

## Е.В. Вильчевская, В.Ю. Михайличенко, В.В. Конашенкова, Н.В. Лобкина ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА В-ЛИМФОБЛАСТНЫХ КЛЕТКАХ

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины»

**Вильчевская Е.В., Михайличенко В.Ю., Конашенкова В.В., Лобкина Н.В.** Гетерогенность экспрессии антигенов на В-лимфобластных клетках // Украинський морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 10-12.

Определение минимальной резидуальной болезни (МРБ) при лечении острых В-лимфобластных лейкозов у детей является одним из ключевых моментов в прогнозировании ремиссии и выздоровлении. Тяжесть диагностики МРБ определяется отсутствием четких диагностических критериев данной патологии. Нами исследована стабильность экспрессии антигенов лимфоцитов у детей с В-ОЛЛ. Гетерогенность распределения клеток по экспрессии исследованных маркеров оценивали качественно и количественно. Установлено, что появление на бластных клетках нехарактерных для данной стадии развития антигенов является признаком опухолевой трансформации клеток и также может быть применимо для мониторинга МРБ. Прогностическое значение имеет не только качественный состав антигенов на бластных клетках, но и интенсивность их флюоресценции, т.е. плотность распределения. Данные варианты иммунофенотипа бластных клеток позволили определить различные подвиды В-ОЛЛ и прогнозировать их течение, а также адекватность проводимой специфической терапии.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, гематононы, минимальная остаточная болезнь, интенсивность флюоресценции.

**Вильчевська К.В., Михайличенко В.Ю., Конашенкова В.В., Лобкіна Н.В.** Гетерогенність експресії антигенів на В-лімфобластних клітинах // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 10-12.

Визначення мінімальної резидуальної хвороби (МРХ) при лікуванні гострих В-лімфобластних лейкозів (В-ГЛЛ) у дітей є одним із ключових моментів у прогнозуванні ремісії й видужанні. Вага діагностики МРХ визначається відсутністю чітких діагностичних критеріїв даної патології. Нами досліджена стабільність експресії антигенів лімфоцитів у дітей з В-ГЛЛ. Гетерогенність розподілу клітин по експресії досліджених маркерів оцінювали якісно й кількісно. Установлено, що поява на бластних клітинах нехарактерних для даної стадії розвитку антигенів є ознакою пухлинної трансформації клітин і також може бути застосовне для моніторингу МРХ. Прогностичне значення має не тільки якісний склад антигенів на бластних клітинах, але й інтенсивність їх флюоресценції, тобто щільність розподілу. Дані варіанти імунотипу бластних клітин дозволили визначити різні підвиди В-ГЛЛ і прогнозувати їхній плин, а також адекватність проведеної специфічної терапії.

**Ключові слова:** гострий лімфобластний лейкоз, гематонони, мінімальна резидуальна хвороба, інтенсивність флюоресценції.

**Vilchevska K.V., Mykhaylichenko V., Konashenkova V., Lobkina N.** Heterogeneity of the antigen expression on B-lymphoid cells // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 10-12.

Detection of minimal residual disease is based on the using progenitor cell's markers with the most pronounced differences in the expression from normally-developing B- precursor and mature B-lymphocytes. Examined the expression of antigens CD10, CD34, CD58, CD20 on lymphoid blast cells from patients with diagnosed B-ALL. All of these antigens have the pronounced difference in fluorescence intensity on various degree of maturity cells which makes them useful for monitoring MRD. Found that in B-ALL tumor cells population surface antigens are not always expressed homogeneously, which leads to the appearance of non-classical phenotypes (bright/dim). Heterogeneity of antigen expression's fluorescence intensity was detected. These antigens are used for monitoring MRD. Therefore, despite the clear differences between tumor and normal cells, there are no single universal marker that would be applicable for monitoring MRD in all cases B-ALL.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, gematogons, minimal residual disease, the fluorescence intensity.

