

Иммунофенотипическая характеристика острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни

А.М. Попов^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, О.В. Стренева^{1,2},
Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург;

²ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург;

³ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», Екатеринбург

Контакты: Александр Михайлович Попов uraltcytometry@gmail.com

Цель исследования — описание иммунофенотипа острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей первого года жизни. В исследование было включено 64 пациента (29 мальчиков и 35 девочек) с острым лейкозом (ОЛ) в возрасте от 0 до 11 месяцев включительно. Частота выявления ОЛЛ составила 67,19 % от всех ОЛ у детей первого года жизни, что было несколько реже, чем у детей более старшего возраста (87,69 %). В исследуемой группе преобладал В1-ОЛЛ (60,46 %), на долю же наиболее частого в других возрастных группах В11-ОЛЛ приходилось лишь 30,23 %. Отсутствие экспрессии CD10 и CD20, а также высокая экспрессия CD45, CD15, CD65 и NG2 характеризовали иммунофенотип опухолевых клеток при наличии перестроек гена MLL. Диагностическая эффективность выявления экспрессии NG2 для прогнозирования наличия перестроек гена MLL оказалась наиболее высокой. Экспрессия CD34 и CD65 была более характерна для пациентов с наличием MLL-AF4(+). Таким образом, иммунофенотип ОЛЛ из В-линейных предшественников у детей младше 1 года существенно различается в зависимости от наличия или отсутствия перестроек гена MLL. Экспрессия NG2, CD45, CD133, CD15, а также отсутствие экспрессии CD10, CD20 позволяют прогнозировать наличие какой-либо перестройки гена MLL при ОЛЛ у детей первого года жизни, при этом наибольшей диагностической эффективностью обладает наличие экспрессии NG2.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети первого года жизни, проточная цитометрия

Immunophenotypic investigation of infant acute lymphoblastic leukemia

A.M. Popov^{1,2}, G.A. Tsaur^{1,2}, T.Yu. Verzhbitskaya^{1,2}, O.V. Strenева^{1,2},
E.V. Shorikov^{1,2}, L.I. Saveliev^{1,2,3}, L.G. Fechina^{1,2}

¹Pediatric Oncology and Hematology Centre, Regional Children's Hospital, Yekaterinburg;

²Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg;

³Ural State Medical Academy, Yekaterinburg

Aim of the study — immunophenotype description of infant acute lymphoblastic leukemia (ALL). 64 patients (29 boys and 35 girls) with acute leukemia (AL) aged from 0 to 11 months were included in the current study. ALL was found less frequently in infants than in older children (67.19 % and 87.69 %, respectively). B1-ALL was the most common immunological ALL type (60.46 %) in infant ALL, while B11-ALL was notably less frequent compared with other age groups (30.23 %). Significant immunophenotypic differences were observed in patients with and without MLL gene rearrangements. Number of cases in those tumor cells expressed CD10, CD20, CD45, CD133, CD15, NG2 varied between MLL-positive and MLL-negative groups. CD10- and CD20-negativity, high CD45, CD15, CD65 and NG2 expression were immunophenotypic signatures of MLL-rearranged infant ALL, although NG2 had the highest diagnostic efficacy. High CD34 and CD65 expression was frequently associated with presence of MLL-AF4 fusion gene. Thus infants' B-cell precursor ALL immunophenotype differs significantly due to the presence of MLL gene rearrangements. Diagnostic immunophenotyping of infants' ALL allows predicting presence of MLL rearrangements and NG2 is the most applicable single marker.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, infants, flow cytometry

Результаты терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей заметно улучшились в течение последних 10-летий [1–6]. В то же время в некоторых группах пациентов выживаемость по-прежнему остается невысокой [3, 7]. Одной из таких групп являются дети первого года жизни [7–12]. ОЛЛ у детей первого года жизни характеризуется особенным, отличающимся от детей более старшего возраста, профилем экспрессии генов [13–16], высокой частотой выявления перестроек гена MLL [17–19] и крайне неблагоприятным прогнозом [7–12]. Наиболее часто упоминаемыми факторами риска ОЛЛ у па-

циентов данной возрастной группы являются наличие перестроек гена MLL [9, 11, 12, 20–29], возраст младше 6 месяцев [11, 20, 23, 25–27, 29–33], инициальный гиперлейкоцитоз [11, 25, 27, 30, 32], инициальное поражение центральной нервной системы [25], иммунофенотип с отсутствием экспрессии CD10 [24–27, 30, 32, 34–36], экспрессия лимфобластами миелоидных антигенов [20, 34, 36], плохой ответ на монотерапию кортикостероидами [11, 25], длительное сохранение минимальной остаточной болезни [37, 38].

В работе S. Armstrong et al. было впервые показано, что опухолевые клетки при острых лейкозах

(ОЛ), ассоциированных с перестройками гена *MLL*, по профилю экспрессии генов отличаются от blasts при стандартных ОЛЛ и остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) [13]. В дальнейшем было установлено, что по профилю экспрессии генов ОЛЛ и ОМЛ, ассоциированные с перестройками гена *MLL*, ближе друг к другу по сравнению с ОЛЛ и ОМЛ без данных перестроек соответственно [14–16]. Таким образом, наличие перестроек гена *MLL* обуславливает развитие биологически совершенно особенной опухоли, сложно поддающейся терапии. В то же время ОЛЛ у детей первого года жизни без перестроек гена *MLL* характеризуются лучшим прогнозом по сравнению с *MLL*(+)-пациентами [9, 11, 12, 20–29], однако и в группе *MLL*(-) далеко не всегда удается достичь результатов лечения, сопоставимых с результатами терапии у детей более старшего возраста [11, 20–28]. В работе R. Stam et al. было показано, что профиль экспрессии генов у детей первого года жизни при ОЛЛ без перестроек гена *MLL* отличается от такового у детей старше 1 года и близок к ОЛЛ у детей младше 1 года с наличием перестроек гена *MLL* [15].

