

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»

УДК 615.155.392.2-036.11-097-07/085.28-053.2

МОВЧАН  
ЛЮДМИЛА ВИКТОРОВНА

**ЛЕЙКОЗ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ИММУНОФЕНОТИП ОПУХОЛЕВЫХ  
КЛЕТОК НА ЭТАПАХ ДИАГНОСТИКИ И ИНТЕНСИВНОЙ  
ХИМИОТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ  
ЛЕЙКОЗОМ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Минск, 2016

Работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный руководитель:

**Белевцев Михаил Владимирович**,  
к.б.н., доцент,  
зам. директора по научной работе  
ГУ «Республиканский научно-  
практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии»

Официальные оппоненты:

**Змачинский Владимир Арнольдович**  
д.м.н., профессор кафедры клинической  
гематологии и трансфузиологии  
ГУО «Белорусская медицинская академия  
последипломного образования»

**Пасюков Вадим Владимирович**  
к.б.н., и.о. зав. лабораторией механизмов  
клеточной лекарственной резистентности  
ГУ «Республиканский научно-  
практический центр трансфузиологии и  
медицинских биотехнологий»

Оппонирующая организация:

**УЗ «9-клиническая больница» г. Минска**

Защита состоится «13» апреля 2016 г. в 13.00 на заседании Совета по защите диссертации Д.03.11.01 при ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» по адресу: 220053, г. Минск, Долгиновский тракт, 160. Телефон ученого секретаря (017) 289-86-20, e-mail: [4kosmacheva@mail.ru](mailto:4kosmacheva@mail.ru)

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Автореферат разослан «10» марта 2016 г.

Ученый секретарь Совета  
по защите диссертаций, к.м.н., доцент

С.М. Космачева

## ВВЕДЕНИЕ

Первое место среди онкологических заболеваний у детей занимают острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ), из которых на долю острых лейкозов из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ) приходится около 80 – 85%. Благодаря использованию современных протоколов лечения, выживаемость пациентов составляет более 80% [Zborovskaya A.A., 2013]. Однако при этом ведущей проблемой, влияющей на бессобытийную выживаемость пациентов при ОЛЛ, являются рецидивы заболевания, в основе развития которых лежит нерадикальная элиминация опухолевого клона [Савва, Н. Н., 2009].

В течение длительного времени «морфологический» ответ на терапию (количество бластных клеток в костном мозге по данным морфологического исследования) являлся мощным прогностическим фактором, влияющим на развитие рецидива ОЛЛ. Однако в настоящее время показано, что достижение цитоморфологической ремиссии (менее 5% бластных клеток в костном мозге) на этапах терапии не является абсолютным критерием прогноза в отношении рецидива заболевания и, не смотря на хороший «микроскопический» ответ на проведенную индукционную терапию, остается группа пациентов, у которых развивается ранний или поздний рецидив. Это связано с тем, что пациенты с ОЛЛ, находясь в гематологической ремиссии после терапии, могут сохранять в костном мозге (КМ) до  $10^{10}$  опухолевых клеток, наличие которых возможно определить только с применением высокочувствительных методов исследования и в таком случае используется термин «минимальная остаточная болезнь» (МОБ) или «минимальная резидуальная болезнь» (МРБ).

Мониторинг минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах с использованием техники многопараметрической проточной цитофлуориметрии является перспективным и имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, таких как относительно невысокая стоимость, короткое время, требуемое для проведения исследования (1-2 дня), а также применимость у большинства пациентов (90-95%) [Campana, D., 2002, 2010, M. Bruggemann 2010, Szczepanski, T., 2007]. Данный способ основан на выявлении лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа (ЛАИФ) опухолевых клеток на момент постановки диагноза и идентификации его в ходе терапии среди нормальных гемопоэтических клеток костного мозга [M. J. Borowitz, 2008, R. W. McKenna, 2001, M. N. Dworzak, 2002]. Таким образом, для возможности мониторинга минимальной остаточной болезни методом многопараметрической проточной цитофлуориметрии необходимым является выбор оптимальной комбинации моноклональных антител (МКА), основанный на четком знании об экспрессии линейно-дифференцировочных антигенов на нормальных этапах лимфопоэза В-клеток и иммунофенотипических особенностях лейкозных клеток, позволяющих отличить их от нормальных костномозговых аналогов [R. W. McKenna, 2004]. Частота встречаемости тех или иных иммунофенотипических aberrаций, изменения иммунофенотипа опухолевых клеток в ходе терапии, описанные в работах разных авторов различны, также отличаются и панели моноклональных антител, используемые для мониторинга минимальной остаточной болезни. На данный момент нет единого, стандартизированного подхода для данного исследования как в отношении выбора комбинаций

моноклональных антител, так и в отношении интерпретации полученных данных (Borowitz M. et al 2008; Dworzak M. et al 2008; Irwing J. et al 2009; Campana D. 2010).

