

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

Диагностика острых лимфобластных лейкозов из Т-линейных предшественников и подходы к мониторингу минимальной остаточной болезни

О.А. Чернышева, Л.Ю. Гривцова, И.Н. Серебрякова, Н.А. Купрышина, Е.Н. Шолохова, М.А. Шервашидзе, А.Д. Палладина, Б.В. Курдюков, А.В. Попа, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

РЕФЕРАТ

Актуальность. Минимальная остаточная болезнь (МОБ) — независимый фактор прогноза при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) у детей. При иммунологической оценке количества клеток МОБ основой является aberrантный иммунофенотип опухолевых лимфобластов, однако в случае ОЛЛ из Т-линейных предшественников (Т-ОЛЛ) четкие критерии aberrантности до сих пор не определены. В основу проточно-цитометрической оценки МОБ при Т-ОЛЛ могут быть положены особенности нормального Т-клеточного онтогенеза, а именно отсутствие в костном мозге нормальных Т-линейных предшественников (Т-ЛП). **Цель.** Оценить возможности выявления МОБ иммунологическим методом проточной цитометрии на основании иммунофенотипа Т-ЛП на 15-й и 33-й дни терапии у детей с Т-ОЛЛ.

Материалы и методы. В анализ включены данные по первичному иммунофенотипу и оценке МОБ на 15-й и 33-й дни лечения 31 больного с Т-ОЛЛ в возрасте 2–17 лет. В большинстве случаев (61,3 %) выявлен кортико-тимоцитарный иммуноподвариант ОЛЛ, в остальных (38,7 %) — пре-Т-клеточный. Диагноз устанавливался по совокупности морфоцитохимического и иммунологического исследований костного мозга. При оценке МОБ-статуса морфологическое и иммунологическое исследования пунктата костного мозга проводились параллельно из одной пробирки. Все больные, включенные в исследование, проходили лечение в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ согласно протоколу ALL IC-BFM 2009.

Результаты. Показано, что для оценки МОБ на всех этапах терапии может применяться единый иммунологический подход, основанный на выявлении клеток с иммунофенотипом $cyCD3^+CD7^{+/++}smCD3^-$ (Т-ЛП). Важно использование правильных клонов моноклональных антител для выявления цитоплазматической и мембранной молекул CD3 (UCHT1 и SK7 соответственно). В группу стандартного риска не включен ни один больной.

LYMPHOID TUMORS

Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia Originating From T-Lineage Precursors and Approaches to Minimal Residual Disease Monitoring

OA Chernysheva, LYU Grivtsova, IN Serebryakova, NA Kupryshina, EN Sholokhova, MA Shervashidze, AD Palladina, BV Kurdyukov, AV Popa, NN Tupitsyn

NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

ABSTRACT

Background. Minimal residual disease (MRD) is an independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. The immunological assessment of MRD cell count is based on aberrant immunophenotype of tumor lymphoblasts. However, in the case of ALL originating from T-lineage precursor cells (T-ALL) no clear aberrancy criteria have been defined, yet. Flow-cytometric MRD assessment in T-ALL can be based on characteristics of normal T-cell ontogenesis, i.e. the absence of normal T-lineage precursor cells (T-LP) in bone marrow.

Aim. To assess the feasibility of immunological method of flow cytometry for MRD detection based on T-LP immunophenotype on Days 15 and 33 of treatment of T-ALL children.

Materials & Methods. The analysis included the data on primary immunophenotype and MRD assessment on Days 15 and 33 of treatment of 31 T-ALL patients in the age of 2–17 years. In the majority of cases (61.3 %) the cortical/thymic immuno-subvariant of ALL was detected, in the rest of cases (38.7 %) it was the pre-T-cell one. Diagnosis was based on cumulative results of morphocytochemical and immunological bone marrow analyses. Assessing the MRD state the morphological and immunological analyses of bone marrow aspirate were carried out in parallel with one and the same tube. All patients enrolled in the trial were treated at Scientific Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology of NN Blokhin National Medical Cancer Research Center according to the ALL IC-BFM 2009 protocol.

Results. Our study demonstrated that at all therapy stages MRD can be assessed by the unified immunological method based on detecting $cyCD3^+CD7^{+/++}smCD3^-$ (T-LP) immunophenotype cells. It is important to ensure that the correct clones of monoclonal antibodies are used for detecting CD3 cytoplasmic and membrane molecules (UCHT1 and SK7, respectively). Standard risk group included no patients. The majority of patients (76.2 %) treated according to ALL IC-BFM 2009 protocol were assigned to medium risk group on

Большинство пациентов (76,2 %), проходивших лечение по протоколу ALL IC-BFM 2009, составили группу промежуточного риска на 15-й день терапии. К 33-му дню 25 % из них перешли в группу высокого риска.

Заключение. Возможности многоцветной проточной цитометрии позволяют наиболее полно охарактеризовать первичный иммунофенотип опухолевых Т-лимфоцитов для дальнейшего поиска лейкоз-ассоциированных иммунофенотипов. Благодаря особенностям онтогенеза нормальных Т-клеток можно унифицировать иммунологические подходы к оценке МОБ на всех этапах терапии Т-ОЛЛ.