Опухолевые клетки с наличием перестроек гена *MLL* имеют специфический иммунофенотип, характеризующийся частым отсутствием экспрессии CD10 [19, 36, 39–43], коэкспрессией миелоидных антигенов [36, 39–43], экспрессией нейтрального маркера NG2 [39–46]. В то же время комплексное описание иммунофенотипа ОЛЛ у детей первого года жизни как с наличием перестроек гена *MLL*, так и с их отсутствием в литературе встречается крайне редко [36, 39].

Цель исследования – описание иммунофенотипа ОЛЛ у детей первого года жизни.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в Лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов Отдела детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1 г. Екатеринбург с октября 2005 г. по июль 2011 г. Из 332 детей, у которых было проведено исследование первичного иммунофенотипа, 64 ребенка (29 мальчиков и 35 девочек) были в возрасте до 11 месяцев включительно. Эти пациенты составили исследуемую группу.

Иммунофенотипирование опухолевых клеток в костном мозге производилось методом 4–6-цветной проточной цитометрии на приборах “FACS Canto” и “FACS Canto II” (Becton & Dickinson (BD), США). Настройка проточных цитометров производилась с использованием калибровочной системы “7-color Setup Beads” (BD). Мониторинг стабильности работы приборов осуществлялся при помощи калибровочных систем “Cytometer Setup and Tracking” (BD) и “DAKO Fluorospheres” (Dako, Дания). Использовались моноклональные антитела (МКАТ), меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), R-фикоэритрином (PE), перидинин-хлорофилл протеином (PerCP), аллофико-

цианином (APC), а также тандемными конъюгатами PE с цианином 7 (Cy7), PerCP с цианином 5.5 (Cy5.5) и APC с Cy7. Для иммунофенотипирования применялись МКАТ, представленные в табл. 1. Окрашивание первичномеченными МКАТ производилось согласно инструкции производителя.

Таблица 1. МКАТ, применявшиеся для первичного иммунофенотипирования ОЛ

Флюорохром	МКАТ
FITC	CD58, CD45, CD99, CD7, CD65*, CD15, CD33, CD10, CD19, CD4, CD3, MPO, CD64, CD66b, CD61, CD5, CD71, IgM, Kappa
PE	CD10, CD7, CD34, NG2*, CD1a, CD45, CD22, CD133**, CD13, CD8, CD58, CD20, CD79a, TdT, CD38, CD11a, CD11b, CD11c, CD2, CD235, CD99, Lambda
PerCP	CD19, CD20, CD8, CD45, CD34
PerCP-Cy5.5	CD20, CD33, CD38, CD19, CD79a, CD5
PE-Cy7	CD34, CD13, CD3, CD56, CD10, CD38
APC	CD19, CD117, CD3, CD133**, CD56, CD2, CD79a, CD10, CD38, TdT, IgM
APC-Cy7	CD45, CD20, CD14, CD3, CD4

Примечание: * – антитела производства Beckman Coulter (США); ** – антитела производства Miltenyi Biotec (Германия); остальные антитела произведены Becton & Dickinson (США).

Для определения экспрессии NG2 использовали антитело 7.1-PE (Beckman Coulter, США). Для сравнения данных флуоресценции, полученных на разных приборах, среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) пересчитывали в количество молекул эквивалентного растворимого флюорохрома (MESF) при помощи калибровочных частиц “Quantibrite” (BD), содержащих известное количество молекул PE.

Результаты иммунофенотипирования оценивали при помощи программного обеспечения FACS Diva 4.0-6.1 (BD). Анализировали не менее 10 000 ядродержащих клеток. Опухолевые клетки выделяли на точечных графиках по экспрессии CD45, значениям параметра бокового светорассеяния и экспрессии линейно-ассоциированных маркеров (CD19, CD7, CD33). Дальнейший анализ проводили при помощи гистограмм. Согласно критериям группы EGIL [47] популяцию считали позитивной, если 20 % и более клеток экспрессировали исследуемый антиген. В качестве негативного контроля использовали сохранившиеся в образце нормальные клетки. Определение иммунологических вариантов производили также согласно критериям EGIL [47].

Для цитогенетического анализа использовали клетки костного мозга и периферической крови, которые брали до начала терапии и культивировали в течение 24 ч. Препараты окрашивали G-методом с предварительной обработкой трипсином.

Анализировали не менее 20 метафазных пластинок. Кариотипирование проводили в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека [48]. В 26 случаях дополнительно проводили исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с локус-специфичным зондом LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Abbott, США) согласно инструкции производителя, а у 1 пациента также с зондами LSI MYC Dual Color, Dual Fusion Break Apart Rearrangement Probe и LSI IGH Dual Color Break Apart Probe (оба Abbott, США).

У всех пациентов исследовались следующие химерные транскрипты: *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3*, *MLL-MLLT4*, *MLL-MLLT10*, *MLL-ELL*. Пациентам, у которых не были обнаружены вышеуказанные химерные транскрипты, дополнительно определяли экспрессию *MLL-SEPT9*, *MLL-MLLT11*, *MLL-EPS15*. Выявление химерных транскриптов проводили методом гнездовой обратной-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) по ранее описанному протоколу [49–51].

