Наука та інновації. 2013. Т. 9. № 1. С. 44—54

Д.Ф. Глузман[1], Л.М. Скляренко[1], В.О. Надгорна[1], М.П. Завелевич[1], Л.Ю. Полудненко[1], Т.С. Іванівська[1], Н.І. Українська[1], Г.Д. Телегєєв[2], М.В. Дибков[2], Л.О. Поліщук[2]

[1] Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ
[2] Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

РОЗРОБКА І ВПРОВАДЖЕННЯ В КЛІНІЧНУ ПРАКТИКУ КОМПЛЕКСУ ІМУНОЦИТОХІМІЧНИХ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ДІАГНОСТИКИ ГОСТРИХ ЛЕЙКЕМІЙ

Розроблено і впроваджено в клінічну практику комплекс сучасних технологій діагностики гострих лейкемій (ГЛ) згідно з новою класифікацією ВООЗ. Визначено основні форми і цитологічні варіанти гемобластозів у 755-и хворих України, серед яких у третини пацієнтів встановлено діагноз гострого лейкозу (ГЛ). Здійснено розробку дизайну нуклеотидної послідовності праймерів для виявлення транскриптів химерних генів bcr/abl (t(9;22)(q34;q11)); mll/af4 (t(4;11)(q21;q23)); mll/af9 (t(9;11)(p22;q23)) з метою проведення зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Метод ЗТ-ПЛР використаний для диференційної діагностики у хворих на ГЛ.

Ключові слова: гострі лейкемії, цитоморфологічна діагностика, цитохімія, імунофенотипування, зворотньо-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція.

Пухлини кровотворної і лімфоїдної тканин серед всіх форм злоякісних новоутворень займають 5-е місце у чоловіків і 8-е місце у жінок (ВООЗ, 2008 р.). За даними Національного ракового реєстру України (2010 р.) особливо високою в статево-віковій структурі захворюваності і смертності є питома вага гострих лейкемій у дітей (до 17 років) і молоді (19—28 років). Незадовільною є діагностика, яка базується на застарілих класифікаціях гемобластозів і використанні рутинних методів лабораторних досліджень. В значній мірі цим пояснюється недостатня ефективність терапії, спрямованої на знищення клону лейкемічних клітин, бо не враховується їх лінійне походження і ступінь диференціювання.

Використання сучасних імуноцитохімічних методів і достатньо повної панелі антитіл до лінійно-специфічних, диференційовочних та активаційних антигенів кровотворних клітин в комплексі з сучасними молекулярно-генетичними методами дає змогу виділити основні форми гострої мієлоїдної та гострої лімфоїдної лейкемій зі збалансованими транслокаціями або інверсіями, що має значення для призначення відповідної схеми лікування та прогнозу захворювання.

Гострі лейкемії (ГЛ) — це біологічно гетерогенна група захворювань, в основі розвитку яких лежить неконтрольована проліферація трансформованих стовбурових кровотворних клітин або клітин-попередників гемопоезу.

© Д.Ф. ГЛУЗМАН, Л.М. СКЛЯРЕНКО, В.О. НАДГОРНА, М.П. ЗАВЕЛЕВИЧ, Л.Ю. ПОЛУДНЕНКО, Т.С. ІВАНІВСЬКА, Н.І. УКРАЇНСЬКА, Г.Д. ТЕЛЕГЄЄВ, М.В. ДИБКОВ, Л.О. ПОЛІЩУК, 2013

Визначення біологічного підтипу лейкозу має першочергове значення для вибору тактики лікування і прогнозування перебігу захворювання. Спеціалісти-онкогематологи прийшли до висновку про необхідність використання вичерпно повної панелі доступних на сьогодні методів дослідження для детальної характеристики клітин циркулюючого клону. Така панель повинна включати, передусім, цитоморфологічні і цитохімічні методи як основу діагностики, методи імунофенотипування для визначення поверхневих, цитоплазматичних і ядерних антигенів клітин патологічного клону (імуноцитохімічні методи, багатопараметрична проточна цитометрія), цитогенетичні і молекулярно-генетичні методи, включаючи флуоресцентний метод гібридизації *in situ* (FISH) та метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Прикладом успішного використання в клінічній практиці розшифрованих молекулярних механізмів лейкозогенезу є збільшення кількості лікарських препаратів, які специфічно діють на основну ланку патогенезу. Наприклад, препарати транс-ретиноєвої кислоти при гострій промієлоцитарній лейкемії цілеспрямовано впливають на химерний білок, що продукується зливним геном, утвореним в результаті специфічної хромосомної транслокації *t*(15;17).

Зусилля учених всього світу сьогодні спрямовані на пошук «молекулярних мішеней», впливаючи на які можна було б викликати диференціювання або досягти елімінації клітин патологічного клону.

1. ГОСТРІ ЛЕЙКЕМІЇ МІЄЛОЇДНОГО ПОХОДЖЕННЯ

В основі розвитку гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ) лежить злоякісна трансформація стовбурової кровотворної клітини: мульти-, бі-, або уніпотентних мієлоїдних клітин-попередників. ГМЛ у дорослих хворих складають близько 80 % усіх ГЛ. Пік захворюваності припадає на людей у віці після 60 років (серед хворих дещо переважають чоловіки). У дітей ГМЛ зустрічаються набагато рідше, ніж у дорослих і складають 17—20 % усіх ГЛ у дітей.

Комбіноване використання результатів морфологічних, цитохімічних і імунофенотипових досліджень необхідне для первинної діагностики ГМЛ і дозволяє з високою достовірністю передбачати наявність прогностичних цитогенетичних аномалій, що зустрічаються при ГМЛ: *t*(15;17) — в 95 % випадків; *inv*16/*t*(16;16) — в 88 %; *t*(8;21) — в 87,5 % випадків.

