

С.А. Кузнецова^{1,2}, О.С. Федянина^{1,2}, А.О. Закирова¹, А.Н. Хвастунова^{1,2},
Ф.И. Атауллаханов^{1,2}, А.А. Масчан¹

КЛЕТОЧНЫЙ БИОЧИП – НОВЫЙ МЕТОД КОМБИНИРОВАННОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ, ²ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, РФ



Диагностика острых лейкозов (ОЛ) основана на обнаружении в костном мозге (КМ) пациентов повышенного (надпорогового) количества бластных клеток и определении их линейной принадлежности параллельно с помощью исследования их морфологии и цитохимии в мазках и определения на их поверхности дифференцировочных антигенов методом проточной цитофлуориметрии. Цель исследования: апробация разработанного ранее клеточного биочипа на основе антител (АТ) к поверхностным дифференцировочным антигенам (АГ) лейкоцитов, позволяющего исследовать морфологию и цитохимию лейкоцитов, предварительно рассортированных по поверхностным CD-АГ, для морфологической диагностики наличия ОЛ и определения его линейности. Материалы и методы исследования: пунктаты КМ 177 пациентов с ОЛ и 35 пациентов без ОЛ (3 пациента с хроническим миелоидным лейкозом, 8 пациентов с ЮММЛ, 4 пациента с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) в ремиссии и 20 здоровых доноров) были исследованы с помощью биочипов, содержащих АТ к 35 диагностически значимым CD-АГ и отрицательный контроль. Результаты: сформулированы критерии предварительной морфологической диагностики ОЛ с помощью клеточного биочипа, позволяющие определить наличие ОЛ с чувствительностью 94% и специфичностью 97% и разделить пациентов с острым В-лимфобластным лейкозом, острым Т-лимфобластным лейкозом и ОМЛ с чувствительностью не ниже 97% и специфичностью не ниже 98%. Заключение: использование клеточного биочипа позволяет быстро и с высокой точностью определить наличие ОЛ, разделить различные варианты ОЛ и в случае надобности уточнить диагноз до подгруппы по FAB-классификации. Предлагаемая методика имеет низкую себестоимость и может быть проведена в любой лаборатории, осуществляющей морфологический и цитохимический анализ пунктатов КМ.

Ключевые слова: острый лейкоз, диагностика, морфология, иммунофенотип, дифференцировочные антигены, клеточный биочип.

Цит.: С.А. Кузнецова, О.С. Федянина, А.О. Закирова, А.Н. Хвастунова, Ф.И. Атауллаханов, А.А. Масчан. Клеточный биочип – новый метод комбинированной морфологической диагностики острых лейкозов у детей. *Педиатрия*. 2019; 98 (4): 91–97.

S.A. Kuznetsova^{1,2}, O.S. Fedyanina^{1,2}, A.O. Zakirova¹, A.N. Khvastunova^{1,2},
F.I. Ataulakhanov^{1,2}, A.A. Maschan¹

CELL BIOCHIP – A NEW METHOD OF COMBINED MORPHOLOGICAL DIAGNOSIS OF ACUTE LEUKEMIA IN CHILDREN

¹National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev;
²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology RAS, Moscow, Russia

Контактная информация:

Кузнецова Софья Алексеевна – к.ф.-м.н., ученый секретарь Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины
ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, МЗ РФ
Адрес: Россия, 117997, г. Москва,
ул. Саморы Машела, 1
Тел.: (495) 287-65-70, доб. 5422,
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com
Статья поступила 26.09.18,
принята к печати 26.06.19.

Contact Information:

Kuznetsova Sofya Alekseevna – Ph.D., scientific secretary of Graduate School of Molecular and Experimental Medicine, National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev
Address: Russia, 117997, Moscow, SPS-7, Samory Mashela str., 1
Tel.: (495) 287-65-70, ext. 5422,
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com
Received on Sep. 26, 2018,
submitted for publication on Jun. 26, 2019.