У 37 пациентов проведено исследование геномной ДНК, выделенной из ядросодержащих клеток костного мозга, при помощи длинной инвертированной ПЦР с целью определения точки разрыва в гене *MLL* и гене-партнере [52].

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 6.0. Статистическая значимость различий определялась при помощи непараметрических критериев χ^2 и Манна–Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$. Для оценки возможного прогнозирования наличия перестроек гена *MLL* для каждого иммунологического маркера рассчитывали диагностическую чувствительность, специфичность, прогностическую ценность положительного и отрицательного результа-

тов, а также общую диагностическую эффективность теста [53].

Результаты исследования

Распределение вариантов ОЛ, по данным иммунофенотипирования, у пациентов первого года жизни ($n = 64$) и более старших детей ($n = 268$) показано на рис. 1. У детей первого года жизни ОЛЛ выявлялся достоверно реже ($p = 0,0001$), а ОМЛ и острый билинейный лейкоз (ОБЛЛ) – достоверно чаще ($p = 0,0076$ и $p = 0,0047$ соответственно), чем у пациентов старше 1 года. Для острого бифенотипического лейкоза (ОБфЛ) и острого недифференцированного лейкоза (ОНдЛ) значимых различий обнаружено не было ($p = 0,3568$ и $p = 0,4354$ соответственно). У 1 пациента исследуемой группы blasts имели иммунофенотип ОМЛ, в то время как при цитоморфологическом исследовании был определен ОЛЛ.

Распределение иммунологических вариантов ОЛЛ у пациентов первого года жизни ($n = 43$) и более старших детей ($n = 235$) показано на рис. 2.

Среди ОЛЛ у детей первого года жизни преобладали ОЛЛ из В-линейных предшественников. На долю же ВIV-ОЛЛ и Т-линейных ОЛЛ суммарно приходилось менее 5 % случаев. Среди иммунологических вариантов ОЛЛ в исследуемой группе доминировал VI, который выявлялся статистически значимо чаще, чем у пациентов старше 1 года ($p < 0,0001$), в то время как VII-ОЛЛ у детей первого года жизни встречался значительно реже ($p < 0,0001$). Для VIII-ОЛЛ, ВIV-ОЛЛ и Т-линейных ОЛЛ значимых различий обнаружено не было ($p = 0,2197$, $p = 0,9668$ и $p = 0,0932$ соответственно).

В 32 (78,5 %) из 41 случая ОЛЛ из В-линейных предшественников у детей первого года жизни были

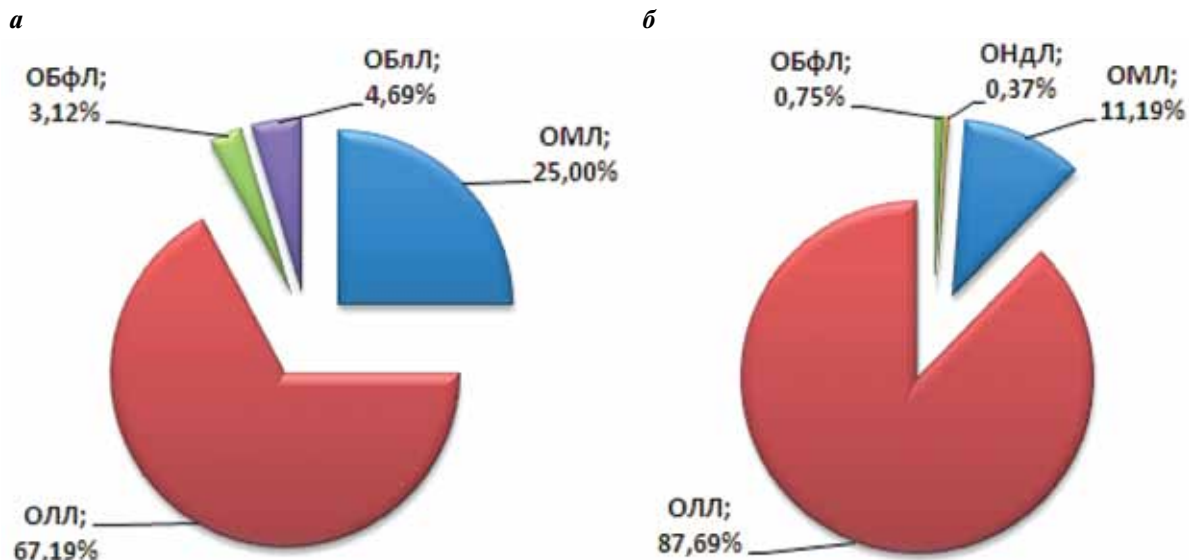


Рис. 1. Распределение вариантов ОЛ, по данным иммунофенотипирования: а – у пациентов первого года жизни ($n = 64$), б – у более старших детей ($n = 268$)

