционно-обусловленным фенотипом, то есть с фенотипом кортикальных тимоцитов [11].

Дополнительными маркерами при кортикальном Т-ОЛЛ являются коэкспрессия CD4- и CD8-антигенов. При этом подварианте Т-ОЛЛ отмечен более благоприятный прогноз, особенно в том случае, когда клетки экспрессируют молекулы HLA-DR и CD10.

В целом, из 4 основных подвариантов Т-ОЛЛ кортикальный (Т-III) отличается клинически лучшим прогнозом, что, как полагают, связано с активацией механизмов апоптоза. Для зрелого Т-ОЛЛ (Т-IV) характерны наличие на мембране комплекса CD3 и экспрессия Т-клеточного рецептора. В пределах Т-IV выделяют две группы по наличию экспрессии α/β - или γ/δ -цепей мембранного Т-клеточного рецептора в сочетании с CD3 [12].

Согласно данным доступной литературы, существуют клинические и биологические различия между «ранними» (про-Т, пре-Т) и «поздними» (кортикальный, зрелый) Т-ОЛЛ, бластные клетки при которых отличаются по чувствительности к обычно применяемым препаратам, таким, как преднизолон, винкристин, аспарагиназа. Поэтому выделение про-Т- и пре-Т-ОЛЛ, так же, как и про-В-ОЛЛ, является важным в плане выбора схемы терапии и комбинации химиопрепаратов [13]. Выделение подварианта Т-ОЛЛ с бластами, соответствующими по иммунофенотипу кортикальным тимоцитам, позволяет надеяться на лучший терапевтический ответ и быстрое достижение ремиссии у детей за счет активации механизмов апоптоза.

Согласно клиническим данным, при подвариантах Т-ОЛЛ уровень лейкоцитов выше $20 \cdot 10^9/\text{л}$, возраст больных младше 1 года и старше 9 лет являются неблагоприятными параметрами [9].

Таким образом, основными маркерными признаками Т-клеточных ОЛЛ у детей является наличие цитоплазматического или мембранного CD3 и цитохимически определяемая активность кислой фосфатазы в виде одной гранулы в одном участке цитоплазмы. Иммунофенотипическое выделение подвариантов Т-ОЛЛ дает представление о происхождении, позво-

ляет выбрать и применить адаптированные протоколы лечения с учетом чувствительности бластных клеток к химиопрепаратам. Представляется реальным прогнозировать возможность рецидива и ожидаемую продолжительность жизни больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. French-American-British (FAB) Cooperative Group: proposals for the classification of the acute leukemias. Br J Haematol 1976; 33: 451–8.
2. Байдун ЛВ. Современная диагностика и классификация острой лимфобластной лейкемии. Гематол трансфузиол 1997; 42: 37–43.
3. Пинчук ВГ, Глузман ДФ, Надгорная ВА и др. Иммуноцитохимия и моноклональные антитела в онкогематологии. Киев: Наук думка, 1990. 232 с.
4. Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroup in childhood acute lymphoblastic leukemia: Experience of the BFM study 86. In: Recent results in cancer research. Berlin: Springer Verlag 1993; 131: 269–82.
5. Ludwig WD, Raghavachar A, Thiel E. Immunophenotypic classification of acute lymphoblastic leukemia. Clin Haematol 1994; 7: 235–61.
6. Бене МК, Кастолди Г, Напп В, Людвиг ВД и др. Предложения для иммунологической классификации острых лейкозов. Гематол трансфузиол 1996; 41: 43–5.
7. Глузман ДФ. Диагностическая цитохимия гемобластов. Киев: Наук думка, 1978. 216 с.
8. Глузман ДФ, Абраменко ИВ, Складченко ЛМ, Надгорная ВА. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. Киев: Морион, 1998. 335 с.
9. Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. The Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). Haematol 1998; 83: 967–73.
10. Uckun FM, Steinherz PG, Sather H, et al. CD2 antigen expression on leukemic cells as a predictor of event-free survival after chemotherapy for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. Blood 1996; 88: 4288–95.
11. Niehues T, Kapau P, Harms DO, et al. A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. Leukemia 1999; 13: 614–7.
12. Schott G, Sperling C, Schrappe M, Ratei R, et al. Immunophenotypic and clinical features of T-cell receptor gammadelta⁺ T-lineage acute lymphoblastic leukemia. Br J Haematol 1998; 101: 753–5.
13. Pieters R, den Boer ML, Durian M, et al. Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia — implications for treatment of infants. Leukemia 1998; 12: 1344–8.

MARKER IMMUNOPHENOTYPIC FEATURES IN BLASTS OF CHILDREN WITH T-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA

S. V. Yaremenko, V. A. Nadgornaya

Summary. T-lineage acute lymphoblastic leukaemias (ALL) represent approximately 12% of all ALL in children. They feature unfavorable prognosis and extraordinarily hard clinical course. T-cell ALL cannot be differentiated from B-cell ALL by morphocytochemical features; therefore, it is crucial to define the immunophenotype of blast cells. Immunophenotyping of blast cells in 168 children with ALL aged from 1 to 14 was carried out. In 23 patients T-ALL was revealed. Peculiarities of the immunophenotype of blast cells in T-I, T-II, and T-III subgroups of ALL were established in children.

Key Words: T-lineage acute lymphoblastic leukemia, immunophenotype of blast cells, markers.