Acute leukemia (AL) diagnostics is based on the detection of an increased (above threshold) number of blast cells in patients' bone marrow (BM) and determining their linear affiliation in parallel by examining their morphology and cytochemistry in smears and determining differentiating antigens on their surface using flow cytometry. Objective of the research: approbation of a previously developed cell biochip based on antibodies (AB) to leukocyte surface differentiation antigens (AG), that allows to explore the morphology and cytochemistry of leukocytes, previously sorted by surface CD-AG, for morphological AL diagnosis and determining its linearity. Materials and methods: BM punctates of 177 patients with AL and 35 patients without AL (3 patients with chronic myeloid leukemia, 8 patients with JMML, 4 patients with acute myeloblastic leukemia (AML) in remission and 20 healthy donors) were studied using biochips containing AB to 35 diagnostically significant CD-AG and negative control. Results: the criteria for AL preliminary morphological diagnosis with cell biochip were formulated, allowing to determine the AL presence with acute B-lymphoblastic leukemia, acute T-lymphoblastic leukemia and AML with sensitivity not lower than 97% and specificity not lower than 98%. Conclusion: the use of cell biochip allows to quickly and accurately diagnose AL, to separate the different variants of AL and, if necessary, to clarify the diagnosis before the subgroup on FAB classification. The proposed method has a low cost and can be performed in any laboratory that carries out morphological and cytochemical analysis of BM punctates.

Keywords: acute leukemia, diagnostics, morphology, immunophenotype, differentiation antigens, cell biochip.

Quote: S.A. Kuznetsova, O.S. Fedyanina, A.O. Zakirova, A.N. Khvastunova, F.I. Ataullakhanov, A.A. Maschan. Cell biochip – a new method of combined morphological diagnosis of acute leukemia in children. *Pediatrics*. 2019; 98 (4): 91–97.

Диагностика острых лейкозов (ОЛ) основывается на обнаружении в костном мозге (КМ) более 20–25% патологических незрелых (бластных) клеток и определении их линейной принадлежности [1]. Определение как размеров бластной популяции в пунктате КМ, так и ее принадлежности к той или иной линии клеток и степени дифференцированности, производится прежде всего на стадии первичной диагностики с помощью оценки морфологии и цитохимических характеристик на мазках, а затем независимо с помощью иммунофенотипирования, т.е. определения на поверхности лейкоцитарных клеток маркеров дифференцировки (cluster of differentiation/ designation (CD-антигенов (АГ))) чаще всего методом проточной цитофлуориметрии. Использование метода, совмещающего определение поверхностных АГ лейкоцитов с полноценным анализом их морфологии и цитохимии, позволило бы существенно повысить точность предварительной морфологической диагностики ОЛ. Кроме того, выделение бластной популяции при использовании морфологии и иммунофенотипирования происходит по разным признакам: при морфологическом анализе в мазке – по размеру клеток, структуре хроматина, наличию ядрышек, соотношению размеров ядра и цитоплазмы, наличию гранулярности, а при цитометрическом анализе – по уровню экспрессии CD45 и боковому светорассеянию. Вследствие этого популяции клеток, выделяемые для анализа обоими методами, не обязательно совпадают, что может приводить к расхождениям в интерпретации размеров и состава бластной популяции по данным морфологии и проточной цитофлуориметрии. Параллельный анализ морфологии и поверхностных АГ лей-

коцитов позволил бы разрешать противоречия при сопоставлении данных морфологического и иммунологического анализа и увеличить надежность диагностики ОЛ.

В НИИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева разработан метод параллельного анализа поверхностных АГ лейкоцитов и их морфологии и цитохимии, основанный на использовании клеточного биочипа – прозрачной пластиковой подложки с иммобилизованными антителами (АТ) к поверхностным CD-АГ лейкоцитов человека [2]. Мононуклеарная фракция, выделенная из крови или пунктата КМ методом центрифугирования в градиенте плотности (фиколл/гипак), инкубируется без перемешивания на клеточном биочипе. При оседании на поверхность биочипа каждая клетка плотно связывается с ней лишь в том случае, если попадает в область иммобилизации АТ к АГ, присутствующему на ее поверхности. Поэтому после отмывки неплотно неспецифически связавшихся клеток на поверхности биочипа остаются заполненные клетками области, в каждой из которых локализованы лейкоциты, несущие на поверхности определенный дифференцировочный АГ. После этого препарат связавшихся с биочипом клеток высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают для дальнейшего морфологического или цитохимического исследования. Таким образом, клеточный биочип позволяет исследовать морфологию и активность линейноспецифических ферментов (например, миелопероксидазы, неспецифической эстеразы, тартрат-резистентной кислой фосфатазы), клеток, предварительно рассортированных на препарате по их поверхностным CD-АГ.

Ранее нами было показано, что связывание мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров и пациентов с лейкозами из

зрелых В-лимфоцитов (хронический лимфобластный лейкоз – ХЛЛ, волосатоклеточный лейкоз) с биочипом специфично, а морфология связавшихся с биочипом лейкоцитов совпадает с морфологией тех же типов клеток на мазке [2, 3]. В настоящей работе описаны возможности морфологической диагностики наличия ОЛ и определения его линейной принадлежности с помощью исследования морфологии и цитохимии лейкоцитов пунктата КМ, рассортированных с помощью клеточных биочипов.