Ключевые слова: Т-линейные острые лимфобластные лейкозы, многоцветная проточная цитометрия, минимальная остаточная болезнь, лейкоз-ассоциированный иммунофенотип.

Получено: 21 июня 2018 г.

Принято в печать: 18 декабря 2018 г.

Для переписки: Ольга Алексеевна Чернышева, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(499)324-14-30; e-mail: beznos.olga@gmail.com

Для цитирования: Чернышева О.А., Гривцова Л.Ю., Серебрякова И.Н. и др. Диагностика острых лимфобластных лейкозов из Т-линейных предшественников и подходы к мониторингу минимальной остаточной болезни. Клиническая онкогематология. 2019;12(1):79–85.

DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-79-85

Day 15 of treatment. By Day 33 a quarter of them (25 %) was included into high risk group.

Conclusion. The capabilities of multicolor flow cytometry allow for the most complete characterization of primary immunophenotype of tumor T-cell lymphoblasts for further search of leukemia-associated immunophenotypes. Specific ontogenesis features of normal T-cells enable unification of immunological approaches to MRD assessment at all stages of T-ALL therapy.

Keywords: T-lineage acute lymphoblastic leukemia, multicolor flow cytometry, minimal residual disease, leukemia-associated immunophenotype.

Received: June 21, 2018

Accepted: December 18, 2018

For correspondence: Ol'ga Alekseevna Chernysheva, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(499)324-14-30; e-mail: beznos.olga@gmail.com

For citation: Chernysheva OA, Grivtsova LYu, Serebryakova IN, et al. Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia Originating From T-Lineage Precursors and Approaches to Minimal Residual Disease Monitoring. Clinical oncohematology. 2019;12(1):79–85.

DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-79-85

ВВЕДЕНИЕ

До конца 1980-х годов Т-клеточный иммунофенотип считался неблагоприятным прогностическим фактором у детей и лечение при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) из Т-линейных предшественников (Т-ОЛЛ) проводилось по более интенсивной программе для группы высокого риска [1–5]. С 1990-х годов более интенсивные режимы химиотерапии позволили достичь определенных результатов лечения Т-ОЛЛ, сопоставимых с успехами терапии ОЛЛ из В-линейных предшественников (В-ОЛЛ) [6–9]. В исследованиях последних двух десятилетий доказана прогностическая значимость оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) при ОЛЛ у детей [10–14], а ее анализ является неотъемлемой частью современных клинических протоколов. Однако большинство данных получено при оценке МОБ у детей с В-ОЛЛ, а данные при Т-ОЛЛ являются недостаточными и базируются на небольших когортах больных.

Основой для мониторинга МОБ в процессе лечения является детальная иммунофенотипическая характеристика бластных клеток на этапе первичной диагностики Т-ОЛЛ. В настоящее время наиболее полное описание иммунофенотипа лимфоцитов возможно с использованием 8-цветных стандартизованных диагностических панелей европейского консорциума по проточной цитометрии EuroFlow. При В-ОЛЛ лейкоз-ассоциированные иммунофенотипы (ЛАИФ) В-лимфоцитов достаточно хорошо изучены,

а панели EuroFlow позволяют выявить наиболее часто встречающиеся из них и отобрать индивидуальные критерии для дальнейшего мониторинга МОБ [15]. В случае Т-ОЛЛ поиск ЛАИФ Т-лимфоцитов неоднозначен и до сих пор продолжается.

В основу диагностической (клинической) классификации положена схема нормального онтогенеза Т-клеток. В развитии Т-клетки выделяют три этапа: костномозговой, тимический и стадию циркуляции в периферической крови или нахождении в лимфоидных тканях. При этом основные этапы дифференцировки Т-клетки проходят в тимусе, а в костном мозге Т-линейные предшественники (Т-ЛП) отсутствуют [16].

На основе схемы нормального онтогенеза Т-клеток, согласно классификации ВОЗ-2017, выделяют следующие иммунологические подварианты Т-ОЛЛ [17]:

- 1) ранний Т-клеточный — CD7⁺cyCD3⁺ и один из миелоидных или стволовых клеточных антигенов (CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b или CD65), в редких случаях возможна экспрессия smCD3, CD2 и/или CD4. CD5 обычно отсутствует;
- 2) про-Т-клеточный — nuTdT⁺cyCD3⁺CD7⁺CD2⁺CD5⁺CD1a⁻CD34^{+/}-CD4⁻/CD8⁻;
- 3) пре-Т-клеточный — nuTdT⁺cyCD3⁺CD7⁺CD2⁺CD5⁺CD1a⁺CD34⁻CD4⁻/CD8⁻;
- 4) кортико-тимоцитарный — nuTdT^{+/}-yCD3⁺CD7⁺CD2⁺CD5⁺CD1a⁺CD4^{+/}/CD8⁺;
- 5) медуллярный — TdT⁻cyCD3⁺CD7⁺CD2⁺CD5⁺CD1a⁺CD4⁺ или CD8⁺.