Порівняння різних класифікаційних схем при діагностиці ГМЛ показало, що виділення морфоцитохімічних варіантів ГМЛ за франко-американо-британською (ФАБ) класифікацією [1] дуже важливе, оскільки виявлені істотні відмінності варіантів ГМЛ М0, М3 і М4Ео від усіх інших ФАБ-типів ГМЛ в рівні ремісії і 5-річної виживаності. Показано тісний зв'язок варіанту ГМЛ М0 з несприятливою цитогенетичною аномалією 11q23 (група високого ризику).

У класифікації ВООЗ [2] варіанти ГМЛ виділяються на підставі морфологічних і цитогенетичних характеристик бластних клітин, але при цьому враховуються цитохімічні і імунофенотипові характеристики клітин, що беруть участь в лейкозному процесі, які детально розглянуті у ФАБ-класифікації.

При морфоцитологічній діагностиці ГМЛ слід виділяти два основні типи субстратних клітин-мієлобластів. *Мієлобласти I типу* мають високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, ніжну структуру ядерного хроматину, містять від 2-х до 4-х ядерець. Забарвлення цитоплазми, що не містить азурофільних гранул, коливається від блідого до помірно базофільного. *Мієлобласти II типу* — це клітини, за морфологічними ознаками схожі з бластами I типу, але з більшим вмістом цитоплазми, що містить ніжні азурофільні гранули. У хворих на ГМЛ у кістковому мозку і периферичній крові можуть виявлятися мієлобласти з численними азурофільними гранулами, так звані *мієлобласти III типу*, що можуть переважати в ряді випадків при ГМЛ М2, асоційованому з транслокацією t(8;21). Критичне зна-

чення для встановлення діагнозу ГМЛ має визначення процентного вмісту бластних клітин у кістковому мозку. У новій класифікації ВООЗ пухлинних захворювань кровотворної і лімфоїдної тканин цей поріг знижено до 20 %.

Таким чином, діагноз ГМЛ правомірний за наявності не менше 20 % бластів у кістковому мозку. При ГМЛ М0, М1 і М2 — це винятково мієлобласти I і II типу, при ГМЛ М3 субстратними клітинами є аномальні промієлоцити (вміст мієлобластів нижче 20 %). При ГМЛ М5а проліферуючі клітини мають вигляд або типових монобластів, або нагадують лімфобласти L2 ФАБ типу. При ГМЛ М5b переважаючим типом клітин є монобласти і промоноцити з характерними цитохімічними властивостями. Мегакаріобласти при ГМЛ М7, що визначаються в кістковому мозку і периферичній крові, варіюють за формою і розмірами, іноді мають характерні цитоплазматичні вирости, але часто без чітких морфоцитохімічних особливостей. Тому діагноз ГМЛ М7, як утім і ГМЛ М0, правомірний тільки після проведення імунофенотипування.

Особливе значення для діагностики ГМЛ мають методи цитохімічного дослідження. Експерти ФАБ-групи запропонували для встановлення природи лейкемічних бластів використати визначення активності мієлопероксидази (МПО), неспецифічних естераз (НЕ) і забарвлення ліпідів суданом чорним Б (СЧБ). За допомогою цього комплексу цитохімічних методів варіант ГМЛ вдалося визначити в переважній більшості випадків.

Ми у своїй повсякденній роботі використовували метод фарбування мазків за Паппенгеймом і 4 основні цитохімічні реакції: визначення активності ендогенної МПО, КФ, кислої НЕ (кНЕ), і PAS-реакцію. За необхідності застосовували також методи визначення СЧБ і ХАЕ. Мієлопероксидаза є високоспецифічною для клітин гранулоцитарного паростку, і в мієлобластах виявляється у вигляді різної величини гранул, іноді зібраних у зоні апарату Гольджі. У монобластах активність МПО або не визначається, або слабка активність у вигляді ніжних гранул виявляється по усій цитоплазмі. Еритробласти, мегакаріобласти і базофільні лейкоцити МПО негативні.

Таким чином, враховуючи цитоморфологічні, цитохімічні та фенотипові властивості бластних клітин, виділяють вісім форм ГМЛ (М0-М7):

1) гостра мієлобластна лейкемія з мінімальними ознаками диференціювання (ГМЛ М0);

2) гостра мієлобластна лейкемія без дозрівання (ГМЛ М1);

3) гостра мієлоїдна лейкемія з ознаками дозрівання (ГМЛ М2);

4) гостра промієлоцитарна лейкемія (ГМЛ М3) і її варіант (ГМЛ М3v);

5) гостра мієломоноцитарна лейкемія (ГМЛ М4);

6) гостра монобластна і моноцитарна лейкемія (ГМЛ М5а і ГМЛ М5b відповідно);

7) гостра еритролейкемія (ГМЛ М6);

8) гостра мегакаріобластна лейкемія (ГМЛ М7) [3, 4].

Проведення імунофенотипічних досліджень бластних клітин при ГМЛ обов'язкове, якщо бластні клітини не виявляють активності МПО, або ж кількість МПО-позитивних бластів невелика, а саме при варіантах М0, М5, М6 і М7 ГМЛ [5, 6].

1) ГМЛ з мінімальними ознаками диференціювання. Даний варіант ГЛ відповідає ГМЛ М0 за ФАБ-класифікацією. Це рідкісне захворювання зустрічається в основному у дорослих хворих і складає приблизно 5 % усіх ГМЛ. Ураження кісткового мозку проявлялись у вигляді анемії, тромбоцитопенії і нейтропенії. У периферичній крові спостерігається виражений лейкоцитоз за рахунок великої кількості бластних клітин з морфологією агранулярних мієлобластів I типу. У деяких випадках бластні клітини нагадують лімфобласти (рис. 1, див. кольорову вклейку). Цитохімічні ознаки клітин негативні; активність МПО визначалась менш ніж в 3 % бластів. Бластні клітини експресували один або більше панмієлоїдних антигенів, включаючи CD117, CD13, CD33. У

більшості випадків експресувались антигени ранніх клітин-попередників гемопоезу CD34, CD38, HLA-DR.