Материалы и методы исследования

Изготовление биочипов. В панель биочипа входили моноклональные иммуноглобулины класса G к CD2, CD3, CD5, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD38, CD45, CD56, HLA-DR, IgM (ООО «Сорбент», Россия) и CD1a, CD4, CD8a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD23, CD33, CD41, CD61a, CD45RA, CD45RO, CD64, CD117, CD123, капша и лямбда легким цепям иммуноглобулинов, mouse IgG₁ (eBioscience, США). Биочипы изготавливали путем адсорбции АТ на поливинилхлоридных подложках в соответствии с ранее опубликованным протоколом [2–4]. Готовые биочипы хранили в высушенном виде в герметичном контейнере с осушителем при 4 °С до 6 мес.

Выделение лейкоцитов из пунктата КМ и их анализ при помощи клеточного биочипа. Суспензию, содержащую 5–8 млн моноклеарных клеток, выделенных из пунктата КМ методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гипак (Histopaque-1077, Sigma), в фетальной телячьей сыворотке, наносили на поверхность биочипа и инкубировали 45 мин при температуре 10–12 °С, затем отмывали от несвязавшихся клеток и высушивали для окрашивания по Паппенгейму или проведения цитохимических реакций в соответствии с ранее описанным протоколом [2]. Для части пациентов был также выполнен последовательный анализ на активность α -нафтил бутират эстеразы и нафтол AS-D хлорацетат эстеразы по протоколу, описанному ранее [4].

Клеточные линии. В качестве контроля были использованы клетки линий CCRF-CEM (Т-лимфоциты), HL-60 (промиелоциты), Ramos (В-лимфоциты L3) и U937 (монобласты), любезно предоставленные НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Анализ данных. Морфологию лейкоцитов на биочипе анализировали при помощи светового микроскопа Nikon Eclipse Ni в светлом поле и камеры Nikon DS-Ri1. Для каждого из пациентов проводили подсчет доли клеток с бластной морфологией среди лейкоцитов, связавшихся с каждым из иммобилизованных на биочипе АТ.

Пациенты. В работе исследованы пунктаты КМ 177 пациентов, поступивших в НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева с подозрением на ОЛ (97 мальчиков, 80 девочек в возрасте от 0 до 17 лет). Для определения порога бластных клеток были также исследованы пунктаты КМ 11 пациентов с хроническими миелоидными лейкозами (3 пациента с ХМЛ, 8 пациентов с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом), пунктаты КМ 4 пациентов, перенесших острый миелобластный

лейкоз и поступивших с подозрением на рецидив, не подтвердившийся по данным морфологического исследования и проточной цитометрии, и 20 здоровых семейных доноров в возрасте от 5 до 46 лет, полученные в процессе сбора КМ для проведения трансплантации. Согласие на забор КМ и будущие биомедицинские исследования было получено.

Результаты и их обсуждение

При разработке панели биочипа были использованы наборы CD-АГ, рекомендуемые для диагностики острых лимфобластных и острых миелобластных лейкозов у детей и подростков в соответствии с действующими Федеральными клиническими рекомендациями [5–7], а также данные о возможности использования экспрессии CD117 [8] и CD123 [9, 10] на лейкоцитах КМ для диагностики ОЛ и определения минимальной остаточной болезни. Расположение пятен АТ на биочипе и вид биочипа со связавшимися моноклеарными клетками, выделенными из пунктатов нормального КМ и КМ пациентов с различными ОЛ, после окраски для морфологического анализа представлены на рис. 1.

Ранее было показано, что при инкубировании суспензии лейкоцитов с биочипом без перемешивания плотность связывания клеток с каждым из иммобилизованных АТ пропорциональна доле клеток, несущих на поверхности соответствующий АГ, в исходной суспензии [2]. Поскольку при ОЛ в пунктате КМ, как правило, за счет подавления остальных ветвей кроветворения наблюдается доминирование одного типа клеток, к которому относится бластная популяция, изменения в распределении плотности заполнения клетками различных пятен биочипа по сравнению с нормой уже могут указывать на линейную принадлежность опухолевых клеток. Так, на рис. 1 при сравнении плотности связывания клеток с различными АТ на биочипе для различных ОЛ (панели в, г и д) с данными для нормального КМ (панель б) можно заметить увеличение плотности связывания клеток с анти-CD10 и анти-CD19 для В-ОЛЛ (рис. 1д), анти-CD41 и анти-CD61 для ОМЛ М7 (рис. 1г) и с анти-CD64 для ОМЛ М5 (рис. 1в).