На сегодняшний день установлено, что наличие МОБ на момент окончания индукционной терапии, является самым сильным и независимым прогностически неблагоприятным фактором для безрецидивной выживаемости пациентов с ОЛЛ [Н. Н. Савва 2009, М. J. Borowitz, 2008, М. N. Dworzak, 2002]. Показано, что оценка минимальной остаточной болезни, является крайне необходимой не только для прогноза рецидива, но и для дополнительной стратификации пациентов на группы риска с целью решения вопроса об индивидуализации терапии путем ее усиления (интенсификации) для элиминации остаточного опухолевого клона и предотвращения развития рецидива или ослабления для снижения побочных эффектов [Т. Flohr, 2008, С. Н. Pui, 2009, 2003]. Значение МОБ также начинает применяться как способ сравнения эффективности химиотерапевтических режимов и отдельных препаратов, поскольку чувствительность к лекарству *in vivo* и *in vitro* может не совпадать [С. S. Kwok, 2006].

Показано, что наличие МОБ на момент окончания индукционной терапии связано с показателями, характеризующими ранний ответ на терапию, такими как количество опухолевых клеток в периферической крови на 8-й и костном мозге на 15-й дни терапии [R. Ratei, 2009]. В то же время, существует ряд других, инициальных, прогностических факторов, таких как возраст, пол, содержание лейкоцитов в периферической крови, размер селезенки, поражение центральной нервной системы, а также особенности иммунофенотипа опухолевых клеток, связь которых с наличием МОБ остается неизученной. Кроме того, влияние разных показателей на результаты терапии может варьировать в рамках разных протоколов лечения. Также актуальной проблемой в онкологии является выявление и характеристика лейкозных стволовых клеток, которые иницируют и поддерживают рост опухоли, а также способствуют прогрессии заболевания [Т. Lapidot, 1994, Y. Kong, 2008, С. V. Cox, 2009, M. Ebinger, 2010, N. O. Basta, 2011].

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Связь работы с научными программами и темами.** Работа по теме диссертации проведена в рамках следующих НИР: «Разработать и внедрить многопараметрический иммунофенотипический анализ (технологии диагностики) опухолевых клеток для диагностики и мониторинга острых лейкозов и лимфом у детей» (2007-2010гг.), выполняемой по заданию программы совместной деятельности по преодолению последствий Чернобыльской катастрофы в рамках союзного государства;

«Разработать и внедрить методы определения клинического и прогностического значения выявления остаточных опухолевых клеток на ранних и поздних этапах терапии острых лейкозов» (2006-2008 гг., номер госрегистрации 20062969 от 16.11.2006); «Исследование иммунофенотипических и генетических особенностей остаточных опухолевых клеток при воздействии химиопрепаратов *in vivo* и *in vitro*» (2009-2010 гг., номер госрегистрации 20093112 от 17.11.2009), выполняемых по заданию ГКПНИ «Современные технологии в медицине».

**Цель работы** - оценить особенности лейкоз-ассоциированного фенотипа лейкозных клеток на этапах диагностики и интенсивной химиотерапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей для определения остаточных опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии.

**Задачи исследования:**

1. Определить особенности лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов и разработать диагностическую панель для мониторинга минимальной остаточной болезни.

2. Оценить изменения экспрессии иммунофенотипических маркеров лейкозных клеток на ранних этапах терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей.

3. Оценить динамику элиминации опухолевых клеток на ранних этапах противоопухолевой терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей в зависимости от иммунофенотипических особенностей лейкозных клеток, исходных клинических факторов и линии рандомизации терапии по протоколу ОЛЛ-МБ-2008.

4. Определить количество клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ в качестве потенциальных лейкозных стволовых клеток, а также оценить взаимосвязь между их содержанием и показателями минимальной остаточной болезни на ранних этапах терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей.