Определение минимальной резидуальной болезни (МРБ) при лечении острых В-лимфобластных (В-ОЛЛ) лейкозов у детей является одним из основных независимых прогностических факторов риска, критерием оценки ответа на терапию и полноты ремиссии [1-6]. Определение МРБ заключается в выявлении лейкоэмических клеток среди избытка нормальных клеток-предшественников (гематононов) в костном мозге пациентов на фоне проводимой антилейкемической терапии. Выявление резидуальных (остаточных) бластов при В-ОЛЛ основано на анализе маркеров или их комбинаций, присущих только опухолевым клеткам и отсутствующих на нормально - развивающихся гематононах и зрелых В-лимфоцитах [7-11]. Метод проточной цитометрии позволяет зафиксировать эти различия и выделить злокачественную популяцию на основании данных об параметрах свторассеяния мембранных антигенов на клетках различной степени зрелости [2,4,9]. Для мониторинга МРБ при В-ОЛЛ применяют различные стандартные комбинации моноклональ-

ных антител к лейкоз-ассоциированным антигенам. Однако, в популяции опухолевых клеток при В-ОЛЛ не всегда такие антигены экспрессированы гомогенно [1,2,10,11]. Анализ одновременно нескольких параметров позволяет выявлять некоторые несистематизированные комбинации маркеров, неклассические фенотипы (bright/dim), функциональная значимость которых не установлена.

**Целью** данного исследования была оценка стабильности экспрессии (гомогенность и гетерогенность) антигенов, приемлемых для мониторинга МРБ.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Работа является фрагментом научно-исследовательской работы Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины: «Разработать методы иммунофенотипичного мониторинга минимальной резидуальной болезни при клональной ремиссии В-клеточных лимфолейкозов» (№ государственной регистрации 0111U002045).

**Материал и методы исследования.** Объект

исследования – 68 пациентов с CD10-позитивным вариантом острого В-лимфобластного лейкоза – В-ОЛЛ (38 мальчиков и 30 девочек) в возрасте от 1 месяца до 16 лет, проходившие лечение в ДООЦ с октября 2009 г по ноябрь 2013 г. В качестве контрольной группы - образцы костного мозга пациентов без онкогематологических заболеваний (n=20). Диагноз Про-В-ОЛЛ, Common В-ОЛЛ и Пре-В-ОЛЛ был установлен в соответствии с ВОЗ-классификацией (EGIL-95) и на основании оценки иммунофенотипа опухолевых клеток методом проточной цитометрии. Материал для анализа - костный мозг. Иммунофенотипирование проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BD). Анализ данных с помощью программного обеспечения FACSComp (BD) - программа Cell-QUEST. Применяли следующие моноклональные антитела: CD34, CD20, CD19, CD22, CD10, CD58.

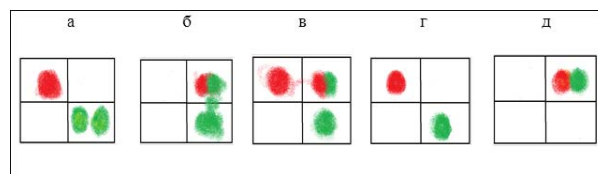
Для сравнений уровней экспрессии использовали значения средней интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity, MFI или СИФ). Гетерогенность распределения клеток по экспрессии исследованных маркеров оценивали качественно и количественно (при помощи коэффициента вариации (CV)). Также в опухолевой популяции определяли процентное содержание клеток позитивных по конкретному антигену.

**Результаты и их обсуждение.** В нашей работе мы проанализировали экспрессию антигенов, применяемых для мониторинга МРБ: CD34, CD20, CD10, CD58 на В-лимфоидных бластных клетках пациентов с установленным диагнозом В-ОЛЛ. Все эти антигены имеют выраженные различия по интенсивности флуоресценции на клетках различной степени зрелости, что делает возможным их применение для мониторинга МРБ. Для оценки гетерогенности экспрессии антигенов CD10, CD34, CD58, CD20 на клетках одной популяции нами была использована схема (рис.1), отражающая различные варианты коэкспрессии в пространстве любой двумерной гистограммы, где по оси абсцисс (log) отображена экспрессия антигена 1 (Ag 1), а по оси ординат (log) отображена экспрессия антигена 2 (Ag2).

Позитивная экспрессия антигенов CD10 и CD34 отражает определенную степень незрелости В-лимфобластов. Данные белковые молекулы никогда не экспрессируются на нормальных зрелых В-лимфоцитах. Их экспрессия, наряду с анализом других стадийно/линейно специфичных антигенов (TdT, IgM, CD20) позволяет соотнести иммунофенотип В-лимфобласта с иммуноподвариантом. Однако даже внутри «характерных» для экспрессии CD10 и CD34 иммуноподвариантов, наблюдали гетерогенность их распределения.