Для того, чтобы анализ пунктата КМ с помощью клеточного биочипа мог быть использован для диагностики ОЛ, необходимо выполнение следующих условий:

1) совпадение морфологии как нормальных, так и патологических клеток, связавшихся с

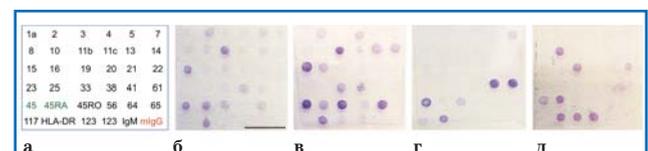


Рис. 1. Схема расположения АТ на клеточном биочипе (а) и вид биочипа со связавшимися моноклеарными клетками, выделенными из пунктатов нормального КМ (б) и КМ пациентов с острым монобластным лейкозом (ОМЛ М5) (в), острым мегакариобластным лейкозом (ОМЛ М7) (г) и острым В-лимфобластным лейкозом, ВП вариант (д). Масштабный отрезок соответствует 1 см.

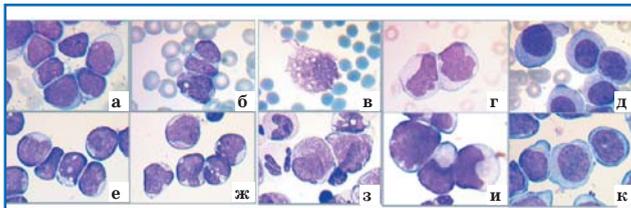


Рис. 2. Сравнение морфологии опухолевых клеток одних и тех же пациентов с различными подтипами острого миелоидного лейкоза в мазке (а–д) и на биочипе (е–к): ОМЛ M1 (а – мазок, е – биочип, анти-HLA-DR), ОМЛ M2 (б – мазок, ж – биочип, анти-CD7), ОМЛ M3 (в – мазок, з – биочип, анти-CD45RA), ОМЛ M4 (г – мазок, и – биочип, анти-CD2), ОМЛ M5 (д – мазок, к – биочип, анти-CD33). Окраска по Паппенгейму, ув. 1000.

биочипом, с морфологией клеток того же типа на мазке нативного КМ. Выполнение этого условия позволит использовать морфологию для выделения бластной популяции;

2) наличие диагностического критерия ОЛ на основании количества бластных клеток, связавшихся с одним из пятен иммобилизованных на биочипе АТ. Поскольку при работе с биочипом выделяется мононуклеарная фракция лейкоцитов КМ (без зрелых гранулоцитов), критерий 20% или 25% бластов от всех ядерных клеток, применяемый в мазке, на биочипе использован быть не может;

3) специфичность связывания лейкоцитов с иммобилизованными на биочипе АТ. В этом случае биочип позволяет определять иммунофенотип бластных клеток на основании наличия или отсутствия их связывания с АТ к диагностически важным АГ.

На рис. 2 представлено сравнение морфологии опухолевых клеток одних и тех же пациентов с различными подтипами острого миелоидного лейкоза в мазке (верхний ряд) и на биочипе (нижний ряд). Данные результаты показывают, что морфология бластных клеток в мазке и на биочипе не отличается. Поэтому морфологические параметры опухолевых клеток, используемые для характеристики бластной популяции в мазках КМ, могут быть использованы и для клеток, связавшихся с клеточным биочипом.

Поскольку при исследовании пунктата КМ с помощью клеточного биочипа анализируется только мононуклеарная фракция, пороговая доля бластных клеток для определения ОЛ может быть выше 20% и должна быть определена специально (рис. 3).

Анализ представленных на рис. 3 данных показывает, что использование доли лейкоцитов с бластной морфологией большей либо равной 25% от всех CD45RA+ мононуклеаров на биочипе в качестве критерия наличия ОЛ дает чувствительность 94% и специфичность 97%.

Для нормальных клеток периферической крови ранее было доказано, что неспецифическое связывание лейкоцитов с биочипом не превышает 3% [2]. В целях исследования возможности использования наличия или отсутствия связывания клеток бластной морфологии с АТ