2) ГМЛ без дозрівання. Даний варіант ГЛ відповідає ГМЛ М1 за ФАБ-класифікацією. Характеризується високим лейкоцитозом в периферичній крові і великою кількістю бластних клітин у гіперклітинному кістковому мозку (іноді бласти складають більше ніж 90 % усіх нееритроїдних клітин). Мієлобласти агранулярні або з ніжними азурофільними гранулами (I і II типу). Більше 3 % клітин демонструють активність ендогенної МПО (рис. 2, див. кольорову вклейку); в мієлобластах можуть виявлятися палички Ауера. Імунофенотип бластних клітин включав як мінімум 2 мієломоноцитарних антигени, в тому числі CD117, CD13, CD33; досить часто експресувались МПО і CD34.

Хворіють частіше дорослі (10 % усіх ГМЛ, середній вік хворих — 46 років). Перебіг агресивний, особливо у пацієнтів з гіперлейкоцитозом.

3) ГМЛ з дозріванням. Відповідає ГМЛ М2 за ФАБ-класифікацією. Захворювання складає близько 30 % усіх випадків ГМЛ. Практично в усіх випадках визначається анемія і тромбоцитопенія. У 50 % хворих спостерігається виражений лейкоцитоз, а у 25 % — лейкопенія.

Вміст бластів складає ≥ 20 % від загальної кількості нееритроїдних клітин кісткового мозку. Для цієї форми ГМЛ характерною була наявність більше 10 % дозріваючих клітин гранулоцитарного ряду (промієлоцитів, мієлоцитів). Кількість клітин моноцитарного ряду не перевищувала 20 % від загального числа нееритроїдних клітин кісткового мозку.

У більшості патологічних клітин визначається активність МПО, при цьому інтенсивність фарбування цитоплазми клітин вища, ніж у клітинах при ГМЛ М1. У більшості бластів визначається слабка активність ХАЕ і КФ. Антигенний профіль бластних клітин при ГМЛ М2 відповідає стадії мієлобластів (визначається експресія антигенів: MPO, CD13, CD33, CD15, CD16).

4) Гостра промієлоцитарна лейкемія. Відповідає ГМЛ М3 за ФАБ-класифікацією. На гостру промієлоцитарну лейкемію з транслокацією *t*(15;17)(q22;q12) припадає 5—10 % всіх випадків ГМЛ.

Основні симптоми захворювання пов'язані з геморагічними проявами. У 80—90 % хворих на ГМЛ М3 визначають виражену анемію і тромбоцитопенію. Морфологічні ознаки промієлоцитів включають значну зернистість (темні крупні гранули, які нерідко закривають ядро) (рис. 3, див. кольорову вклейку), крупні палички Ауера. При цитохімічному дослідженні в лейкемічних промієлоцитах визначали високу активність МПО (рис. 4, див. кольорову вклейку), ХАЕ. При оцінці результатів PAS-реакції в цитоплазмі клітин виявляється виражене дифузне забарвлення. При визначенні кНЕ відзначається інтенсивне дифузне забарвлення цитоплазми клітин (рис. 5, див. кольорову вклейку).

Імунофенотип специфічний для клітин мієлоїдного ряду. Позитивна реакція спостерігається при виявленні антигенів МПО, CD13, CD33, причому експресія CD33 завжди виразна, а CD13 — варіабельна.

5) Гостра мієломоноцитарна лейкемія. Відповідає ГМЛ М4 за ФАБ-класифікацією. Характеризується проліферацією клітин-попередників двох ліній: мієлоїдної і моноцитарної. Переважають клітини мієлоїдного паростку. Вміст клітин моноцитарного ряду (монобластів, промоноцитів, моноцитів) перевищує 20 % і є основним діагностичним критерієм, що дозволяє відрізнити цей варіант від інших ГМЛ, у випадку яких також присутні клітини моноцитарного паростку.

ГММЛ (ГМЛ М4) зустрічається в усіх вікових групах, але частіше у немовлят (до 1 року) і у дорослих старше 50 років. Більш характерними для дітей є варіанти ГММЛ з цитогенетичними аномаліями, що повторюються: 11q23 і inv(16).

Монобласти, що становлять частину клітинної популяції при ГММЛ, є більшими, ніж мієлобласти I і II типу, мають велику цитоплазму з варіюючою кількістю азурофільних гранул.

Істотне значення для діагностики ГММЛ мають результати цитохімічних досліджень. При цьому частина бластів виявляє ознаки, характерні для клітин гранулоцитарного ряду, а інша — клітин моноцитарної лінії. Часто істинну кількість клітин моноцитарного паростка визначають при підрахунку кількості клітин з позитивною реакцією на кНЕ. У мієлобластах спостерігається помірна і виражена реакція при визначенні активності МПО і ХАЕ, вони забарвлюються СЧВ, тоді як майже не визначається кНЕ. Для монобластів типовою є виражена реакція на кНЕ. При оцінці результатів PAS-реакції в мієлобластах спостерігається дифузне фарбування цитоплазми, а в монобластах — відкладення кінцевого продукту реакції у вигляді ніжних гранул або негативна реакція.