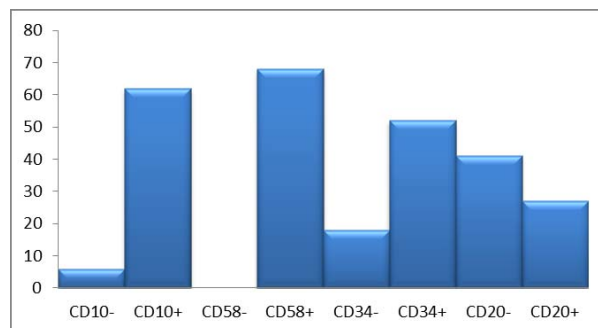
Было выявлено, что зачастую маркеры гомогенно экспрессировались далеко не всеми В-лимфобластами: в 9% (6 из 68 образцов КМ) составляли CD10-негативные В-ОЛЛ, в 26% случаев (n=18.) отсутствовала экспрессия CD34 (рис. 2). При этом в подгруппе CD10+ позитивных бластов в 50 случаях из 62 CD10+ (80%), экспрессия антигена была гомогенной, а в 12 образцах

(20%) присутствовали как CD10-позитивные, так и CD10-негативные клетки (рис. 1 б, в.)



**Рисунок 1.** Гетерогенность экспрессии поверхностных антигенов на мембране бластных клеток.

а - Гистограмма демонстрирует однородную экспрессию Ag2 и неоднородную коэкспрессию Ag1 клетками той же популяции; б - На гистограмме показан вариант однородной экспрессии Ag2, при котором неоднородным образом коэкспрессируется Ag1; в - На гистограмме есть популяция Ag1+/Ag2+, но при этом оба антигена демонстрируют гетерогенность экспрессии и есть популяции, позитивные только по одному антигену или Ag1+ или Ag2+; г - Гистограмма показывает гомогенности экспрессии антигенов Ag1+ Ag2+; д - Гистограмма показывает гомогенность экспрессии антигенов Ag1+ Ag2+ с наличием коэкспрессии Ag1+/Ag2+.



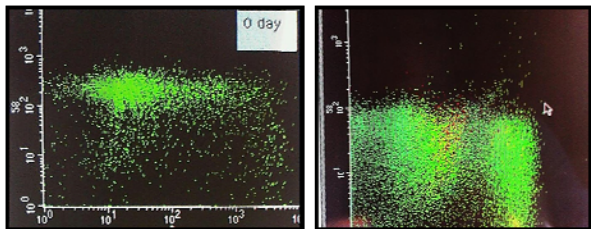
**Рисунок 2.** Гетерогенность экспрессии антигенов на бластных клетках пациентов с В-ОЛЛ

Во всех образцах костного мозга (КМ) с CD34-позитивными бластами (n=50 или 74%), в общем пуле бластных клеток определялись как CD34-позитивные, так и CD34-негативные клетки (рис. 1б,в). В 48 случаях (74%) все опухолевые клетки одновременно экспрессировали CD10 и CD34 (рис. 1а). В 2 образцах костного мозга (3%) определялись бласты, не экспрессировавшие ни CD10, ни CD34.

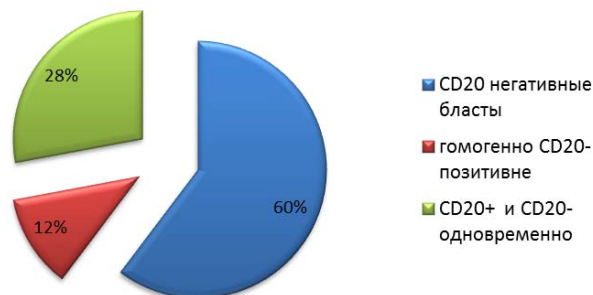
У 63 пациентов определяли экспрессию CD58 - МкАТ к молекулам, специфически экспрессируемым опухолевыми клетками в течение всего заболевания и позволяющие более точно определять уровень МРБ. Все пациенты (100%) демонстрировали позитивную экспрессию данного антигена (от 28 до 83%). Однако экспрессия данного антигена не была гомогенной. При проведении множественного мечения с другими антигенами, были выявлены субпопуляции с различными фенотипами: небольшая фракция В-клеток экспрессирует как CD34, так и CD58. Эта двойная экспрессия на графике выглядит не так, как гомогенная коэкспрессия или двойственная позитивность (рис.1а). Мы наблюдали два разных фенотипа, экспрессирующих высокий уровень одного маркера (либо CD34, либо CD58) и низкий уровень второго, т. е. В-клетки CD34+/CD58<sup>dim</sup> или CD34<sup>dim</sup>/CD58+ (рис.3).

Мы обнаружили не только количественные различия в экспрессии этих «лейкоз-ассоци-

ированных» антигенов на бластных клетках с позитивной экспрессией CD58, но и значительную гетерогенность в интенсивности флуоресценции данного маркера на мембране (от 32 до 726 усл.ед), что отражает плотность распределения его на мембране лимфобласта.