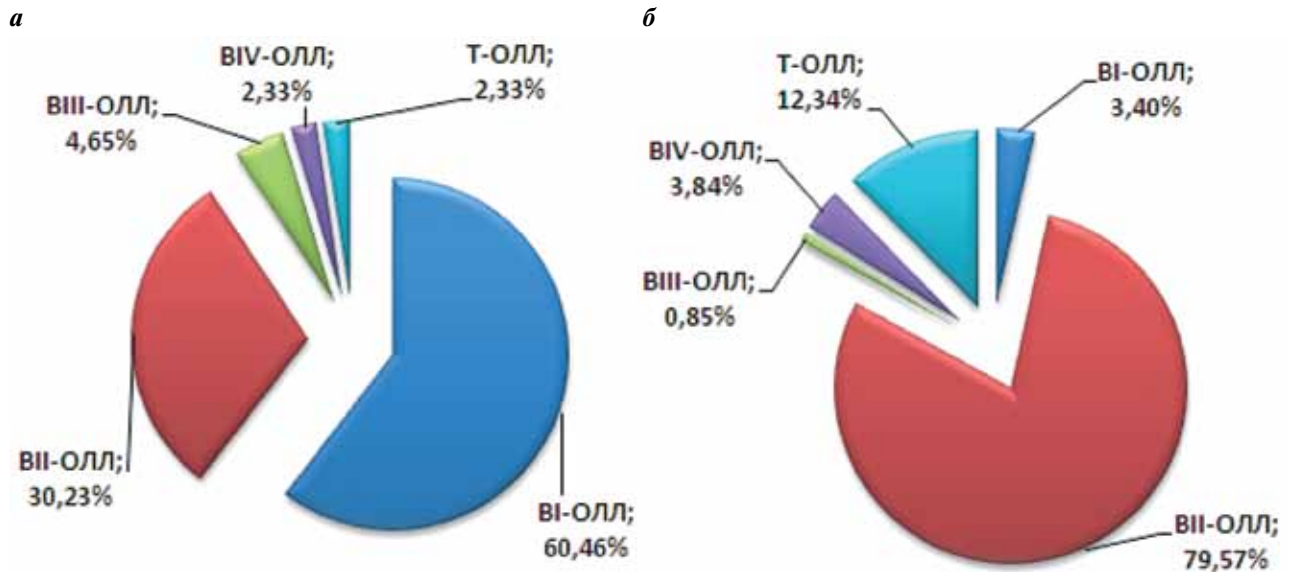


Рис. 2. Распределение иммунологических вариантов ОЛЛ: а – у пациентов первого года жизни (n = 43), б – у детей старше года (n = 235)

выявлены различные перестройки гена *MLL*. Десять пациентов (59,4 %) имели *MLL-AF4*, 5 (15,6 %) – *MLL-MLLT1* (ранее обозначаемый как *MLL-ENL*), по 3 (9,4 %) – *MLL-EPS15 (MLL-AF1p)* и *MLL-MLLT3 (MLL-AF9)*, по 1 (3,1 %) – *MLL-MLLT10 (MLL-AF10)* и *MLL-AFF3 (MLL-LAF4)*.

Иммунофенотип опухолевых клеток пациентов с ОЛЛ, ассоциированным с перестройками гена *MLL (MLL(+))*, существенно отличался от фенотипа бластов пациентов, у которых эти перестройки обнаружены не были (*MLL(-)*). Так, все *MLL(-)*-пациенты имели ВП-ОЛЛ, в то время как в группе *MLL(+)* у 25 (78,1 %) пациентов был выявлен ВП-ОЛЛ, у 5 (15,6 %) – ВП-ОЛЛ и у 2 (6,3 %) – ВП-ОЛЛ. Экспрессия антигенов опухолевыми клетками пациентов с *MLL(+)* и *MLL(-)* ОЛЛ из В-линейных предшественников приведена в табл. 2.

Наши данные позволяют утверждать, что экспрессия NG2, CD45, CD133 и CD15, а также отсутствие экспрессии CD10 и CD20 могут прогнозировать наличие перестройки гена *MLL*. При этом CD10(+) ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) в группе *MLL(+)*- и *MLL(-)* существенно различались по распределению экспрессии CD10. Если в группе *MLL(-)* только у 1 пациента из 9 опухолевая популяция была гетерогенна по экспрессии данного маркера, то среди *MLL(+)*-пациентов, наоборот, гомогенная экспрессия CD10 была выявлена лишь у 1 больного из 7 ($p = 0,0133$). Кроме того, у пациентов с *MLL(+)* ОЛЛ доля CD10-позитивных бластов была статистически значимо ниже, чем у *MLL(-)*-пациентов: медиана 46,3 % с диапазоном 25,5–86,7 % и медиана 97,9 % с диапазоном 66,1–99,9 % соответственно; $p = 0,0004$. Качественное определение экспрессии CD22 не позволило разграничить *MLL(+)*- и *MLL(-)*-пациентов, но процентное содержание CD22-позитивных бластов

Таблица 2. Экспрессия антигенов опухолевыми клетками пациентов с *MLL(+)* и *MLL(-)* ВП-ОЛЛ

	<i>MLL(+)</i>	<i>MLL(-)</i>	<i>p</i>
CD10	7/32	9/9	0,0001
CD20	3/29	7/9	0,0003
CD22	22/23	6/6	0,4615
CD45	32/32	5/9	0,0009
CD34	21/32	8/9	0,3470
CD133	22/30	1/8	0,0065
CD99	13/18	2/6	0,2236
CD33	2/32	0/8	0,8561
CD13	3/31	1/8	0,6753
CD15	22/30	1/6	0,0298
CD65	8/19	0/5	0,2135
CD117	2/23	0/7	0,9540
NG2	26/27	0/6	< 0,0001
cyt IgM	2/32	0/9	0,9149

Примечание. Данные представлены в формате «число позитивных пациентов / общее число пациентов, которым проводилось определение экспрессии антигена».