Бластні клітини при ГММЛ з варіабельною частотою і інтенсивністю реагують з антитілами до: CD13, CD33, CD14, CD15, CD36, CD64, CD65, CD117, HLA-DR антигенів. Досить часто на монобластах коекспресується антиген CD4.

ГММЛ з підвищеним вмістом еозинофілів у кістковому мозку (ГМЛ М4ео за ФАБ-класифікацією) асоційована з цитогенетичною аномалією в області хромосоми 16: inv(16)(p13q22).

6) Гостра монобластна лейкемія і гостра моноцитарна лейкемія. Відповідає ГМЛ М5а (5—8 % усіх ГМЛ) і ГМЛ М5b (3-6% усіх ГМЛ) за ФАБ-класифікацією. ГМЛ М5а частіше зустрічається у немовлят і молодих дорослих (до 25 років), ГМЛ М5b — частіше у дорослих; ГМЛ М5а у немовлят у більшості випадків пов'язана з транслокацією в хромосомній області 11q23.

При гострій монобластній лейкемії (ГМЛ М5а) в периферичній крові і в кістковому мозку не менше 80 % моноцитоїдних клітин являють собою монобласти; при гострій моноцитарній лейкемії (ГМЛ М5b) вміст бластів значно нижче, переважаючим типом клітин є більш зрілі промоноцити. Типові монобласти — це великі клітини (40—50 мкм в діаметрі) з обширною цитоплазмою (рис. 6, див. кольорову вклейку).

При цитохімічному дослідженні у монобластах при ГМЛ М5а визначається варіююча позитивна реакція при виявленні активності α-НЕ і кНЕ і негативна реакція при визначенні активності ХАЕ. У випадках із слабкою активністю НЕ (близько 10 % ГМЛ М5) особливого значення набуває імунофенотипування лейкозних бластів, що дозволяє визначити рівень моноцитоїдного диференціювання клітин. Монобласти зазвичай не містять МПО і не забарвлюються СЧБ; в деяких випадках може виявлятися слабка реакція на МПО. Характер PAS-реакції може бути різним. У більшості випадків спостерігається слабке дифузне забарвлення цитоплазми або продукти PAS-реакції виявляються у вигляді численних дрібних гранул. Активність КФ в монобластах при М5а негативна або слабка, при М5b — виражена.

До імунологічних маркерів клітин при ГМЛ М5 відносять експресію антигенів CD14, CD15, CD11b, CD11c, CD36, CD64, CD68 і лізоциму. Можлива коекспресія CD4 і CD7 на додаток до варіабельної експресії антигенів CD13 і CD33.

Моноцитарна спрямованість диференціювання лейкемічних бластних клітин (ГМЛ М4 і ГМЛ М5 за ФАБ) тісно пов'язана з наявністю транслокацій в області 11-ої хромосоми (11q23) [7].

7) Гострі еритроїдні лейкемії. Рідкісне захворювання (5—6 % усіх ГМЛ) з моноклональною проліферацією еритроїдних клітин, яке зустрічається переважно у дорослих. Трапляється як *de novo*, так і в результаті бластної трансформації хронічної мієлолейкемії за еритроїдним типом. Гостру еритроїдну лейкемію (ГМЛ М6 за ФАБ-класифікацією) поділяють на 2 підваріанти: *гостра еритролейкемія* (еритроїдно-мієлоїдний варіант), синонімом якої у ФАБ-класифікації є підваріант ГМЛ М6а, і «*чиста*» *еритроїдна лейкемія*, яка у ФАБ-класифікації позначена як підваріант М6b.

Гостра еритролейкемія (М6а) характеризується наявністю еритробластів (більше 50 %) і мієлобластів, вміст яких перевищує 20 % серед нееритроїдних клітин. Цей підваріант еритро-

лейкемії зустрічається переважно у літніх людей. «Чиста» еритроїдна лейкемія (M6b, еритромієлоз) — рідкісне захворювання, зустрічається у будь-якому віці, у тому числі і у дітей. Характеризується моноклональною проліферацією клітин-попередників, комітованих в еритроїдному напрямі диференціювання (більше 80 % усіх ядровмісних клітин) за відсутності мієлоїдного компоненту. Незрілі вакуолізовані еритробласти іноді нагадують лімфобласти при L3 ГЛЛ. Реакції на МПО, ХАЕ негативні, активність КФ, α-НЕ і кНЕ можлива в зоні апарату Гольджі клітини. PAS-реакція зазвичай позитивна у вигляді відкладення великих гранул або блоків у цитоплазмі клітин.

Найбільш специфічними маркерами еритроїдного диференціювання є глікофорин А і гемоглобін А, але вони експресуються на мінорній популяції більш зрілих морфологічно розпізнаваних клітин еритроїдного паростку після стадії проеритробласту, тобто їхнє використання для діагностики еритролейкемії обмежене.

8) Гостра мегакаріобластна лейкемія. ГМЛ М7 за ФАБ-класифікацією — одна з форм ГМЛ, де переважаючу частину популяції бластів складають трансформовані родоначальні клітини мегакаріоцитарного ряду. Варіант ГМЛ М7 складає 2—4 % усіх випадків ГМЛ і зустрічається в усіх вікових групах. У хворих визначається анемія. У периферичній крові зустрічаються скупчення тромбоцитів або атипові велетенські тромбоцити. У кістковому мозку у частини хворих можна бачити «поля» тромбоцитів.

Цитоморфологічні ознаки мегакаріобластів можуть бути досить різноманітними: від невеликого розміру клітин типу бластів, що не диференціюються, або клітин, що нагадують лімфобластів, до великих клітин з великим обідком цитоплазми.