к CD-АГ для определения иммунофенотипа опухолевых клеток мы провели сравнение набора АГ, с АТ к которым связываются лейкоциты линий CCRF-CEM, HL-60, Ramos и U937, с их иммунофенотипом, определенным методом проточной цитофлуориметрии. Результаты показали, что клетки линии CCRF-CEM на биочипе связываются с АТ к CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD15; HL-60 – с АТ к CD13, CD15, CD33, CD64 и CD7; Ramos – с АТ к CD10, CD19, CD20, CD22, CD25 и CD38; U937 – с АТ к CD7, CD11b, CD11c, CD13, CD15, CD33, CD56, CD64. Экспрессия всех указанных маркеров на поверхности лейкоцитов клеточных линий и отсутствие экспрессии других CD-АГ, входящих в панель биочипа, была подтверждена методом проточной цитофлуориметрии. Доли клеток, несущих на поверхности исследуемые CD, определяемые с помощью биочипа и проточной цитофлуориметрии, для всех четырех линий клеток также хорошо согласуются между собой за небольшими исключениями. Доля клеток линии CCRF-CEM, положительных по CD15, клеток линии HL-60, положительных по CD7, и клеток U937, положительных по CD11c, по данным проточной цитофлуориметрии, была высокой (более 60%), в то время как плотность связывания упомянутых линий клеток с АТ к указанным АГ составляла менее 30% от максимальной. Все АГ, для которых обнаружено расхождение между данными биочипа и проточной цитофлуориметрии, экспрессируются на исследуемых клеточных линиях aberrantly, т.е. их присутствие не характерно для нормальных клеток данного типа. Для линейноспецифических CD-АГ данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии и с помощью клеточного биочипа, совпадают. Полученные результаты позволяют предположить, что связывание бластных клеток с иммобилизованными на биочипе АТ к линейноспецифическим CD-АГ может быть использовано для определения линейности лейкоза.

На основании полученных данных может быть предложен следующий алгоритм исполь-

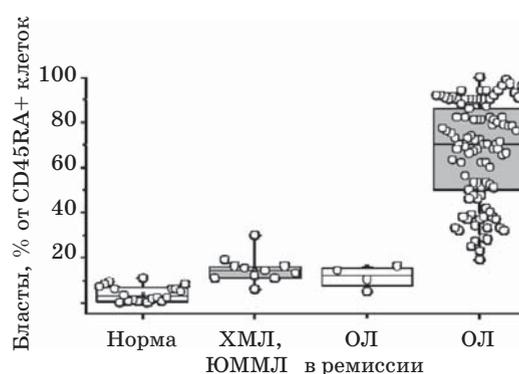


Рис. 3. Доля клеток бластной морфологии от всех мононуклеаров, связавшихся на биочипе с анти-CD45RA, для 20 здоровых доноров, 3 пациентов с ХМЛ, 8 с ЮММЛ, 116 пациентов с ОЛ и 4 пациентов с ОМЛ в состоянии ремиссии.

зования клеточного биочипа в морфологической диагностике ОЛ.

1. Суспензия мононуклеарных клеток, выделенных из пунктата КМ пациента, инкубируется с клеточным биочипом, и после отмывки неспецифически связавшихся клеток биочип высушивается и окрашивается для морфологического исследования. На первом этапе проводится подсчет доли клеток с бластной морфологией среди всех лейкоцитов, связавшихся с АТ к CD45RA. В случае, если количество бластов превышает 25% от всех клеток, связавшихся с анти-CD45RA, у пациента предполагают ОЛ.

2. Для определения линейности лейкоза далее исследуется наличие бластов, связавшихся со всеми иммобилизованными на биочипе АТ. Если клетки с бластной морфологией составляют более 2% от всех клеток, связавшихся с данным АТ, предполагают, что опухолевая популяция положительна по соответствующему АГ.

3. При связывании бластных клеток с АТ к любым двум АГ из числа CD10, CD19 и CD22 у пациента предполагают острый В-лимфобластный лейкоз. Исследование 124 пунктатов КМ пациентов с ОЛ с помощью клеточного биочипа показало, что данный критерий обладает чувствительностью 98% и специфичностью 100%.

4. Для выделения группы острых Т-лимфобластных лейкозов может быть использовано наличие связывания бластов с АТ к CD7, CD5, CD1a, CD2 и CD3 и критерии, описанные в литературе [1, 11], однако чувствительность и специфичность данных критериев не определялась в связи с малым количеством исследованных пациентов (4 из 177).

5. Связывание бластных клеток с АТ к любому из АГ CD41 или CD61 позволяет поставить пациенту диагноз острый мегакариоцитарный лейкоз (ОМЛ М7) с чувствительностью 91% и специфичностью 100%.