между этими группами различалось (медиана 89,9 %, диапазон 25,2–99,7 % и медиана 99,9 %, диапазон 96,0–99,9 % соответственно; $p = 0,0026$). Для CD34 подобных закономерностей выявлено не было (медиана 85,6 %, диапазон 26,4–99,9 % и медиана 69,6 %, диапазон 39,1–99,9 % соответственно; $p = 0,6495$). Типичные примеры экспрессии антигенов представлены на рис. 3. Характеристики параметров диагностической информативности определения экспрессии CD10, CD20, CD45, CD133, CD15 и NG2 для прогнозирования наличия перестроек гена *MLL* представлены в табл. 3.

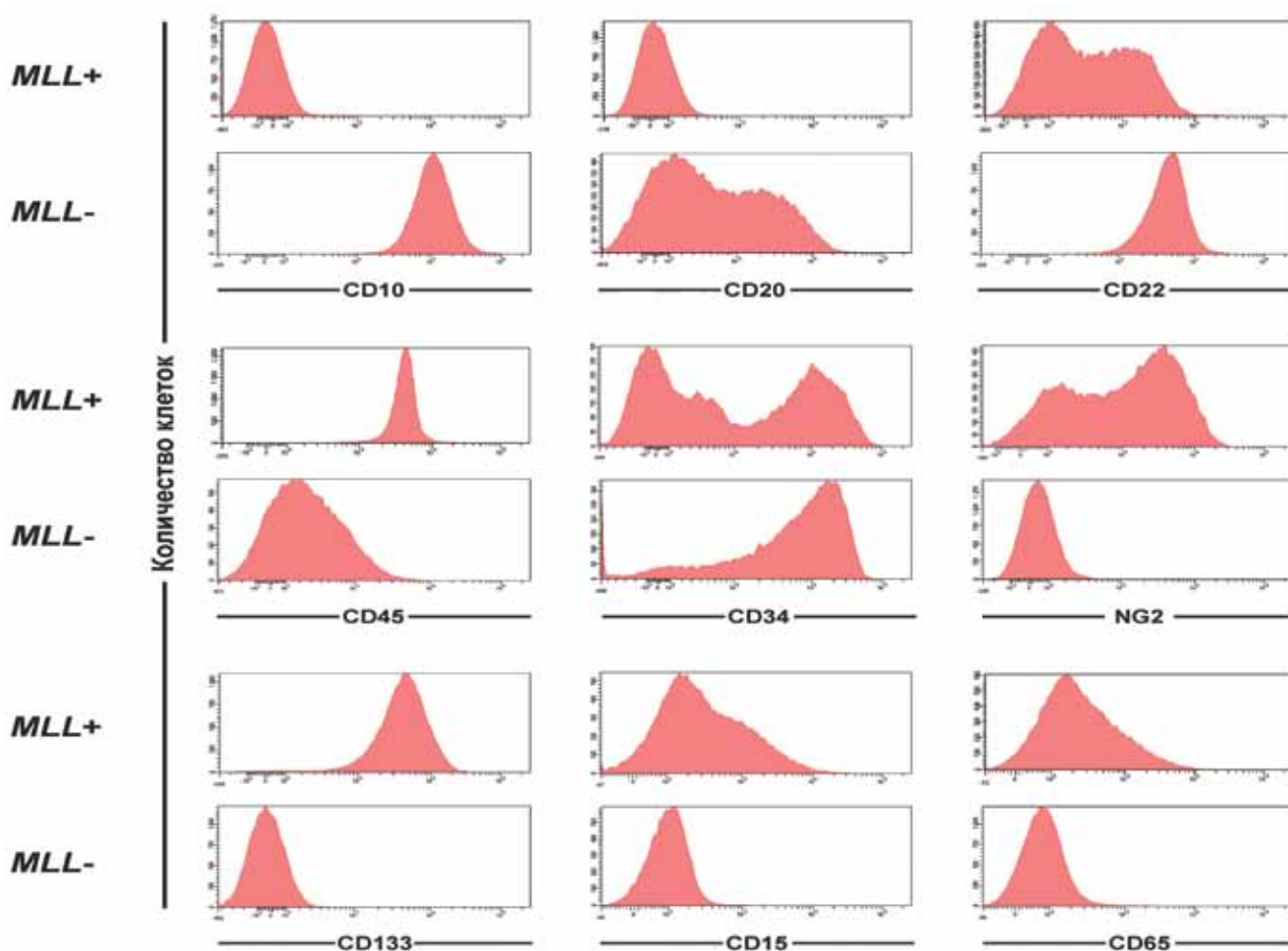


Рис. 3. Типичные примеры экспрессии антигенов при ВП-ОЛЛ с наличием перестроек гена *MLL* (*MLL*(+)) и без них (*MLL*(-)) у детей первого года жизни

Таблица 3. Характеристики параметров диагностической информативности определения экспрессии антигенов для прогнозирования наличия перестроек гена *MLL*

	ДЧ (%)	Сп (%)	ПЦПР (%)	ПЦОР (%)	ДЭТ (%)
Отсутствие экспрессии CD10	78,1	100	100	56,2	82,9
Отсутствие экспрессии CD20	89,7	77,8	92,9	70,0	86,8
Экспрессия CD45	100	44,4	86,5	100	87,8
Экспрессия CD133	73,3	87,5	95,7	46,7	76,3
Экспрессия CD15	60,8	83,3	95,7	38,5	75,0
Экспрессия NG2	96,3	100	100	85,7	96,7

Примечание. ДЧ – диагностическая чувствительность, Сп – специфичность, ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата.