**Объект исследования** - опухолевые клетки пациентов с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов.

**Научная новизна:**

1. На основании проведенной оценки иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток при ВП ОЛЛ у детей по сравнению с их нормальными костномозговыми аналогами разработана и запатентована оригинальная панель дифференциально-диагностических маркеров для мониторинга МОБ.

2. Выявлены особенности изменения экспрессии иммунофенотипических маркеров под действием химиопрепаратов на ранних этапах противоопухолевой терапии протокола ОЛЛ-МБ-2008 *in vivo* и в эксперименте *in vitro*. Определена взаимосвязь особенностей иммунофенотипа опухолевых клеток, исходных клинических факторов, используемых для стратификации пациентов на стандартную и промежуточную группы риска в рамках протокола ОЛЛ-МБ-2008 на элиминацию опухолевых клеток при ВП ОЛЛ у детей.

3. Установлено, что использование Пегилированной L-аспарагиназы в ходе индукции ремиссии по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 способствует эффективной элиминации остаточных опухолевых клеток.

4. Установлена взаимосвязь количества клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ в качестве потенциальных лейкозных стволовых клеток с уровнем МОБ на этапе индукции ремиссии ВП ОЛЛ у детей.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Аберрантная экспрессия на опухолевых клетках у детей с ВП ОЛЛ таких антигенов как CD45, CD10, CD20, CD34, CD38, CD58, и CD11a, позволяет использовать их для мониторинга минимальной остаточной болезни.

2. На этапах индукционной терапии происходит изменение экспрессии дифференциально-диагностических иммунофенотипических маркеров опухолевых клеток под действием проводимой химиотерапии.

3. Иммунофенотипические особенности лейкозных клеток и клинические факторы, такие как возраст, пол, поражение ЦНС, спленомегалия не влияют на уровень минимальной остаточной болезни. Лучший ответ на терапию, выраженный отсутствием МОБ, характерен для пациентов с инициальным количеством лейкоцитов в периферической крови  $<30\ 000$  кл/мкл.

Использование Пегилированной L-аспарагиназы в ходе индукции ремиссии по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 способствует более эффективной элиминации остаточных опухолевых клеток.

4. Повышенное инициальное содержание клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ среди общей популяции лейкозных клеток ассоциируется с наличием минимальной остаточной болезни на этапах индукционной терапии. Количество клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ на 15-й и 36-й дни терапии коррелирует с количеством остаточных опухолевых клеток.

**Личный вклад соискателя.** Постановка цели и задач исследования, формирование группы пациентов, разработка панели маркеров для детекции минимальной остаточной болезни проводилась совместно с к.б.н., доцентом Белевцевым М.В. Оценка иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток, интенсивности экспрессии маркеров, а так же их модификация в ходе химиотерапии, оценка количества клеток с иммунофенотипом предполагаемых лейкозных стволовых клеток, мониторинг минимальной остаточной болезни на этапах индукционной терапии, статистическая обработка и анализ полученных результатов выполнены автором самостоятельно. Культивированные с глюкокортикоидном опухолевые клетки предоставлены заведующей лабораторией иммунологических исследований научного отдела к.б.н. Шман Т.В. Алгоритм анализа и обработка результатов, полученных при оценке количества клеток с иммунофенотипом предполагаемых лейкозных стволовых клеток проводилась также совместно с к.б.н. Шман Т.В. Данные по клиническим показателям пациентов взяты из базы данных по острым лимфобластным лейкозам Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

**Апробация результатов диссертации.** Результаты исследований, включенные в диссертацию, докладывались на VI симпозиуме «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» - устный доклад (г. Москва, Россия, 29-31 января 2009г.); на X юбилейной научной конференции молодых ученых с участием международных специалистов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической онкологии» - устный доклад (г. Киев, Украина, 22-24 апреля 2010г.); на Республиканской научно-практической конференции «Применение методов проточной цитометрии в медицинских и научных исследованиях» - устный доклад (г. Минск, Беларусь, 8 апреля 2011г.); на международной научно-практической конференции «25 лет после Чернобыльской катастрофы. Преодоление ее последствий в рамках

Союзного государства» - устный доклад (г. Гомель, Беларусь, 12-13 апреля 2011г.); на международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии» - устный доклад (г. Гомель, Беларусь, 15-16 сентября 2011г.); международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» - устный доклад (г. Минск, Беларусь, 15-16 ноября 2012г.);