Таблица 1. Ориентировочная пробирка для диагностики острого лейкоза

Флюорохром №	Антиген							
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
1	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3	CyCD3	CD45

Таблица 2. Уточняющая 8-цветная стандартизованная панель консорциума EuroFlow для диагностики Т-ОЛЛ

Флюорохром №	Антиген							
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
1	nuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	smCD3	cyCD3	CD45
2	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	smCD3	cyCD3	CD45
3	TCRγδ	TCRαβ	CD33	CD56	cyTCRαβ	smCD3	cyCD3	CD45
4	CD44	CD13	HLA-DR	CD45RA	CD123	smCD3	cyCD3	CD45

В попытках описать aberrantный иммунофенотип Т-лимфоцитов обращалось внимание на молекулу CD99 — белок, участвующий в Т-клеточной адгезии [18] и широко экспрессирующийся как на гемопоэтических, так и негемопоэтических клетках [19–21]. Среди клеток гемопоэтического ряда CD99 наиболее ярко представлен на незрелых тимоцитах, которые по мере созревания его утрачивают [19, 21, 22], при этом гиперэкспрессия антигена характерна для клеток Т-ОЛЛ. Однако M. Roshal и соавт. показали, что именно CD99 наряду с ядерной TdT подвергаются наибольшему изменению (утрачиваются) в процессе химиотерапии, в связи с чем не могут быть надежным критерием aberrantности опухолевых Т-лимфоцитов [23].

С учетом особенностей нормального онтогенеза Т-клеток, а именно отсутствия нормальных Т-ЛП в костном мозге, для мониторинга МОБ при Т-ОЛЛ можно применять альтернативный подход, основанный на выявлении клеток с фенотипом $cyCD3^+CD7^{+/-}smCD3^-$ или $smCD3^{+/-}$. В нашем исследовании оценена возможность иммунологической детекции клеток МОБ на фоне индукционной химиотерапии при Т-ОЛЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включен 31 больной с Т-ОЛЛ (26 мальчиков и 5 девочек, средний возраст 7,3 года), получавший лечение на базе НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2006 по 2017 г. Диагноз устанавливался по совокупности морфоцитохимического (группа гемоцитологии, канд. мед. наук И.Н. Серебрякова) и иммунофенотипического (лаборатория иммунологии гемопоэза, заведующий — д-р мед. наук, профессор Н.Н. Тупицын) исследований пунктата костного мозга.

В большинстве случаев (87,1 %) иммунофенотипирование на момент диагностики проводилось с использованием 3-цветной проточной цитометрии, в 6,5 % — 4–6-цветной (панель включала до 20 маркеров). Иммунофенотипирование в соответствии с 8-цветными стандартизованными панелями консорциума EuroFlow проведено в 6,5 % Т-ОЛЛ. Линейная принадлежность бластных клеток устанавливалась с использованием пробы ALOT (acute leukemia orienta-

tion tube — ориентировочная пробирка для диагностики острого лейкоза) (табл. 1).

В случае выявления Т-линейной принадлежности бластных клеток использовалась уточняющая 8-цветная стандартизованная панель Т-ОЛЛ (табл. 2).

Далее приводим пример диагностического алгоритма на базе 8-цветных панелей консорциума EuroFlow. Представлен иммунофенотип бластных клеток ребенка 5 лет с Т-ОЛЛ. В качестве 1-го этапа диагностического поиска использовалась проба ALOT (рис. 1, А–В) для определения линейной принадлежности опухолевых лимфоцитов. На 2-м этапе применялась уточняющая панель Т-ОЛЛ протоколов EuroFlow для определения иммунологического подварианта и подробной иммунофенотипической характеристики опухолевых бластных клеток (рис. 1, Г–И). Следует отметить, что при оценке экспрессии CD3 важной особенностью является применение правильного клона антигена CD3 [24]. Так, клон SK7 служит для выявления молекулы, экспрессированной на мембране клетки, в то время как клон UCNT1 направлен на связывание с цитоплазматической детерминантой. Таким образом, при оценке цитоплазматических CD3 должны использоваться моноклональные антитела клона UCNT1.

Таким образом, опухолевые Т-лимфоциты в данном случае имеют иммунофенотип $CD7^+TdT^+CD2^+CD5^+cyCD3^+CD1a^+$, что соответствует кортико-timoцитарному иммунологическому подварианту.

Лечение по протоколу ALL IC-BFM 2009 получили 22 пациента. Большинство больных (72,7 %) составили группу промежуточного риска. В группе высокого риска оказалось 27,3 % пациентов. Больных, соответствующих критериям группы стандартного риска, в нашем исследовании нет.

Оценка МОБ проводилась в соответствии с протоколом ALL IC-BFM 2009 на 15-й и 33-й дни химиотерапии.