Цитохімічні ознаки клітин при ГМЛ М7 залежать від ступеня зрілості клітин: найменш диференційовані клітини можуть бути цитохімічно інертними, або може визначатися тільки активність КФ у вигляді дрібних гранул на фоні дифузно забарвленої цитоплазми. У більш зрілих клітинах визначається активність кНЕ і дифузно-гранулярна PAS-реакція.

Визначальними для виділення ГМЛ М7 були результати імуноцитохімічних досліджень. Ознакою мегакаріоцитарної спрямованості диференціювання вважається експресія антигенів CD61, CD41, CD42, проте їхнє виявлення залежить від того, на якій стадії відбувся блок диференціювання клітин [7, 8].

Таким чином, за результатами морфоцитологічного, цитохімічного та імунофенотипічного дослідження патологічних клітин діагноз ГМЛ був встановлений у 171 хворого. Розподіл варіантів ГМЛ серед хворих подаий в табл. 1.

2. ГОСТРІ ЛІМФОБЛАСТНІ ЛЕЙКЕМІЇ

Гострі лімфобластні лейкемії відносяться до захворювань, при лікуванні яких (особливо у дітей) отримані значні успіхи — загальна 5-річна виживаність досягає 80—86 %, а безрецидивна 5-річна виживаність — 76—83 %.

Відповідно до найбільш поширеної ФАБ-класифікації виділяють три морфоцитохімічних варіанти ГЛЛ: *L1*, *L2*, *L3*. Прогностичне значення мають варіанти *L2* і *L3*, оскільки більшість випадків ГЛЛ з несприятливими генетичними аномаліями (наприклад, ГЛЛ з Ph'-хромосомою або аномалією 11q23) відносяться до морфологічному варіанту L2. При L3-ФАБ-варіанті ГЛЛ патологічні клітини мають чіткі морфологічні ознаки: середнього розміру кліТаблиця 1

Розподіл варіантів ГМЛ за ФАБ-класифікацією

Підваріанти ГМЛ	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Загальна кількість хворих
Кількість хворих	2	8	12	13	57	68	10	1	171

тини з базофільною вакуолізованою цитоплазмою (рис. 7, див. кольорову вклейку) [9].

При ГЛЛ морфологічні особливості патологічних клітин не відображають їхнє Т- чи В-клітинного походження, що є визначальним для класифікації варіантів ГЛЛ.

Цитохімічні ознаки бластних клітин при ГЛЛ такі ж, як і в популяції лімфоцитів у цілому. Негативні результати спостерігаються при проведенні реакцій на МПО, ліпіди, хлорацетатестеразу. При оцінці PAS-реакції кінцеві продукти виявляються у вигляді дрібних або великих гранул. У більшості випадків Т-лінійних ГЛЛ в 100 % клітин виявляється активність КФ у вигляді однієї або декількох великих гранул в одній ділянці цитоплазми. Поява вираженої активності кНЕ в про-В-лімфобластах (ВІ імунологічний підваріант ГЛЛ) у поєднанні з експресією антигену CD15 разом з іншими В-лінійними маркерами є прямою вказівкою на наявність хромосомної транслокації t(4;11)(q21;q23).

Імунофенотипування бластних клітин є основним, найважливішим методом діагностики ГЛЛ. На кожній із стадій диференціювання клітини визначається безліч антигенів, але лише деякі з них відрізняються строгою лінійністю і являються стадіє-специфічними. Тому особливу увагу при проведенні імунофенотипування слід приділяти складанню діагностичних панелей мкАТ, які мають бути раціонально достатніми і в той же час в максимально повному об'ємі відображати антигенний спектр конкретної стадії диференціювання клітин [10].

Таблиця 2

Панель моноклональних антитіл для класифікації гострих лейкозів

Клітинне походження	Імуноцитохімічні маркери
Гемопоетичні клітини-попередники	CD34, CD45, TdT, HLA-DR
В-клітини	CD19, CD20, CD22, CD79a
Т-клітини	CD2, CD3, CD5, CD7
Мієлоїдні клітини	CD13, CD33, CD15, MPO, CD117
Мегакаріобластні клітини	CD41, CD61

Для субкласифікації різних форм гострої мієлоїдної і лімфоїдної лейкемії нами використовувалася розширена панель моноклональних антитіл (табл. 2).

Імунологічна класифікація Європейської групи з імунологічного вивчення лейкозу (EGIL) припускає використання стандартизованої панелі мкАТ, що дозволяє визначити походження бластних клітин більш ніж в 98 % випадків ГЛ [9, 10]. Імунофенотипування патологічних клітин при ГЛЛ в поєднанні з цитогенетичними і молекулярно-біологічними методами дослідження дозволяє ідентифікувати окремі біологічно, клінічно і прогностично значимі підгрупи.

Встановлено, що імунологічний варіант ГЛЛ з певною цитогенетичною аномалією може бути головною причиною відмінностей в клінічному перебігу захворювання, лікарської чутливості або резистентності, що пов'язано з мірою зрілості патологічних клітин і особливостями їх метаболізму.

Розподіл 93-х хворих з ГЛЛ за клітинним походженням патологічних субстратних клітин був таким: у 76-и випадках ми діагностували В-клітиний ГЛЛ, а в решті випадків — Т-клітинні форми ГЛЛ.

З урахуванням імунофенотипу патологічних клітин виділяють 4 варіанти В-клітинних ГЛЛ: *В-І ГЛЛ* (про-В); *В-ІІ* (common/загального або звичайного типу — З-ГЛЛ); *В-ІІІ ГЛЛ* (пре-В) і *В-IV ГЛЛ* (зрілий В). У кожному з варіантів В-ГЛЛ клітини патологічного клону експресують «обов'язковий» набір антигенів і можуть експресувати також інші антигени, що визначаються на клітинах відповідної стадії диференціювання [11].