**Опубликованность результатов.** По теме диссертационного исследования опубликовано 15 печатных работ (статьи в научных журналах - 5, статьи в рецензируемых сборниках научных материалах - 8, тезисы докладов в материалах научных конференций и съездов научных обществ – 2). Общий объем опубликованного материала -3,2 авторских листа.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав собственных данных, заключения, библиографического списка и приложения. Диссертационная работа изложена на 92 страницах машинописного текста, содержит 16 иллюстраций, 8 таблиц. Библиографический список включает 125 источников, в том числе 27 на русском и 98 на английском языках.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю к.б.н., доценту М.В. Белевцеву и сотрудникам Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии: к.б.н. Т.В. Шман, к.м.н., доценту Н.В. Мигаль, Д.Ф. Кудревичу, член-корр. НАНБ, д.м.н., профессору О.В. Алейниковой.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ**

### **Материалы и методы исследования**

**Пациенты и группы контроля, включенные в исследование.** В исследование включены 272 пациента (141 мальчик и 131 девочка) с первично установленным диагнозом ОЛЛ из предшественников В-лимфоцитов стандартной (SGR) и промежуточной (ImGR) групп риска, поступивших на лечение в Центр детской онкологии, гематологии и иммунологии в период с февраля 2004 по апрель 2012 года. Медиана возраста составила 4 года (от 1 года до 18 лет). В исследуемой группе в 4% (11/272) случаев был диагностирован Pro-B ОЛЛ, 83% (227/272) – Common-B ОЛЛ, 13% (34/286) - Pre-B ОЛЛ. Диагноз был установлен в соответствии с ВОЗ - классификацией и на основании оценки иммунофенотипической характеристики опухолевых клеток (EGIL-95) [92].

В качестве группы контроля были исследованы образцы КМ 14 здоровых доноров (доноры костного мозга для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток).

**Имунофенотипическое исследование лейкозных клеток** было проведено методом проточной цитофлуориметрии с использованием следующих панелей МКА:

- для анализа ЛАИФ опухолевых клеток использовали диагностическую иммунофенотипическую панель МКА, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, PE-Cy5 (таблица 1)

Таблица 1 Панель моноклональных антител для диагностического иммунофенотипирования острых лейкозов

FITC	PE	PE-Cy5
IgG1(mouse)	IgG2a(mouse)	CD45
CD45	CD14	-
CD4	CD8	CD45
CD3	HLA-DR	CD45
CD20	CD5	CD45
CD7	CD13	CD45
CD10	CD117	CD45
CD19	CD33	CD45
CD34	CD22	CD45
CD2	CD1a	CD45
CD15	CD11b	CD45
IgM	-	CD45
CD65	CD56	CD45
cyIgG1(mouse)	cyIgG2(mouse)	CD45
cyIgM	-	CD45
Tdt	cyCD79	CD45
cyMPO	-	CD45
cyCD3	-	CD45

Примечание

1. Все МКА фирмы Beckman Coulter

2. IgG1(mouse), IgG2a(mouse) – мышинные МКА, используемые в качестве изотипического контроля

3. cy – цитоплазматический (внутриклеточный) маркер

- для мониторинга МОБ при **Pro-B ОЛЛ** (CD10- ВП ОЛЛ) использовали следующую панель комбинаций МКА, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, PE-Cy5 и PE-Cy7:

1. CD20+CD10 FITC/CD34 PE/CD45 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

2. CD20+CD10 FITC/CD38 PE/CD45 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

3. CD65 FITC/CD34 PE/CD45 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7.

Данную комбинацию МКА использовали также для оценки МОБ при **Common-B ОЛЛ** и **Pre-B ОЛЛ** в случаях гетерогенной экспрессии маркера CD10 [заявка на выдачу патента № а2014 0124 от 19.02.2014].

- для мониторинга МОБ при **Common-B ОЛЛ** и **Pre-B ОЛЛ** (CD10+ ВП ОЛЛ) использовали следующую панель комбинаций МКА конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, ECD, PE-Cy5 и PE-Cy7 [Патент на изобретение № 18696]:

1. Syto16 FITC/CD20 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

2. Syto16 FITC/CD58 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

3. Syto16 FITC/CD34 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

4. Syto16 FITC/CD11a PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

5. Syto16 FITC/CD38 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7



- для оценки количества клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ использовали комбинацию МКА конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, ECD, PE-Cy5 и PE-Cy7:

1. Syto16 FITC/CD38 PE/CD45 ECD/CD34 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7.

Для оценки влияния химиопрепаратов на экспрессию иммунофенотипических маркеров использовали экспериментальную модель получения *in vitro* остаточных лейкозных клеток. Для этого выделенные из КМ до начала лечения ОК пациентов культивировали с дексаметазоном (1мкг/мл) в течение 72 часов, затем определяли интенсивность экспрессии исследуемых маркеров на оставшихся в живых лейкозных клетках с использованием панели МКА, определенной для оценки МОБ.

Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter) в программе СХР. Критерием позитивности при оценке ЛАИФ считали наличие экспрессии маркера на поверхности более чем 20% лейкозных клеток. Для цитоплазматических антигенов лимит позитивности снижен до 10%. Значение уровня МОБ, а также количество клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ выражали как процентное содержание ООК среди всех жизнеспособных, ядродержащих клеток. Положительным (МОБ+) считается результат при наличии лейкозных клеток в КМ в количестве  $\geq 0,01\%$ .

**Статистическая обработка данных.** Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программу Statistica 6.0.

Результаты представлены в процентных показателях с использованием приложения Basic Statistics, в виде значений медианы и диапазона данных (25 - 75 перцентили).

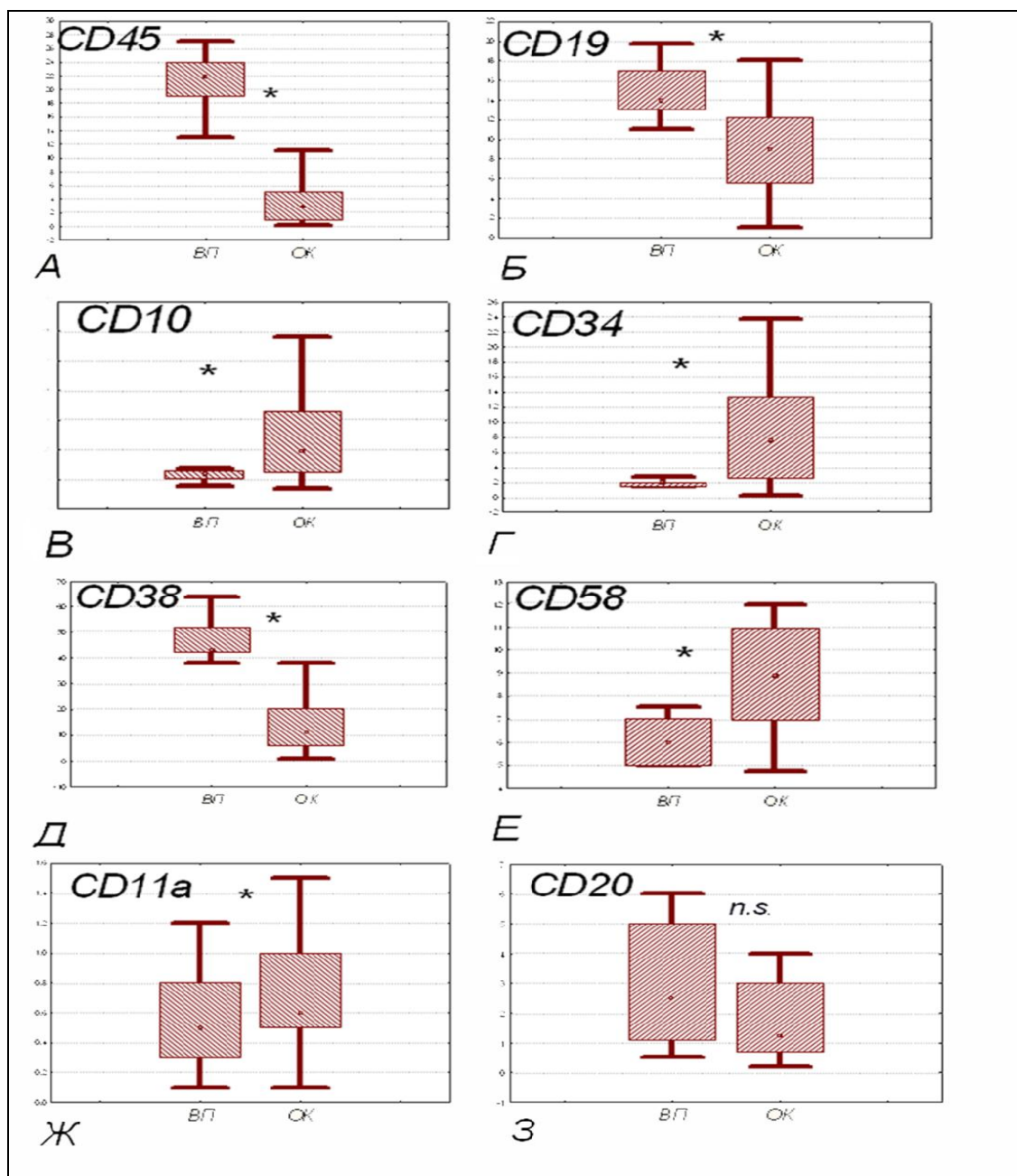
Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с использованием теста Манна-Уитни, а также непараметрического  $\chi^2$ - теста, между зависимыми группами - теста Вилкоксона. Корреляционные зависимости оценивали по тесту Спирмана. Результаты считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной работы выявлено, что лейкозные бласты при ВП ОЛЛ демонстрируют многочисленные иммунофенотипические aberrации по сравнению с их нормальными гемопоэтическими аналогами. В большинстве случаев для лейкозных клеток характерна атипичная экспрессия таких дифференцировочных антигенов как Tdt, CD10, CD20, CD45, CD34. На ОК часто наблюдается одномоментная экспрессия маркеров разных стадий дифференцировки: CD34+/CD20+, CD10++/CD20++, также встречается асинхронная экспрессия антигенов CD22++/CD20-. Для лейкозных клеток при ВП ОЛЛ характерным признаком является наличие коэкспрессии миелоидных маркеров, среди которых наиболее часто встречается CD13, реже CD33, CD15 и CD117. Коэкспрессия T – линейных маркеров на ОК встречается в редких случаях.