Каждый пунктат костного мозга при диагностике МОБ был охарактеризован морфологически и иммунологически. Подсчет миелограммы проводился двумя морфологами (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Романовского—Гимзы. Согласно стандартным морфологическим критериям, по количеству бластных клеток выделялись

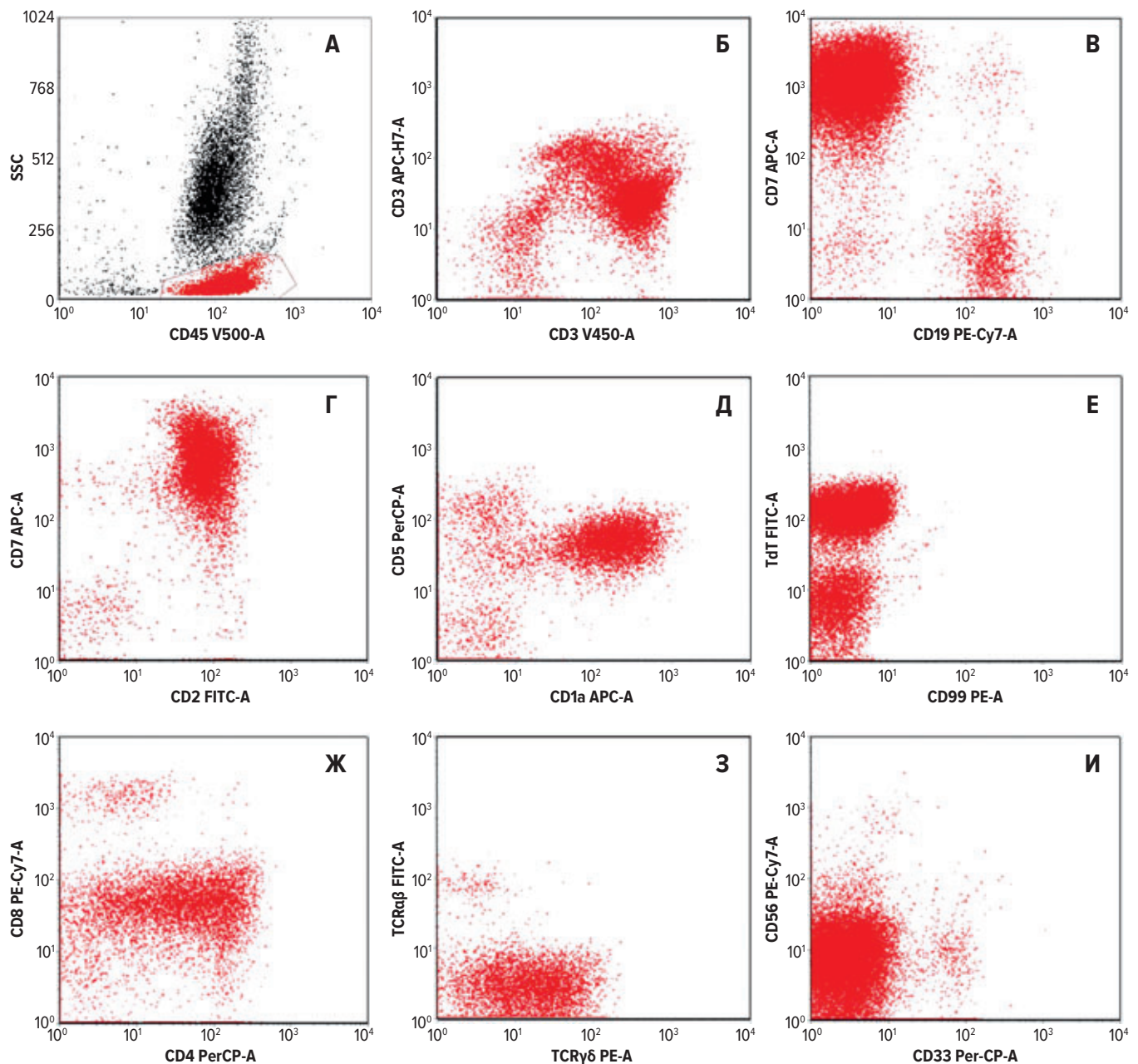


Рис. 1. Пример использования подхода EuroFlow для диагностики Т-ОЛЛ:

А–В — проба АЛОТ. На цитограмме А бластные клетки выделены на основании отчетливой экспрессии CD45 (ось x) vs параметры бокового светорассеяния (SSC, ось y), гейт 1 выделен красным цветом. Далее все популяции рассматриваются в пределах этой (CD45⁺) популяции клеток. (Б) Лимфобласты характеризуются яркой экспрессией цитоплазматического CD3 (ось x) в сочетании с более слабой экспрессией мембранного CD3 (ось y). (В) Подтверждена Т-линейная принадлежность бластных клеток. Они ярко экспрессируют пан-Т-клеточный антиген CD7 (ось y). В-клетки (CD19⁺, ось x) составляют 4,8 % всех миелокариоцитов CD45⁺; Г–И — уточняющий протокол диагностики Т-ОЛЛ. (Г) Опухолевые Т-лимфобласты помимо молекулы CD7 (ось y) также экспрессируют Т-клеточный антиген CD2 (ось x). (Д) Опухолевые Т-лимфобласты отчетливо экспрессируют CD5 (ось y) в сочетании с CD1a (ось x). (Е) Бласты TdT-позитивны (ось y) в отсутствие экспрессии CD99 (ось x). (Ж) Среди Т-лимфобластов отсутствует популяция двойных положительных лимфоцитов CD4⁺CD8⁺ (CD4, ось x vs CD8, ось y). (З) Бластные клетки характеризуются отсутствием клональности Т-клеточного рецептора (TCRαβ, ось y vs TCRγδ, ось x). (И) На опухолевых Т-лимфобластах отсутствует коэкспрессия пан-миелоидного антигена CD33 (ось x), а также молекулы CD56 (ось y)