В литературе описаны некоторые различия иммунофенотипа опухолевых клеток при наличии химерного гена *MLL-AF4* и наличии других перестроек гена *MLL* [41, 46]. В нашем исследовании было установлено, что экспрессия CD34 и CD65 коррелирует с наличием химерного гена *MLL-AF4* ($p = 0,0216$

и $p = 0,0331$ соответственно). Однако характеристики параметров диагностической информативности для прогнозирования наличия химерного гена *MLL-AF4* оказались относительно невысоки (диагностическая эффективность теста (ДЭТ) – 75,0 % и 78,9 % соответственно). Подсчет MESF NG2, как и

качественное определение экспрессии этого маркера, также не позволил четко разграничить пациентов с наличием химерного гена *MLL-AF4(+)* и пациентов с другими перестройками гена *MLL* (медиана MESF 2156, диапазон 382–19187 и медиана MESF 1413, диапазон 34–9141 соответственно; $p = 0,2720$).

Иммунофенотип опухолевых клеток был также связан с возрастом больных – одним из важнейших прогностических факторов ОЛЛ у детей первого года жизни. Так, CD10(+) ОЛЛ из В-линейных предшественников достоверно чаще встречался у пациентов старше 6 месяцев, в то время как CD10(-)-варианты – у детей младше полугода (57,89 % и 77,27 % соответственно; $p = 0,0476$).

Среди детей младше 1 года с ОЛЛ были также диагностированы 1 пациент с ВIV-ОЛЛ и 1 – с TIV-ОЛЛ.

Иммунофенотип пациента с ВIV-ОЛЛ имел большее сходство с ОЛЛ из В-линейных предшественников, нежели чем с лимфомой Беркитта. В частности, была обнаружена высокая экспрессия CD58 – антигена, как правило, не встречающегося при лимфомах [54], относительно низкая экспрессия CD45, а также отсутствие субтотального количества CD20-позитивных клеток. Была выявлена экспрессия λ -цепи иммуноглобулинов на мембране и в цитоплазме 89,5 % опухолевых клеток. Также на опухолевых клетках не было обнаружено миелоидных антигенов и NG2. Молекулярно-генетические методы (ОТ-ПЦР, FISH и длинная инвертированная ПЦР) не выявили у данного пациента каких-либо перестроек гена *MLL*. Также не были обнаружены перестройки генов *MYC* и *IgH* при исследовании методом FISH.

Опухолевые клетки пациентки с TIV-ОЛЛ экспрессировали CD7, CD5, CD45, CD99, CD3, *cytCD3*, CD8, CD34 и Т-клеточный рецептор $\gamma\delta$ -типа. Экспрессия CD2, CD4, CD1a, NG2, TdT, CD133, а также миелоидных и В-линейных маркеров выявлена не была. При исследованиях с использованием ОТ-ПЦР, длинной инвертированной ПЦР и FISH перестройки гена *MLL* не были обнаружены, однако был выявлен химерный ген *SCL-TAL1 (SIL-TAL1)*, наличие которого характерно для Т-линейных ОЛЛ старшего возраста.

Обсуждение полученных результатов

ОЛЛ у детей первого года жизни характеризуется особенной биологией, тяжелым клиническим течением и неблагоприятным прогнозом [7–12]. Эти особенности обусловлены наличием перестроек гена *MLL*, наиболее часто встречающихся именно у пациентов данной возрастной группы.

На протяжении длительного времени ведутся работы по поиску иммунологических маркеров, позволяющих с достаточно высокой вероятностью прогнозировать наличие молекулярно-генетических

аббераций с вовлечением региона 11q23. В ранних и некоторых современных работах указывалось на достаточно высокую диагностическую эффективность отсутствия экспрессии CD10 [34, 35, 43], хотя ВI-вариант ОЛЛ встречается и среди *MLL*-негативных пациентов [39], а у части *MLL*-позитивных пациентов опухолевые клетки CD10-положительны [39, 43]. Экспрессия миелоидных антигенов CD15 и CD65 также часто выявляется при наличии перестроек гена *MLL*, однако данные маркеры очень специфичными не считаются [39, 41]. После того как в 1996 г. F. Behm et al. описали экспрессию антигена NG2, распознаваемого антителом 7.1, *MLL*-позитивных ОЛ [44], внимание исследователей переключилось на этот маркер. Неоднократно было показано, что NG2 является очень специфичным *MLL*-ассоциированным антигеном [36, 39–42, 44–46].

В настоящее время типичный иммунофенотип опухолевых клеток при ОЛЛ, ассоциированном с перестройками гена *MLL*, описан достаточно четко [36, 39–46]. В то же время опубликовано относительно немного работ, посвященных иммунофенотипированию различных вариантов ОЛЛ у детей первого года жизни, как имеющих *MLL*-перестройки, так и без них [36, 39]. Обычно описывается иммунофенотип только *MLL*-позитивных пациентов, вне зависимости от возраста [40–46]. Известно, что иммунофенотип ОЛЛ в данной возрастной группе является важным прогностическим фактором [24–27, 30, 32, 34–36]. Поэтому основной задачей нашей работы было описание распределения иммунологических вариантов ОЛЛ у всех детей младше 1 года и выявления связи экспрессии антигенов у этих пациентов с наличием и типом перестройки гена *MLL*.