При В-клітинних ГЛЛ, на відміну від Т-клітинних, чітко простежуються кореляції між результатами цитохімічного та імунофенотипового досліджень патологічних клітин та виявленням певних хромосомних аномалій [12].

У патологічних клітинах при лейкозі з найбільш ранніх клітин-попередників В-ряду (про-

B, BI), з L2-морфологією бластних клітин та аберантною експресією мієлоїдних антигенів виявляється характерна цитогенетична аномалія — *t*(v;11q23), що проявляється в реаранжировці гена мієло-лімфолейкозу (MLL), за участю різних генів-партнерів: *t*(4;11), *t*(11;19), *t*(5;11), *t*(9;11).

Оскільки відмічено чіткі особливості клінічного перебігу лейкозу за наявності хромосомної аномалії 11q23, то в новій класифікації ВООЗ він виділений в самостійний цитогенетичний підваріант. Клінічно цей підваріант B-I протікає важко, при ранньому рецидиві може діагностуватися або як про-В ГЛЛ, або як гостра монобластна лейкемія (М5а).

Приблизно в 25 % випадків у дорослих в бластних клітинах при ГЛЛ виявляється транслокація *t*(q34;q11), в результаті якої утворюється зливний ген BCR/ABL, або філадельфійська хромосома (Ph^+-ГЛЛ). При Ph^+-ГЛЛ бластні клітини найчастіше теж мають морфологію клітин L2 і в 90 % випадків — імуфенотип бластних клітин З-ГЛЛ з коекспресією мієлоїдних антигенів CD33 і CD13.

Імунологічний пре-В варіант ГЛЛ включає підгрупу хворих з транслокацією *t*(q23;p13); E2A/PBX1. Хворі з такою підгрупою, як і хворі з Ph^+-ГЛЛ, складають клінічну групу «дуже високого ризику» і мають поганий прогноз при стандартному режимі терапії.

Таким чином, визначення цитохімічних, імунофенотипових та молекулярно-генетичних особливостей патологічних клітин при варіантах В-ГЛЛ має важливе значення для призначення адекватної схеми терапії і прогнозу захворювання.

На відміну від В-ГЛЛ при Т-ГЛЛ відзначається слабка відповідність між імунофенотипом клітин і специфічними цитогенетичними аномаліями і спостерігається відсутність кореляції з ФАБ-типом клітин. Переважають випадки з морфологічним L1-типом клітин та вираженою цитохімічною реакцією на КФ. Всі Т-ГЛЛ складають групу високого та дуже високого ризику.

Вивчення зв'язку імунофенотипу клітин з клінічним перебігом захворювання і прогнозом при Т-лінійних ГЛЛ у дітей і дорослих показав, що ранній фенотип — Т-I і Т-II (про-Т і пре-Т ГЛЛ) — вірогідніший у дорослих і, хоча у них нижчий рівень лейкоцитів в циркулюючій крові, прогноз гірший, ніж у дітей навіть при варіантах із більш зрілих клітин. Імунофенотипові характеристики клітин при Т-I ГЛЛ відповідають раннім кістковомозковим клітинам-попередникам Т-ряду: TdT, CD7, cyCD3. На клітинах при Т-II ГЛЛ додатково визначаються один-два Т-клітинних маркера: CD2, CD5 або CD8.

Таким чином, методи діагностики лейкозів, що застосовуються у повсякденній практиці, включають використання цитоморфологічних, цитохімічних методів і імунофенотипування патологічних клітин. На підставі результатів, що дають ці методи, діагноз встановлюється у більшості пацієнтів. Однак останнім часом все більшого значення набувають методи молекулярно-генетичного аналізу, підтвердженням чого слугує включення ряду генетичних маркерів до останньої ревізії діагностичних критеріїв ВООЗ [2].

Одним із перших цитогенетично визначених маркерів при діагностиці лейкозів є філадельфійська (Ph′) хромосома — результат реципрокної транслокації між 22-ою і 9-ою хромосомами — **t(9;22)(q34;q11)**. На молекулярному рівні транслокація призводить до утворення гібридного ***bcr/abl***. Ph′-хромосому виявляють в 95 % випадків хронічного мієлолейкозу (ХМЛ) та у 30 % хворих на ГЛЛ дорослих [13].

Транслокацію **t(4;11)(q21;q23)** виявляють в 50—70 % ГЛЛ у немовлят, у 5 % ГЛЛ у дорослих (з імунологічним підваріантом про-В ГЛЛ), а також у пацієнтів з М4- і М5-варіантами ГМЛ. На молекулярному рівні дана транслокація призводить до утворення злитого гена ***mll/af4***.

Транслокація **t(9;11)(p22;q23)** характерна переважно для хворих з ГМЛ М5 (особливо М5а) чи М4 і виникає як *de novo*, так і внаслідок терапії препаратами проти топоізомерази II. Загалом частота даної перебудови складає 2—

5 % випадків ГМЛ (до 25 % *de novo* М5а у дітей) [14]. На молекулярному рівні дана транслокація призводить до утворення злитого ***mll/af9***.

Інверсія **inv(16)(p13q22)** (або **t(16;16)(p13; q22))** характерна переважно для випадків ГМЛ М4. Також описані випадки виявлення даної перебудови у хворих на стадії бластної кризи ХМЛ. Ця інверсія призводить до утворення химерного гена ***cbfb/myh11*** [15].

Найбільш простим і чутливим методом для виявлення описаних вище хромосомних транслокацій є метод зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ—ПЛР). Метод базується на виділенні РНК з клітин хворого, отриманні її ДНК копії (кДНК): для цього проводиться реакція зворотної транскрипції; потім виконується ПЛР із наборами специфічних праймерів для виявлення траснкриптів злитних генів. Електрофоретична детекція транскриптів злитних генів ***bcr/abl***, ***mll/af4***, ***mll/af9*** є свідченням наявності певних хромосомних перебудов у клітинах патологічного клону.