При сравнении интенсивности экспрессии значимых для диагностики ВП ОЛЛ и мониторинга МОБ антигенов CD45, CD19, CD10, CD20, CD34, CD11a, CD58, CD38 лейкозными

клетками и нормальными предшественниками В-лимфоцитов установлено, что различия в экспрессии характерны для всех исследуемых маркеров (рисунок 1).



ВП – нормальные предшественники В-лимфоцитов

ОК – опухолевые клетки ВП ОЛЛ

Ось Y – средняя интенсивность флуоресценции (усл.ед.).

\* -  $p < 0,05$ ; *n.s.* -  $p > 0,05$ . Пояснение в тексте

**Рисунок 1 - Сравнение уровней экспрессии иммунофенотипических маркеров опухолевыми клетками ВП ОЛЛ и нормальными предшественниками В-лимфоцитов**

На рисунке показано, что интенсивность флюоресценции на ОК таких маркеров, как CD45, CD19, CD38 статистически значимо ниже по сравнению с нормальными костномозговыми аналогами. Также сниженная экспрессия наблюдалась для CD20, однако данный факт не был статистически подтвержден. В противоположность, на лейкозных клетках была отмечена статистически значимо высокая степень экспрессии антигенов CD10, CD34, CD11a, CD58 при сравнении с нормальными предшественниками В-лимфоцитов. Таким образом, очевидно, что такие маркеры как CD45, CD19, CD10, CD20, CD34, CD11a, CD58, CD38 целесообразно включать в панель МКА для мониторинга МОБ.

Используя в качестве основы полученные в ходе работы результаты, а также опыт ведущих зарубежных исследовательских групп, нами были разработаны две адаптированные панели комбинаций МКА для мониторинга МРБ при Common-B и Pre-B ОЛЛ (CD10+ ВП ОЛЛ) [Патент на изобретение № 18696] и при Pro-B ОЛЛ (CD10- ВП ОЛЛ) [заявка на выдачу патента № а2014 0124 от 19.02.2014] (таблица 2, 3).