В проведенном нами исследовании частота выявления ОЛЛ составила 67,19 % от всех ОЛ у детей первого года жизни, в то время как среди ОЛ у детей более старшего возраста ОЛЛ встречался чаще (87,69 %). Распределение иммунологических вариантов ОЛЛ у пациентов младше 1 года отличалось от детей старшего возраста. В исследуемой группе преобладал ВI-ОЛЛ (60,46 %), на долю же наиболее частого в других возрастных группах ВII-ОЛЛ приходилось лишь 30,23 %. В целом, среди пациентов первого года жизни, как и в более старшей возрастной группе, преобладали ОЛЛ из В-линейных предшественников. Иммунофенотипы ОЛЛ из В-линейных предшественников существенно отличались и внутри исследуемой группы, в зависимости от наличия перестроек гена *MLL*. Так, все *MLL*(-)-пациенты имели ВII-ОЛЛ, в то время как в группе *MLL*(+) преобладал ВI-вариант. Кроме того, при ВII-ОЛЛ у *MLL*(+)-пациентов опухолевая популяция чаще всего была гетерогенна по экспрессии CD10, в то время как у *MLL*(-)-пациентов данный антиген экспрессировался преимущественно гомогенно. Были выявлены также различия в количестве *MLL*(+)-

и *MLL(-)*-пациентов, опухолевые клетки которых экспрессировали CD10, CD20, CD45, CD133, CD15, NG2. Кроме того, доля CD22-позитивных клеток была выше у детей с *MLL*. Отсутствие экспрессии CD10 и CD20, а также высокая экспрессия CD45, CD15, CD65 и NG2 характеризовали иммунофенотип опухолевых клеток при наличии перестроек гена *MLL*. Диагностическая эффективность выявления экспрессии NG2 для прогнозирования наличия перестроек гена *MLL* оказалась наиболее высокой, в то время как для остальных маркеров ДЭТ была значительно ниже. Диагностическая эффективность CD10, предлагаемого некоторыми авторами для разграничения *MLL(+)* и *MLL(-)*-пациентов [43], оказалась ниже, чем у NG2, CD45 и CD20.

Так как наличие любых перестроек гена *MLL* является неблагоприятным прогностическим фактором, их поиск крайне необходим для правильного подбора терапии. Описано большое количество вариантов генетических нарушений с участием региона 11q23 [55]. Однако в рутинной лабораторной практике методом ОТ-ПЦР чаще всего проводится определение только химерного гена *MLL-AF4* [50, 51]. При этом среди всех вариантов перестроек гена *MLL*, встречающихся у детей первого года жизни, на долю *MLL-AF4* приходится около половины [9, 11, 19, 28, 39, 56] (в нашем исследовании – 59,4 %).

Таким образом, при проведении обычного рутинного определения наиболее частых молекулярно-генетических нарушений у пациентов младше 1 года с ОЛЛ у существенного количества *MLL(+)*-больных перестройки данного гена выявлены не будут. В то

же время эффективность прогнозирования наличия любых перестроек гена *MLL* с помощью определения экспрессии NG2 в нашем исследовании составила 96,7 %, поэтому использование данного антигена при первичном иммунофенотипировании ОЛЛ у детей первого года жизни представляется крайне необходимым. При обнаружении экспрессии опухолевыми клетками NG2 следует проводить более углубленный поиск перестроек гена *MLL* при помощи мультиплексной ОТ-ПЦР, длинной инвертированной ПЦР и FISH, а не ограничиваться стандартным определением химерного гена *MLL-AF4*. Это особенно важно именно в данной возрастной группе, где *MLL*-перестройки выявляются у большинства пациентов [17–19], а их наличие является важнейшим прогностическим фактором [9, 11, 12, 20–29].

Кроме того, в работах различных исследовательских групп было показано, что существуют иммунофенотипические различия и внутри группы *MLL(+)*, в зависимости от типа химерного гена [41, 46]. В нашем исследовании экспрессия CD34 и CD65 была более характерна для пациентов с *MLL-AF4(+)*. В то же время различия в количественной экспрессии NG2, выраженной в единицах MESF, не достигли статистической достоверности, что не согласуется с результатами некоторых других исследований [41, 46]. Причиной подобных расхождений может быть различный подход к формированию исследуемой группы. В отличие от большинства исследований/исследователей мы целенаправленно обследовали всех без исключения детей первого года жизни с ОЛ, а не только *MLL(+)*-пациентов.

Л и т е р а т у р а

1. Stanula M., Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009;46:52–63.
2. Schrappe M., Camitta B., Pui C.-H. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14:2193–4.
3. Pui C.H. Toward a total cure for acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:5121–3.
4. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;4:19–27.
5. Mörike A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24:265–84.
6. Pui C.H., Pei D., Sandlund D.T. et al. Long-term results of St. Jude Total therapy studies 11, 12, 13A, 13B and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24:371–82.
7. Bhojwani D., Howard S.C., Pui C.-H. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9(Suppl. 3):222–30.
8. Шориков Е.В. Результаты программного лечения острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 39 с.
9. Hilden J.M., Dinndorf P.A., Meerbaum S.O. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood* 2006;108(2):441–51.
10. Biondi A., Rizzari C., Valsecchi M.G. et al. Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies. *Haematologica* 2006;91:534–7.
11. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomized trial. *Lancet* 2007;370:240–50.
12. Tomizawa D., Koh K., Sato T. et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an *MLL* gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, *MLL96* and *MLL98*, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia* 2007;21:2258–63.
13. Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B. et al. *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genetics* 2002;30:41–7.
14. Zangrando A., Dell'Orto M.C., te Kronnie G., Basso G. *MLL* rearrangements in pediatric acute lymphoblastic and myeloblastic leukemias: *MLL* specific and lineage-specific signatures. *BMC Med Genom* 2009;23:2–36.
15. Stam R.W., Schneider P., Hagelstein J.A.P. et al. Gene expression profiling-based dissection of *MLL* translocated and *MLL* germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood* 2010;115:2835–44.
16. Qazi S., Uckun F.M. Gene expression profiles of infant acute lymphoblastic leukemia and its prognostically distinct subsets. *Br J Hematol* 2010;149:865–73.
17. Chen C.-S., Sorensen P., Domer P. et al. Molecular rearrangements on chromosome