Fig. 1. An example of EuroFlow approach for T-ALL diagnosis:

А–В — АЛОТ test. The cytogram A shows blast cells standing out due to clear CD45 expression (x-axis) vs. side scatter parameters (SSC, y-axis), gate 1 is shown in red. Further all populations are considered within this CD45⁺ cell population. (B) Lymphoblasts are characterized by clear expression of cytoplasmic CD3 (x-axis) together with a lower expression of membrane CD3 (y-axis). (B) T-lineage of blast cells is proved. They clearly express CD7 pan-T cell antigen (y-axis). B-cells (CD19⁺, x-axis) account for 4.8 % of all CD45⁺ myelocaryocytes; Г–И — adjusting protocol of T-ALL. (Г) Tumor T-lymphoblasts express not only CD7 molecules (y-axis), but also CD2 T-cell antigen (x-axis). (Д) Tumor T-lymphoblasts clearly express CD5 (y-axis) together with CD1a (x-axis). (E) Blasts are TdT-positive (y-axis) with no CD99 expression (x-axis). (Ж) Among T-lymphoblasts there is no population of CD4⁺CD8⁺ double positive lymphocytes (CD4, x-axis vs. CD8, y-axis). (З) Blast cells are characterized by the absence of T-cell receptor clonality (TCRαβ, y-axis vs. TCRγδ, x-axis). (И) In tumor T-lymphoblasts neither co-expression of CD33 pan-myeloid antigen (x-axis), nor CD56 molecules (y-axis) are seen