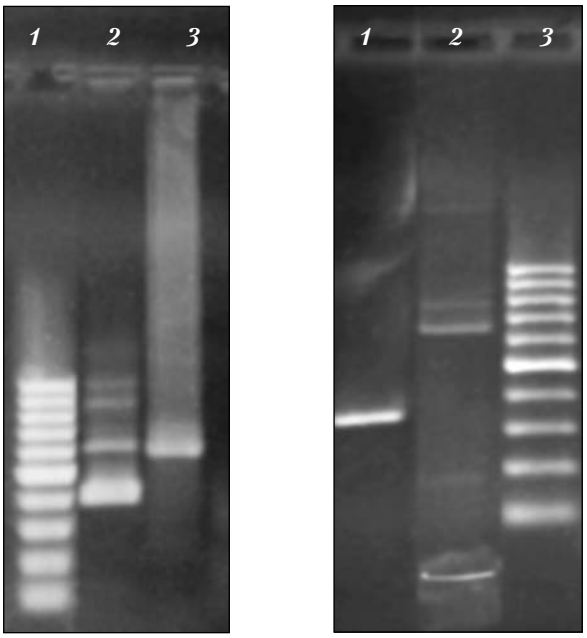

Рис. 8. Електрофореграма ампліфікатів після 2-го етапу ЗТ-ПЛР: *1* — маркер молекулярної маси GeneRuler 100bp DNA Ladder; *2* — транслокація BCR-ABL p190; *3* — транслокація BCR-ABL p210 b3/a2. *Результат аналізу*: виявлено перебудови BCR/ABL p190 і p210

Рис. 9. Електрофореграма ампліфікатів після 2-го етапу ЗТ-ПЛР: *1* — транслокація BCR-ABL p190; *2* — транслокація t(4;11)(q21;q23) MLL/AF4; *3* — маркер молекулярної маси GeneRuler 100bp DNA Ladder. *Результат аналізу*: виявлено перебудови BCR/ABL p190 і MLL/AF4

ПРИКЛАДИ ЗАСТОСУВАННЯ КОМПЛЕКСУ ІМУНОЦИТОХІМІЧНИХ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ (ЗТ-ПЛР) ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКЕМІЙ

Приклад 1. Хворий Т-ко. Реєстраційний № 60904.

Цитоморфологія: У периферичній крові (п/к) та кістковому мозку (к/м) домінують бластні клітини *L*1 морфологічного ФАБ-типу.

Цитохімія: Пероксидаза (МПО) негативна в бластах або слабка в поодиноких бластах; КФ — негативна; кНЕ — дрібногранулярна; PAS-реакція слабка дрібногранулярна по обідку цитоплазми.

Імунофенотипування бластів в п/к та к/м: CD7 — в поодиноких клітинах, CD19 — 70 % бластів, CD10 — 30 % бластів, CD34 — в поодиноких клітинах, CD117 — негативні, CD13 — 25 % бластів.

Результат ЗТ-ПЛР: виявлено перебудови BCR/ABL, p190 і p210. (рис. 8).

Заключення: ХМЛ в стадії бластного кризу. Фенотип бластів відповідає *B*-лінійному ГЛЛ «загального» типу, з коекспресією мієлоїдного антигену CD13.

Приклад 2. Хворий Ф-ук. Реєстраційний № 60865.

Цитоморфологія: в п/к анемія, тромбоцитопенія, лейкоцитоз (51×10^9/л), бластемія 82 %, бласти з ознаками клітин *L*1 ФАБ-типу. В к/м мономорфна популяція лімфоїдних клітин типу *L*1.

Цитохімія: МПО — негативна; КФ і кНЕ — слабка або дифузна реакції; PAS-реакція в частині бластів гранулярна.

Імунофенотипування бластів в п/к та к/м: CD7 — в поодиноких клітинах, CD19 — 80 %

Таблиця 3

Впровадження комплексу сучасних технологій діагностики ГЛ в закладах Міністерства охорони здоров'я України

Медичний заклад	Кількість хворих
Київська міська клінічна лікарня № 9 (гематологічні відділення №1 і № 2)	374
Київський обласний онкологічний диспансер	68
ДУ «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В.К. Гусака» НАМН України (доросле відділення, дитяче відділення)	61 45 16
Житомирська обласна клінічна лікарня ім. О.Ф. Гербачевського	45
Черкаський обласний онкологічний диспансер	43
Чернігівський обласний онкологічний диспансер	31
Хмельницька обласна лікарня	25
Кримська республіканська установа «Онкологічний клінічний диспансер»	26
Міська клінічна багатопрофільна лікарня № 25 м. Харкова	20
Миколаївська обласна лікарня	17
Комунальна установа «Одеська обласна клінічна лікарня»	15
Севастопольська міська лікарня №1 ім. М.І. Пирогова	13
Кіровоградська обласна лікарня	11
Полтавська обласна клінічна лікарня ім. М.В. Скліфосовського	6
Разом	**755**

бластів, CD10 – негативні, CD34 – 50 %, CD117 – негативні, CD13 – негативні.

Результат ЗТ-ПЛР: виявлено перебудови BCR/ABL і MLL/AF4 (рис. 9)**.**

Заключення: ГЛЛ L1, не Т-клітинний з В-клітин-попередників (варіант про-В ГЛЛ).

Дані про впровадження в клінічну практику комплексу сучасних технологій діагностики гострих лейкемій наведені в табл. 3.