6. Для выделения группы острых миелоидных лейкозов исследуется положительность бластной популяции по CD-АГ, специфичным для клеток миелоидной и/или моноцитарной линий дифференцировки и экспрессируемым на опухолевых клетках при ОМЛ (CD11c, CD13, CD13, CD14, CD33, CD64, CD117) [12, 13], а также CD11b и CD15, преимущественно экспрессируемым на миелоидных и моноцитарных клетках, но не являющихся абсолютно специфичными для них [11, 12]. Для проведения данного анализа может быть рассчитан так называемый миеломоноцитарный балл исследуемого ОЛ, составляющий сумму единиц, начисляемых за связывание бластов на биочипе с АТ к каждому из АГ CD11c, CD13, CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, и по 0,5 балла за связывание бластов с анти-CD11b или CD15. Рассчитанный на основании анализа пунктата КМ с помощью клеточного биочипа миеломоноцитарный балл составлял от 0 до 2,5 для острых лимфобластных лейкозов и от

1 до 7 для острых миелобластных лейкозов, причем использование миеломоноцитарного балла, большего либо равного 2, для выделения пациентов с подвидами ОМЛ М1, М2, М3, М4 и М5 давало в исследованной нами выборке чувствительность 97% и специфичность 98%. Дальнейшая дифференцировка подвидов ОМЛ может быть проведена с помощью анализа на активность ферментов, специфичных для клеток миелоидного ряда (неспецифической эстеразы и миелопероксидазы или специфической эстеразы).

Для иллюстрации применения описанного алгоритма для диагностики ОЛ приведем два клинических примера, в которых анализ пунктата КМ пациента на клеточном биочипе проводился без выяснения предварительного диагноза, параллельно со стандартными диагностическими процедурами.

Клинический пример 1. Пациент С., 8 лет, поступил в НИИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева с предварительным диагнозом «острый промиелоцитарный лейкоз». При анализе мононуклеаров, выделенных из пунктата КМ пациента, с помощью клеточного биочипа, среди клеток, связавшихся с анти-CD45RA, было выявлено 66% промиелоцитов, что позволило предположить у пациента острый промиелоцитарный лейкоз. Атипичные промиелоциты также связывались на биочипе с АТ CD11b, CD13, CD33 и CD38. Миеломоноцитарный балл, рассчитанный по описанной ранее схеме, составляет 2,5, что позволяет на основе приведенного выше алгоритма диагностики предположить наличие у пациента острого миелоидного лейкоза. Таким образом, на основании анализа пунктата КМ с помощью клеточного биочипа у пациента был предположен острый промиелоцитарный лейкоз.

В миелограмме пациента при поступлении обнаружена тотальная инфильтрация популяцией атипичных промиелоцитов (84–96% от всех ядерных клеток), встречались пучки палочек Ауэра. Все ростки нормального костномозгового кроветворения, кроме лимфоидного, угнетены. Иммунофенотипирование пунктата КМ выявило наличие бластной популя-

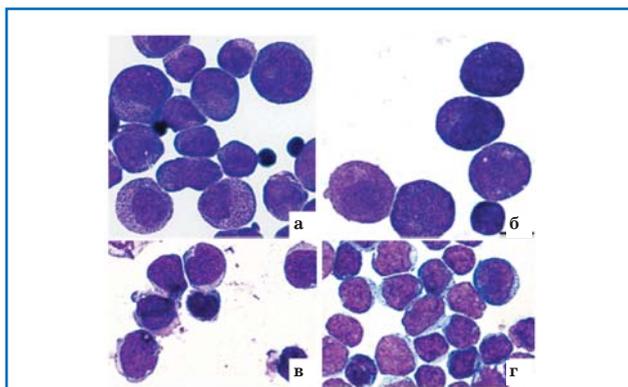


Рис. 4. Морфология мононуклеаров КМ пациентов из клинических примеров 1 и 2, связавшихся с АТ на клеточном биочипе, после окраски по Паппенгейму.

Пациент С., клинический пример 1, анти-CD45RA (а) и анти-CD33 (б); пациентка Ч., клинический пример 2, анти-CD19 (в), анти-HLA-DR (г); ув. 1000, длина масштабного отрезка 10 мкм.

ции размером 55% с иммунофенотипом CD2+ CD13+ CD33+ CD34+ CD45+ CD87+ CD117+ CD123+ MPO+ с высоким уровнем гранулярности. При исследовании методом FISH была обнаружена транслокация t(15;17), молекулярно-генетическое исследование подтвердило наличие хромосомной транслокации t(15;17) PML/RARA. Окончательный диагноз: острый промиелоцитарный лейкоз.