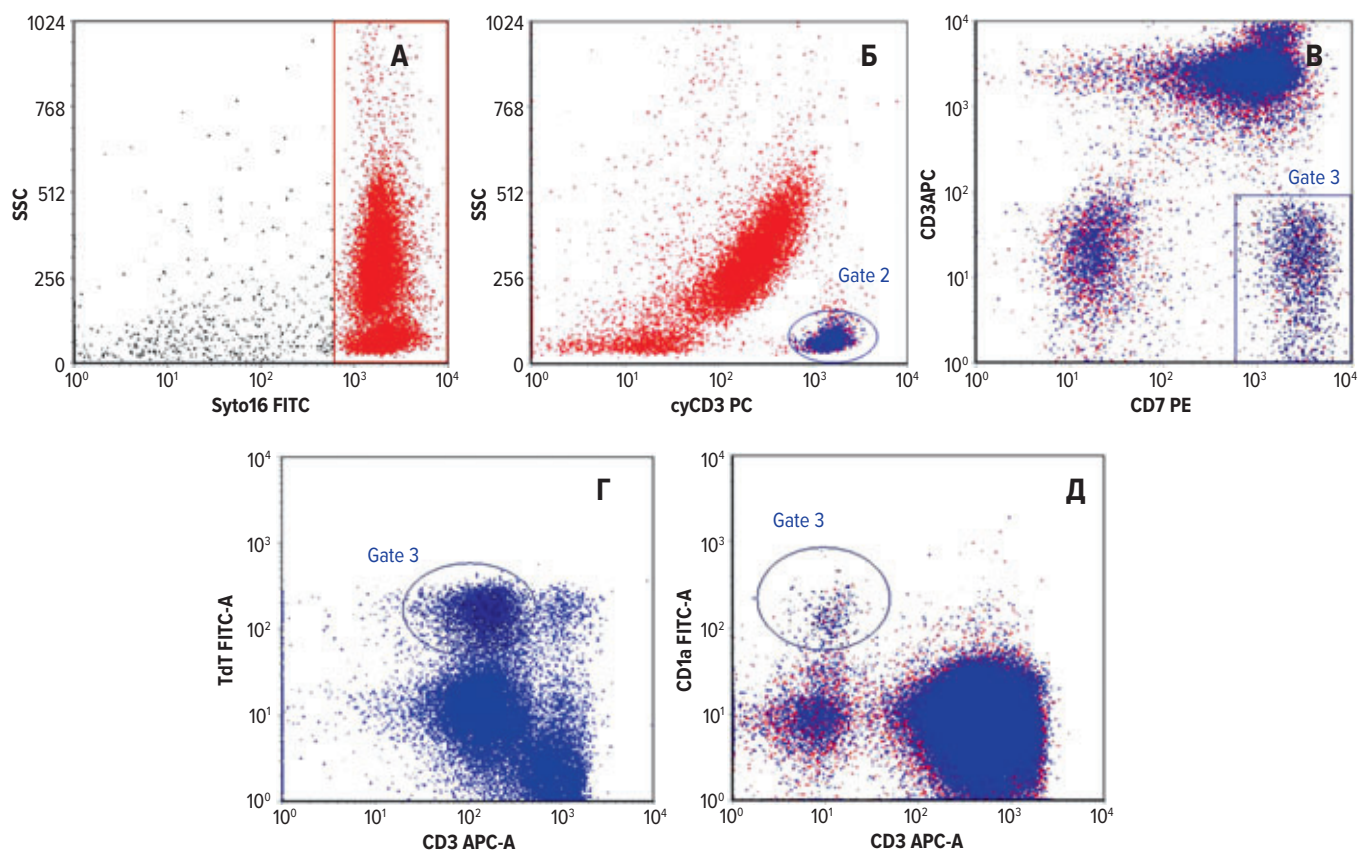


Рис. 2. Алгоритм оценки МОБ при Т-ОЛЛ. (А) Ядродержащие клетки образца выделены на основании положительной реакции Syto16 (ось x) vs параметры бокового светорассеяния (SSC, ось y), гейт 1 выделен красным цветом. (Б) В пределах гейта 1 T-клеток выделен гейт 2 (cyCD3⁺) выявлены T-линейные предшественники (Т-ЛП) по яркой экспрессии CD7 (ось x) в сочетании с отсутствием мембранного CD3 (ось y), гейт 3 выделен темно-синим цветом. (Г) Популяция Т-ЛП может быть определена по экспрессии TdT (ось y) в сочетании с отсутствием мембранного CD3 (ось x), гейт 3 выделен темно-синим цветом. (Д) Показана возможность выявления Т-ЛП на основании экспрессии CD1a (ось y) в сочетании с отсутствием мембранного CD3 (ось x) в пределах популяции cyCD3⁺, гейт 3 выделен темно-синим цветом

Fig. 2. Algorithm of MRD assessment in T-ALL. (A) Nucleated cells stand out due to Syto16 positive reaction (x-axis) vs. side scatter parameters (SSC, y-axis), gate 1 is shown in red. (B) Within gate 1 T-cell gate is identified due to cytoplasmic CD3 expression (x-axis) vs. SSC parameters (y-axis), gate 2 is shown in blue. (C) In gate 2 (cyCD3⁺) T-lineage precursors (T-LP) are identified by clear CD7 expression (x-axis) coupled with the absence of membrane CD3 (y-axis), gate 3 is shown in dark blue. (D) T-LP population can be identified by TdT expression (y-axis) coupled with the absence of membrane CD3 (x-axis), gate 3 is shown in dark blue. (E) T-LP detection on the basis of CD1a expression (y-axis) coupled with the absence of membrane CD3 (x-axis) within cyCD3⁺ population, gate 3 is shown in dark blue

следующие М-варианты: М1 — образцы, в которых содержание бластных клеток не превышало 5 %; М2 — образцы с 5–25 % бластных клеток; М3 — образцы с 25 % бластных клеток и более. Далее проведен углубленный анализ, морфологические критерии сопоставлены с иммунологическими данными. Группы образцов М1, М2 и М3 детально проанализированы в отношении уровня МОБ. Среди образцов каждой группы выделены подгруппы на основании различного количества клеток МОБ. Критерий разделения на подгруппы — протокол ВФМ для оценки МОБ во время индукционной химиотерапии: < 0,1 % (включая отрицательные случаи) — стандартный риск, 0,1–10,0 % — средний риск, ≥ 10 % — высокий риск. Стандартный пороговый уровень МОБ-негативности — 0,01 % опухолевых клеток в образце.

Стратегия выявления клеток МОБ на всех этапах терапии заключалась в последовательном многопараметровом гейтировании. Первый шаг включал выявление ядродержащих клеток (ЯСК) на осно-

вании экспрессии нуклеотропного красителя Syto16 (рис. 2, А) Далее в пределах ЯСК подсчитывалось количество Т-клеток на основании цитоплазматической экспрессии пан-Т-клеточного антигена CD3 (cyCD3) (рис. 2, Б). Клетки МОБ оценивались путем выявления на Т-клетках cyCD3⁺ гиперэкспрессии CD7 в сочетании с отсутствием мембранного CD3 (smCD3) (рис. 2, В). В ряде случаев достаточным для детекции клеток МОБ было выявление nuTdT⁻ (рис. 2, Г) или CD1a-положительных Т-ЛП (рис. 2, Д).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка МОБ на 15-й день терапии

Оценка количества остаточных бластных клеток на 15-й день химиотерапии индукции ремиссии проводилась в 30 образцах костного мозга.

В соответствии со стандартными морфологическими критериями оценки первичного ответа на