ВИСНОВКИ

Сучасна діагностика гострих лейкемій має базуватися на результатах морфоцитологічного, цитохімічного, імунофенотипового та (за необхідності) молекулярно-генетичного досліджень патологічних субстратних клітин. Метод ЗТ-ПЛР – це сучасний та ефективний метод виявлення хромосомних перебудов в клітинах патологічного клону при ГЛ, що має важливе клініко-прогностичне значення.

Свідченням наявності певних хромосомних транслокацій в клітинах патологічного клону при ГЛ є виявлення транскриптів злитних генів ***bcr/abl***, ***mll/af4***, ***mll/af9*** за допомогою набору підібраних специфічних олігонуклеотидних праймерів і електрофорезу продуктів ЗТ-ПЛР в поліакріламідному гелі.

На закінчення слід зазначити, що застосування комплексного цитоморфологічного, цитохімічного, імунофенотипового та молекулярно-генетичного методів дослідження патологічних клітин є необхідними для первинної та важливими для диференційної діагностики лейкемій різного ґенезу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al.* French-American-British (FAB) Cooperative Group: proposals for the classification of the acute leukemias // Br. J. Haematol. – 1976. – V. 33. – 451 p.
2. *Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues // Lyon: IARC Press. – 2008. – 439 p.
3. *Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman Y.W.* Pathology and genetics of haematopoietic and lymphoid tissues // Lyon: IARC Press. – 2001. – 351 p.
4. *Löffler H., Rastetter J.* Atlas of clinical hematology // 6th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. – 2005. – 429 p.
5. *Bain B.J., Matutes E.* Myeloid malignancies: an atlas of investigation and diagnosis. – London: Clinical Publishing, 2010. – 144 p.
6. *Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.-T. et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia // Ann. Intern. Med. –1985. – V. 103. – 626 p.
7. *Bain B.J.* Leukemia diagnosis // 4th ed. London: Wiley-Blackwell. – 2010. – 377 p.
8. *Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А.* Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики). – К.: Изд. ДИА, 2008. – 196 с.

9. *Глузман Д.Ф., Надгорная В.А., Скляренко Л.М и др.* Новая классификация опухолей лимфоидной ткани (ВОЗ, 2008) // Серія «Семінари з гематопатології». — Вип. 20. — К.: Изд. ДИА, 2009. — 36 с.
10. *Gluzman D.F., Sklyarenko L.M., Nadgornaya V.A. et al.* Immunocytochemical markers in acute leukaemias diagnosis // Experim. Oncol. — 2010. — V. 32, № 3. — P. 195—199.
11. *Діагностична* онкогематологія // Під ред. Д.Ф. Глузмана. — К.: Вид. ДІА, 2011. — 256 с.
12. *Bueno C., Montes R., Catalina P. et al.* Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement // Leukemia. — 2011. — V. 25, N. 3. — P. 400—410.
13. *Telegeev G.D., Dubrovska A.N., Nadgornaya V.A., Gluzman D.F.* Immunocytochemical study of BCR and BCR-ABL localization in K-562 cells // Experim. Oncol. — 2010. — V. 32, № 2. — P. 81—83.
14. *Langer T., Metzler M., Reinhardt D. et al.* Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides // Genes Chromosomes Cancer. — 2003. — V. 36, N. 4. — P. 393—401.
15. *Dawson A.J., Bal S., McTavish B. et al.* Inversion and deletion of 16q22 defined by array CGH, FISH, and RT-PCR in a patient with AML // Cancer Genet. — 2011. — V. 204, N. 6. — P. 344—347.

Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко,
В.А. Надгорная, М.П. Завелевич, Л.Ю. Полудненко,
Т.С. Ивановская, Н.И. Украинская, Г.Д. Телегеев,
М.В. Дыбков, Л.А. Полищук

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ КОМПЛЕКСА ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛЕЙКЕМИЙ

Разработан и внедрен в клиническую практику коплекс современных технологий диагностики острых лейкемий согласно новой классификации ВОЗ. Определены основные формы и цитологические варианты гемобластозов у 755 больных Украины, среди которых у трети пациентов установлен диагноз острого лейкоза (ОЛ). Осуществлена разработка дизайна нуклеотидной последовательности праймеров для выявления транскриптов химерных генов bcr/abl (t(9;22)(q34;q11)); mll/af4 (t(4;11)(q21;q23)); mll/af9 (t(9;11)(p22;q23)) с целью проведения обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Метод ОТ-ПЦР использован для дифференциальной диагностики у больных с ОЛ.

Ключевые слова: острые лейкемии, цитоморфологическая диагностика, цитохимия, иммунофенотипирование, обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция.

D.F. Gluzman, L.M. Sklyarenko,
V.A. Nadgornaya, M.P. Zavelevich, L.Yu. Poludnenko,
T.S. Ivanovskaya, N.I. Ukrainskaya, G.D. Telegeev,
M.V. Dybkov, L.A. Polischuk

DEVELOPMENT OF COMPLEX OF IMMUNOCYTOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC TECHNOLOGIES OF ACUTE LEUKEMIAS DIAGNOSTICS AND THEIR IMPLEMENTATION INTO CLINICAL PRACTICE

The state-of-the-art technologies of diagnosing acute leukemias based on the novel WHO classification have been developed. The major forms and cytological variants of hematoblastoses have been diagnosed precisely in 755 patients in Ukraine with one third of them suffering from acute leukemias (AL). The primers for detecting the transcripts of chimerical genes bcr/abl (t(9;22)(q34;q11)); mll/af4 (t(4;11) (q21;q23)); mll/af9 (t(9;11)(p22;q23)) in reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) have been designed. RT-PCR has been used for differential diagnostics in AL patients.

Key words: acute leukemias, cytomorphological diagnostics, immunophenotyping, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Стаття надійшла до редакції 18.04.12