- 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993;81:2386–93.
18. Szczepanski T., Harrison C.J., van Dongen J.J.M. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implication for management of patients. *Lancet Oncol* 2010;11:880–9.
19. Цаур Г.А., Попов А.М., Алейникова О.В. и др. Характеристика перестроек 11q23 (MLL) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематол* 2011;3:57–64.
20. Pui C.H., Behm F.G., Downing J.R. et al. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994;12:909–15.
21. Rubnitz J.E., Link M.P., Shuster J.J. et al. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1994;84:570–3.
22. Cimino G., Rapanotti M.C., Rivolta A. et al. Prognostic relevance of ALL-1 gene rearrangement in infant acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:391–5.
23. Pui C.H., Ribeiro R.C., Campana D. et al. Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants. *Leukemia* 1996;10:952–6.
24. Taki T., Ida K., Bessho F. et al. Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangements in infant acute leukemia. *Leukemia* 1996;10:1303–7.
25. Dordelmann M., Reiter A., Borkhardt A. et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;94:1209–17.
26. Heerema N.A., Sather H.N., Ge J. et al. Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) – a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia* 1999;13:679–86.
27. Reaman G.H., Sposto R., Sensel M.G. et al. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1999;17:445–55.
28. Isoyama K., Eguchi M., Hibi S. et al. Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). *Br J Haematol* 2002;118:999–1010.
29. Fechina L., Shorikov E., Tsaour G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A; abstr. 2828.
30. Chessells J.M., Eden O.B., Bailey C.C. et al. Acute lymphoblastic leukaemia in infancy: experience in MRC UKALL trials. Report from the Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Leukemia* 1994;8:1275–9.
31. Frankel L.S., Ochs J., Shuster J.J. et al. Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493). *J Pediatr Hematol/Oncol* 1997;19:35–42.
32. Silverman L.B., McLean T.W., Gelber R.D. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 1997;80:2285–95.
33. Kosaka Y., Koh K., Kinukawa N. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:3527–34.
34. Basso G., Putti M.C., Cantú-Rajoldi A. et al. The immunophenotype in infant acute lymphoblastic leukaemia: correlation with clinical outcome. An Italian multicentre study (AIEOP). *Br J Haematol* 1992;81:184–91.
35. Ferster A., Bertrand Y., Benoit Y. et al. Improved survival for acute lymphoblastic leukaemia in infancy: the experience of EORTC-Childhood Leukaemia Cooperative Group. *Br J Haematol* 1994;86:284–90.
36. Szczepanski T., Sedek L., de Lorenzo P. et al. Prognostic value of immunophenotype in infant ALL – results of the INTERFANT'99 study. *Blood* 2010;110(11):832A; abstr. 2700.
37. Van der Velden V.H.J., Corral L., Valsecchi M.G. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23(6):1073–9.
38. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематол* 2010;2:46–54.
39. Borkhardt A., Wuchter C., Viehmann S. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia – combined cytogenetic, immunophenotypic and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia* 2002;16:1685–90.
40. Hrusak O., Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16:1233–58.
41. De Zen L., Bicciato S., te Kronnie G., Basso G. Computational analysis of flow cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification. *Leukemia* 2003;17:1557–65.
42. Schwartz S., Reider H., Schlager B. et al. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangements and a CD10-/CD24-/CD65s+/CD15+ B-cell immunophenotype. *Leukemia* 2003;17:1589–95.
43. Attarbaschi A., Mann G., Konig M. et al. Mixed Lineage Leukemia – rearranged childhood pro-B and CD10-negative pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin Cancer Res* 2006;15(10):2988–94.
44. Behm F.G., Smith F.O., Raimondi S.C. et al. Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21; q23) or t(11;19)(q23; p13) and MLL gene rearrangements. *Blood* 1996;87(3):1134–9.
45. Wuchter C., Harbott J., Schoch C. et al. Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody 7.1. *Leukemia* 2000;14:1232–8.
46. Zangrando A., Intini F., te Kronnie G., Basso G. Validation of NG2 in identifying BP-ALL patients with MLL-rearrangements using qualitative and quantitative flow cytometry: a prospective study. *Leukemia* 2008;22:858–61.
47. Bene M., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6.
48. ISCN: An International System Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Eds: Shaffer L.G., Tommerup N. Karger, Basel, Switzerland, 2005.
49. Pallisgaard N., Hokland P., Riishoj D. et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92:574–88.
50. Van Dongen J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901–18.
51. Gabert J., Beillard E., van der Velden V. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(12):2318–57.
52. Meyer C., Schneider B., Reichel M. et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *PNAS* 2005;102(2):449–54.
53. Weinstein S., Obuchowski N.A., Lieber M.L. Clinical evaluation of diagnostic tests. *Am J Roentgenol* 2005;184:14–9.
54. Veltroni M., De Zen L., Sanzari M.C. et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003;88(11):1245–52.
55. Meyer C., Kowart E., Hoffmann J. et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23:1490–9.
56. Chessells J., Harrison C., Kempinski H. et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia* 2002;16:776–84.