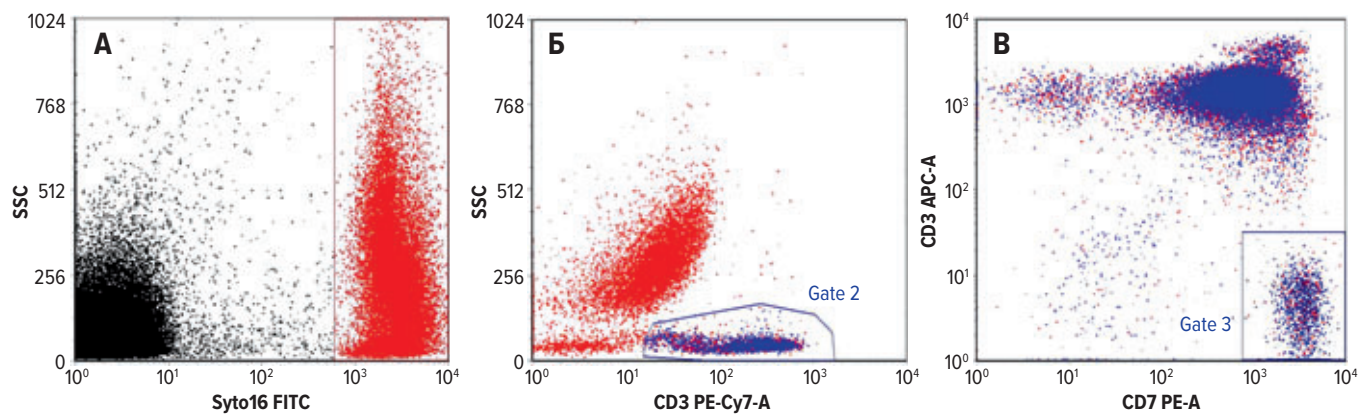


Рис. 3. Пример МОБ-положительности при морфологическом отсутствии бластных клеток в образце костного мозга на 33-й день терапии:

A — выделены ядросодержащие клетки образца (гейт 1, красный цвет) на основании положительной реакции с нуклеотропным красителем Syto16 (ось x) vs параметры бокового светорассеяния (SSC, ось y); B — в пределах ядросодержащих клеток выделены cyCD3-положительные T-клетки (гейт 2, синий цвет) с низкими параметрами SSC (cyCD3, ось x vs SSC, ось y); B — в гейте 2 (CD7, ось x vs smCD3, ось y) выявлены T-линейные предшественники (клетки МОБ) с иммунофенотипом cyCD3⁺CD7⁺smCD3⁻ (гейт 3, темно-синий цвет). Они составляют 2,69 % всех миелокариоцитов, т. е. это МОБ-положительный статус

Fig. 3. An example of MRD positivity with morphological absence of blast cells in bone marrow on treatment day 33:

A — nucleated cells (gate 1, in red) are identified by positive reaction with Syto16 nucleotropic stain (x-axis) vs. side scatter parameters (SSC, y-axis); B — within nucleated cells cyCD3-positive T-cells (gate 2, in blue) with low SSC parameters are identified (cyCD3, x-axis vs. SSC, y-axis); B — in gate 2 (CD7, x-axis vs. smCD3, y-axis) T-lineage precursors (MRD cells) with cyCD3⁺CD7⁺smCD3⁻ immunophenotype are identified (gate 3, in dark blue). They account for 2.69 % of all myelocaryocytes, i.e. MRD-positive status

терапию в образцах костного мозга на 15-й день проанализировано три группы больных, выделенных на основании количества бластных клеток по данным миелограммы (M-варианты): M1 (80 %, $n = 24$), M2 (16,7 %, $n = 5$), M3 (3,3 %, $n = 1$). Проведен углубленный анализ, морфологические критерии сопоставлены с иммунологическими данными. Группы образцов M1, M2 и M3 детально проанализированы в отношении уровня МОБ.

При сопоставлении морфологического и иммунологического исследований данные в целом совпадают. Гетерогенной оказалась группа M2, в которой выявлялись расхождения в количестве бластных клеток и уровне МОБ, однако эти образцы и по M-вариантам, и по уровню МОБ попадают в промежуточную группу риска, что в целом не вносит противоречий в стратификацию больных.

Проанализированы показатели костного мозга на 15-й день лечения в зависимости от иммунологического подварианта Т-ОЛЛ. Значительно более высоким уровнем МОБ на 15-й день характеризовался пре-Т-иммуноподвариант в сравнении с кортико-тимоцитарным ($p = 0,044$).

Группу промежуточного риска (согласно протоколу ALL IC-BFM 2009) составило 76,2 % пациентов. В группу высокого риска стратифицированы 23,8 % больных. Больные, отвечающие критериям стандартной группы риска, в нашем исследовании отсутствовали.

На 15-й день индукционной химиотерапии с учетом данных МОБ у 25 % больных изменена группа риск-стратификации, и они переведены из группы промежуточного риска в группу высокого.

Важно, что ни у одного больного на 15-й день терапии не зафиксирован МОБ-отрицательный статус, т. е. ни один больной к середине терапии индукции

ремиссии не достиг полной лейкоемической циторедукции.

Оценка МОБ на 33-й день терапии

Оценка количества остаточных бластных клеток на 33-й день химиотерапии индукции ремиссии проводилась у 26 больных.

На основании количества бластных клеток в образцах костного мозга на 33-й день лечения выделены M-варианты. Большинство образцов (96,2 %) соответствовало критериям группы M1 и только 1 — M2.

Морфологические критерии сопоставлены с иммунологическими данными. Группы образцов стандартного и промежуточного рисков детально проанализированы в отношении уровня МОБ.

Все образцы костного мозга больных группы M1 были МОБ-положительными. Согласно иммунологическим критериям, группу стандартного риска (МОБ < 0,1 %) составило 16 % образцов костного мозга ($n = 4$). В группу промежуточного риска вошло 20 (80 %) из 25 пунктатов костного мозга. В этой группе в 1 образце костного мозга морфологически бластных клеток не выявлено, однако по результатам проточной цитометрии количество клеток МОБ составило 2,69 % (рис. 3).

В группе высокого риска по данным МОБ (≥ 10 %) оказался 1 образец.