Клинический пример 2. Пациентка Ч., 15 лет, поступила с подозрением на острый миелобластный лейкоз. При анализе мононуклеаров, выделенных из пунктата КМ, с помощью клеточного биочипа, среди клеток, связавшихся с анти-CD45RA, было обнаружено 52% бластов и промиоцитов, что позволило предположить наличие у пациентки ОЛ. Клетки данной популяции на биочипе связывались также с АТ к CD4, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD38, CD117 и CD123. Таким образом, миеломоноцитарный балл, вычисленный на основании связывания клеток бластной морфологии с АТ на биочипе, составляет 4, что позволяет предположить наличие у пациентки острого миелоидного лейкоза. Проведенный на биочипе анализ на цитохимическую активность показал практически полное отсутствие активности нафтол AS-D хлорацетат эстеразы в мононуклеарах КМ (менее 1%), что свидетельствует о подавлении гранулоцитарного ростка. Полученные результаты позволили предположить наличие у пациентки острого монобластного лейкоза (ОМЛ М5) с коэкспрессией CD19.

В миелограмме пациентки были обнаружены бластные клетки (74%), промиоциты (6%) и моноциты (6%), резкое сужение нейтрофильного и лимфоидного ростков и уменьшение количества мегакариоцитарных и эритроидных клеток. Цитохимические исследования показали активность миелопероксидазы в 3% лейкоэмических клеток и наличие в большинстве из них активности неспецифической α -нафтил ацетат эстеразы, ингибируемой NaF. По данным проточной цитофлуориметрии, в пунктате КМ пациента была выделена бластная популяция, составляющая 55% от общего количества ядерных клеток и положительная по CD4, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD38, CD117, CD133. Таким образом, на основании данных морфологии, цитохимии и проточной цитофлуориметрии пациентке был поставлен диагноз «острый миелоидный лейкоз, М5а вариант» и подтверждена коэкспрессия CD19 на опухолевых клетках, обнаруженная с помощью клеточного биочипа.

Обсуждение

Идея проведения иммунофенотипирования «на стеклах» (иммуноцитохимии на мазках) реализована давно, с детекцией как АТ к исследуемому АГ (первичных АТ), так и с применением различных сэндвич-методов, и с использованием для детекции как флуоресцентной метки, так и ферментов и их колориметрических субстратов (систем пероксидаза хрена – ТМВ или

ДАВ, щелочная фосфатаза – ВСIP/NBT) [14, 15]. Однако если ранее удавалось детектировать экспрессию лишь одного АГ на препарате, описанный в данной работе метод позволяет расширить типизируемую панель до десятков кластеров дифференцировки на одном биочипе. Кроме того, ранее применяемые методы не давали возможности морфологической и цитохимической характеристики клеточной популяции, экспрессирующей тот или иной АГ, в то время как клеточный биочип позволяет проводить как расширенное иммунофенотипирование, так и морфоцитохимическое исследование на одном препарате. Предварительные результаты проведения иммунофенотипирования мононуклеаров КМ на биочипах указывают на высокую степень корреляции полученных данных с показателями, полученными при иммунофенотипировании на проточном цитофлуориметре.

Клеточный биочип как метод, сочетающий полный морфоцитохимический анализ лейкоцитов КМ с исследованием поверхностных CD-АГ, существенно повышает информативность морфологической диагностики, позволяя определить иммунофенотип клеток определенной морфологии (например, бластов при ОЛ) и, наоборот, исследовать морфологический состав клеток, положительных по тому или иному поверхностному АГ. Данная информация, которую не позволяет получить ни морфологическое, ни цитометрическое исследование, может быть использована как в диагностических, так и в исследовательских целях.

Заключение

Использование клеточного биочипа для анализа морфологии, цитохимической активности и иммунофенотипа мононуклеаров КМ позволяет быстро и с высокой точностью определить наличие ОЛ, разделить В-ОЛЛ, Т-ОЛЛ и ОМЛ и в случае надобности уточнить диагноз до подгруппы по FAB-классификации. Описанная в данной работе методика имеет низкую себестоимость, не требует сложного оборудования и может быть проведена в любой лаборатории, осуществляющей морфологический и цитохимический анализ пунктатов КМ.

Финансирование: работа частично поддержана грантом РФФИ №18-015-00272.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Kuznetsova S.A.  0000-0001-5946-0026

Fedyanina O.S.  0000-0001-7131-8006

Zakirova A.O.  0000-0001-9475-3318

Khvastunova A.N.  0000-0002-7117-0168

Ataullakhanov F.I.  0000-0003-3403-181X

Maschan A.A.  0000-0002-0016-6698

Литература

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO classification of tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed., World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press, 2017.

2. Khvastunova AN, Kuznetsova SA, Al-Radi LS,

Vylegzhanina AV, Zakirova AO, Fedyanina OS, Filatov AV, Vorobjev IA. & Ataullakhanov, F. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. Scientific Reports. 2015; 5: 12573.

3. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М., Федянина О.С., Горгидзе Л.А., Луговская С.А., Наумова Е.В., Джулакян У.Л., Филатов А.В., Атауллаханов Ф.И., Кузнецова С.А. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. Онкогематология. 2015; 1: 37–45.

4. Федянина О.С., Закирова А.О., Задорожная А.Е., Капранов Н.М., Хвастунова А.Н., Ядарова П.А., Филатов А.В., Бузова О.С., Атауллаханов Ф.И., Кузнецова С.А. Исследование морфологии и распределения α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлор ацетат-эстеразы в нормальных предшественниках лейкоцитов миелоидного роста с помощью клеточного биочипа. Онкогематология. 2016; 11 (4): 74–79.

5. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого миелоидного лейкоза у детей. М., 2015.

6. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Румянцова Ю.В., Карачунский А.И. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков. М., 2015.

7. Creutzig U, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, De Bont E, Harbott J, Hasle H, Johnston D, Kinoshita A, Lehrnbecher T, Leverger G, Mejstrikova E, Meshinchi S, Pession A, Raimondi SC, Sung L, Stary J, Zwaan CM, Kaspers GJL, Reinhardt D. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. Blood. 2012; 120 (16): 3187–3205.

8. Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of

acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? Blood Reviews. 2006; 20: 71–82.

9. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, Wermke M, Feldmann A, Bachmann M, Ehninger G, Oelschlägel U. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. Blood Cancer Journal. 2014; 4 (6): e218.

10. Munoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventin A, Brunet S, Sierra J. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. Haematologica. 2001; 86 (12), 1261–1269.

11. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies. John Wiley & Sons, 2011.

12. Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 1991; 5(8): 637–645.

13. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SG, Pei D, Cheng C, Su X, Rubnitz JE, Basso G, Biondi A, Pui C-H, Downing JR, Campana D. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukemia. The Lancet Oncology. 2009; 10 (2): 147–156.

14. Stemberger LA. The unlabeled antibody peroxidase antiperoxidase method. In: Immunocytochemistry. New York: Wiley, 1979: 104–169.

15. Mason DY, Farrell C, Taylo CR. The Detection of Intracellular Antigens in Human Leucocytes by Immunoperoxidase Staining. British Journal of Haematology. 1975; 31: 361–370.

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.24110/0031-403X-2019-98-4-97-104
<https://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-4-97-104>

Р.А. Моисеенко¹, Д.Ю. Качанов¹, А.С. Слинин¹, А.В. Филин², С.А. Плясунова¹,
Е.В. Феоктистова¹, Г.В. Терещенко¹, Э.Ф. Ким³, Т.В. Шаманская¹, С.Р. Варфоломеева¹

КИНЕТИКА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА У ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОБЛАСТОМОЙ ГРУППЫ СТАНДАРТНОГО РИСКА НА ФОНЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ, ²ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва; ³Московская городская онкологическая больница № 62 ДЗМ, Московская область, г. Красногорск, РФ



Цель исследования: изучить кинетику уровня альфа-фетопротеина (АФП) в прогнозировании результатов лечения у пациентов с гепатобластомой (ГБ) группы стандартного риска на фоне комбинированной терапии по протоколу SIOPEL-3SR. **Материалы и методы исследования:** в исследование включены 30 пациентов с ГБ группы стандартного риска. Медиана возраста на момент постановки диагноза – 18,4 мес (0–36,8 мес). В исследуемой группе преобладали девочки (53,3%). У всех пациентов изначально был значительно повышен уровень АФП. **Результаты:** на фоне проводимой терапии отмечалось стабильное снижение уровня АФП у основной группы пациентов, один пациент – отсутствие ответа, один пациент – раннее прогрессирование. **Заключение:** оценка уровня АФП в процессе лечения показала свою диагностическую значимость, поскольку уровень АФП напрямую коррелировал с чувствительностью опухоли к проводимой терапии.

Контактная информация:

Моисеенко Роман Алексеевич – врач-детский онколог отделения клинической онкологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, МЗ РФ
Адрес: Россия, 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: (495) 664-77-40,
E-mail: doktor-moiseenko@yandex.ru
Статья поступила 3.06.19,
принята к печати 20.07.19.

Contact Information:

Moiseyenko Roman Alekseyevich – pediatric oncologist, Clinical Oncology Department, National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev
Address: Russia, 117997, Moscow, SPS-7, Samory Mashela str., 1
Tel.: (495) 664-77-40,
E-mail: doktor-moiseenko@yandex.ru
Received on Jun. 3, 2019,
submitted for publication on Jul. 20, 2019.