**Рисунок 3.** Гетерогенность экспрессии антигена CD58 на бластных клетках В-ОЛЛ



**Рисунок 4.** Гетерогенность экспрессии антигена CD20 на бластных клетках В-ОЛЛ

Еще одним определяемым нами стадийно/линейно специфическим антигеном был антиген CD20. В норме CD20 экспрессируется только на зрелых В-лимфоцитах и никогда на созревающих. Однако при острых лейкозах встречается аномальная экспрессия этого антигена опухолевыми бластами. Так, клетки с четкими признаками незрелости: TdT<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup> имели гиперэкспрессию CD20. Появление на бластных клетках нехарактерных для данной стадии развития антигенов является признаком опухолевой трансформации клеток и также может быть применимо для мониторинга МРБ. Мы определяли экспрессию CD20 у всех 68 пациентов. В 41 случае (60%) опухолевые клетки были CD20-негативными, а 27 человек имели позитивную экспрессию CD20 (40%) (рис 4).

Из позитивных вариантов в 9 случаях (12%) – клетки были гомогенно CD20-позитивными, в то время как в костном мозге 19 больных (28%) определялись как CD20-позитивные, так и CD20-негативные клетки. В 74 % случаев была определена асинхронная экспрессия антигенов CD34 и CD20 (20 детей) и у большинства CD20-позитивных пациентов (25 из 27, что составило 89%) клетки коэкспрессировали CD10<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>.

**Выводы:** Для всех исследованных маркеров не было отмечено статистически значимых корреляционных связей экспрессии антигенов с полом и возрастом пациентов, количеством бластов в костном мозге, коэкспрессией миелоидных маркеров. Таким образом, для опухолевой популяции В-ОЛЛ характерна гетерогенность экспрессии и неоднородность интенсив-

ности флуоресценции антигенов, применяемых для определения МРБ. Поэтому, несмотря на четкие отличия между опухолевыми и нормальными клетками нет единственного универсального маркера, который был бы применим для мониторинга МРБ во всех случаях В-ОЛЛ.

**Перспективы дальнейших исследований.** Перспективным направлением данного исследования является выявление минимальных признаков МРБ, которые не определяются стандартными методами диагностики, для раннего и полноценного применения специфической терапии у детей с В-ОЛЛ, а также контроля качество используемых схем лечения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow / G. Basso, M. Veltroni, M. G. Valsecchi [et al.]. // J.Clin. Oncol. – 2009. – Vol. 27. – P. 5168-5174.
2. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia / M. N. Dworzak, G. Froschl, D. Printz [et al.]. // Blood. – 2002. – Vol. 99. – N 6. – P. 1952-1958.
3. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia / S. Patricia, K. Laura, C. Xiaohua [et al.]. // Blood. – 2010. – Vol. 115. – P. 4657-4663.
4. Bjorklund E. Flow cytometric follow up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia / E. Bjorklund, J. Mazur, S. Soderhall, A. Porwit-MacDonald // Leukemia. - 2003. - Vol. 17. - P. 138-148.
5. Савва Н.Н. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ) / Н. Н. Савва, О. В. Красько, М. В. Белевцев // Онкогематология. -2009. - №2. - С. 17-21.
6. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study / M. J. Borowitz, M. Devidas, S. P. Hunger [et al.]. // Blood. - 2008. - Vol. 111. - N12. - P. 5477-5485.
7. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukaemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value / M. B. Vidriales, J. J. Perez, M. C. Lopez-Berges [et al.]. // Blood. - 2003. - Vol. 101. - N12. - P. 4695-4700.
8. Borowitz, M. J. Minimal residual disease detection in childhood ALL / M. J. Borowitz // Haematopoiesis Immunology. - 2010. - Vol. 7. - N1. - P. 24-35.
9. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008 / M. Bruggemann, A. Schrauder, T. Raff [et al.]. // Leukemia. - 2010. - Vol. 24. - P. 521-535.
10. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia / M. Krampera, O. Perbellini, C. Vincenzi [et al.]. // Haematologica. - 2006. - Vol. 91. - N8. - P. 1109-1112.
11. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia / E. Coustan-Smith, J. Sancho, M. L. Hancock [et al.]. // Blood. – 2002. – Vol. 100. – N 7. – P. 2399-2402.

Надійшла 14.12.2013 р.

Рецензент: проф. В.М.Волошин