Обращает на себя внимание, что образцы данной выборки характеризовались относительным лимфоцитозом (> 28 %).

Только один образец костного мозга согласно морфологическим критериям попал в группу M2 (10,8 % бластных клеток), однако по иммунологическим показателям этот больной мог быть отнесен к группе стандартного риска (0,04 % клеток МОБ).

Важно, что ни у одного больного к 33-му дню терапии не достигнут МОБ-отрицательный статус.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показана возможность иммунологической детекции МОБ при Т-ОЛЛ. Учитывая особенности нормального онтогенеза Т-клеток, клетки МОБ иммунологически могут быть выявлены на основании иммунофенотипа $суCD3^+CD7^{++}smCD3^-$ или $smCD3^{+/-}$. Важно, что данный подход может быть применен на всех этапах терапии Т-ОЛЛ.

Клиническое значение оценки МОБ при ОЛЛ не вызывает сомнений. Однако с учетом полученных данных об отсутствии полной лейкоэмической циторедукции на 15-й и 33-й дни терапии по протоколу ALL IC-BFM 2009 вопрос о совершенствовании лечебных программ остается актуальным и открытым.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Н.Н. Тупицын, заместитель главного редактора, и А.В. Попа, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовали в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.

Сбор и обработка данных: О.А. Чернышева, Л.Ю. Гривцова.

Предоставление материалов исследования: О.А. Чернышева, Л.Ю. Гривцова, И.Н. Серебрякова, М.А. Шервашидзе.

Анализ и интерпретация данных: О.А. Чернышева, Л.Ю. Гривцова.

Подготовка рукописи: О.А. Чернышева, Л.Ю. Гривцова.

Окончательное одобрение рукописи: Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын, А.В. Попа.

Административная поддержка: Н.Н. Тупицын, А.В. Попа.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, et al. A. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 1986;315(11):657–63. doi: 10.1056/nejm198609113151101.
2. Crist WM, Shuster JJ, Falletta J, et al. Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood.* 1988;72(6):1891–7.
3. Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. *Rec Res Cancer Res.* 1993;131:269–82. doi: 10.1007/978-3-642-84895-7_24.

4. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993;82(2):343–62.

5. Uckun FM, Sensel MG, Sun L, et al. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1998;91(3):735–46.

6. Бойченко Э.Г., Попов А.М., Макарова Т.А. и др. Острый лимфобластный лейкоз из ранних предшественников Т-клеток. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2015;14(1):38–45.

- [Boichenko EG, Popov AM, Makarova TA, et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii.* 2015;14(1):38–45. (In Russ)]

7. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol.* 2003;21(19):3616–22. doi:10.1200/JCO.2003.10.116.

8. Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood.* 2008;111(9):4477–89. doi: 10.1182/blood-2007-09-112920.

9. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354(2):166–78. doi: 10.1056/NEJMra052603.

10. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukaemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5168–74. doi: 10.1200/JCO.2008.20.8934.

11. Borowitz M, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's oncology group study. *Blood.* 2008;111(12):5477–85. doi: 10.1182/blood-2008-01-132837.

12. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood.* 2011;118(8):2077–84. doi: 10.1182/blood-2011-03-338707.

13. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 Protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia.* 2008;22(5):989–97. doi: 10.1038/leu.2008.22.

14. van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet.* 1998;352(9142):1731–8. doi: 10.1016/S0140-6736(98)04058-6.

15. Безнос О.А., Гривцова Л.Ю., Попа А.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow. *Клиническая онкогематология.* 2017;10(2):158–68. doi: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-158-168.

- [Beznos OA, Grivtsova LYu, Popa AV, et al. Evaluation of Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Using EuroFlow Approaches. *Clinical oncohematology.* 2017;10(2):158–68. doi: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-158-168. (In Russ)]

16. Jaffe ES, Campo E, Harris NL, et al. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* edited by Lyon: IARC Press; 2017. pp. 189–98.

17. Borowitz MJ, Chan JKC, Bene M-C, Arber DA. T-lymphoblastic leukemia/lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* edited by Lyon: IARC Press; 2017. pp. 209–12.

18. Gelin, C. Aubrit F, Phalipon A, et al. The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product. *EMBO J.* 1989;8(11):3253–9. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08485.x.

19. Dworzak MN, Fritsch G, Buchinger P, et al. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood.* 1994;83(2):415–25.

20. Hamilton GA, Fellingner EJ, Schratler I, et al. Characterization of a human endocrine tissue and tumor-associated Ewing's sarcoma antigen. *Cancer Res.* 1988;48(21):6127–31.

21. Levy R, Dille J, Fox RI, et al. A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(12):6552–56. doi: 10.1073/pnas.76.12.6552.

22. Bodger MP, Francis GE, Delia D, et al. A monoclonal antibody specific for immature human hemopoietic cells and T lineage cells. *J Immunol.* 1981;127(6):2269–74.

23. Roshal M, Fromm JR, Winter S, et al. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Cytometry B: Clin Cytom.* 2010;78B(3):139–46. doi: 10.1002/cyto.b.20511.

24. Janossy G, Coustan-Smith E, Campana D. The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia.* 1989;3(3):170–81.