Таблица 2 - Панель МКА, конъюгированных с флуоресцентными метками для оценки МОБ при Common-B и Pre-B ОЛЛ (CD10+ ВП ОЛЛ)

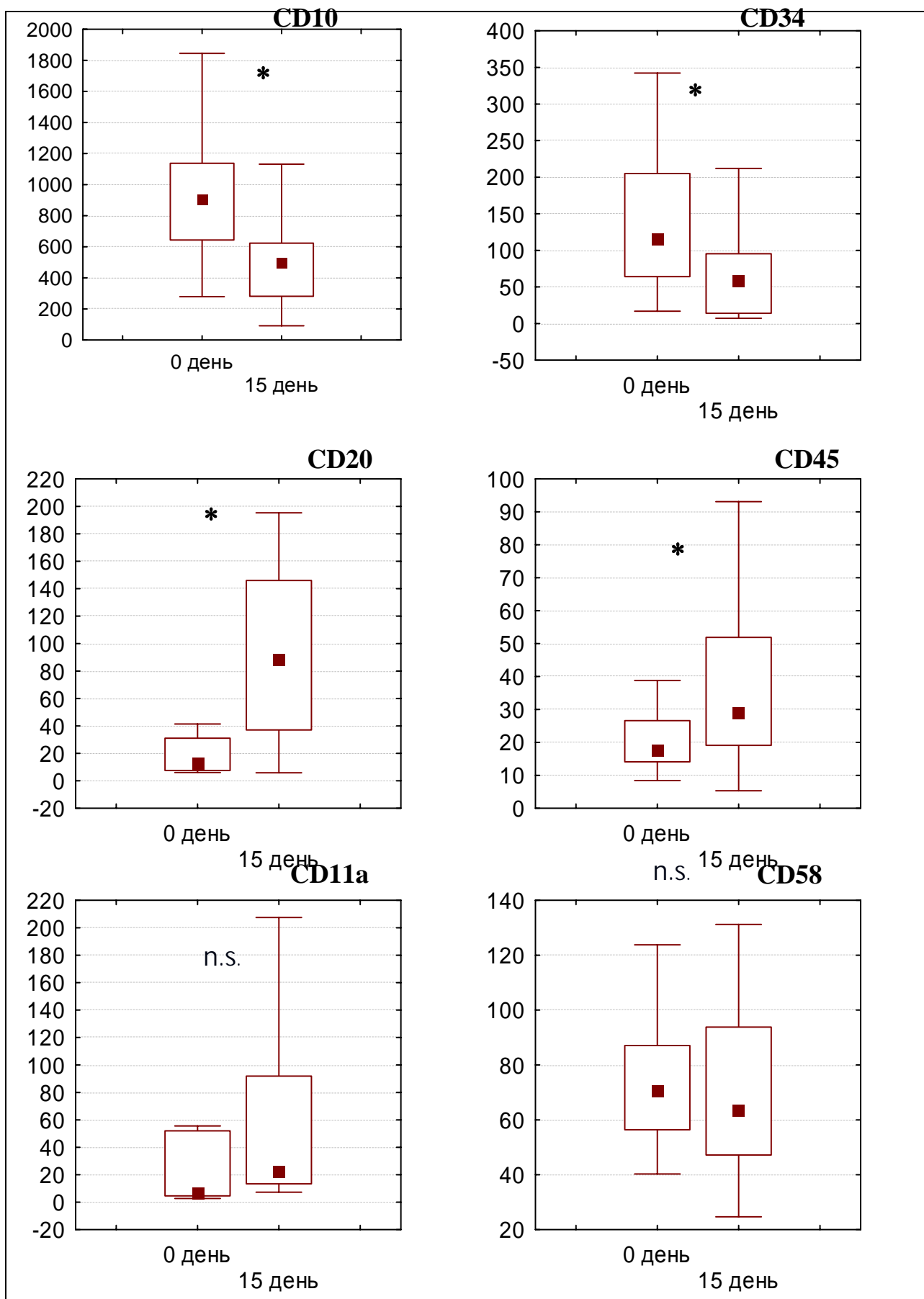
<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>ECD</b>	<b>PE-Cy5</b>	<b>PE-Cy7</b>
Syto16	CD20	CD45	CD10	CD19
Syto16	CD58	CD45	CD10	CD19
Syto16	CD34	CD45	CD10	CD19
Syto16	CD11a	CD45	CD10	CD19
Syto16	CD38	CD45	CD10	CD19

Таблица 3 - Панель МКА, конъюгированных флуоресцентными метками для оценки МОБ при Pro-B ОЛЛ (CD10- ВП ОЛЛ)

<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PE-Cy5</b>	<b>PE-Cy7</b>
CD20+ CD10	CD34	CD45	CD19
CD20+ CD10	CD38	CD45	CD19
CD65	CD34	CD45	CD19

Применение разработанных панелей многоцветной комбинации МКА позволяет с высокой специфичностью идентифицировать опухолевые клетки в образцах КМ пациентов с различными иммунофенотипическими вариантами ВП ОЛЛ у детей.

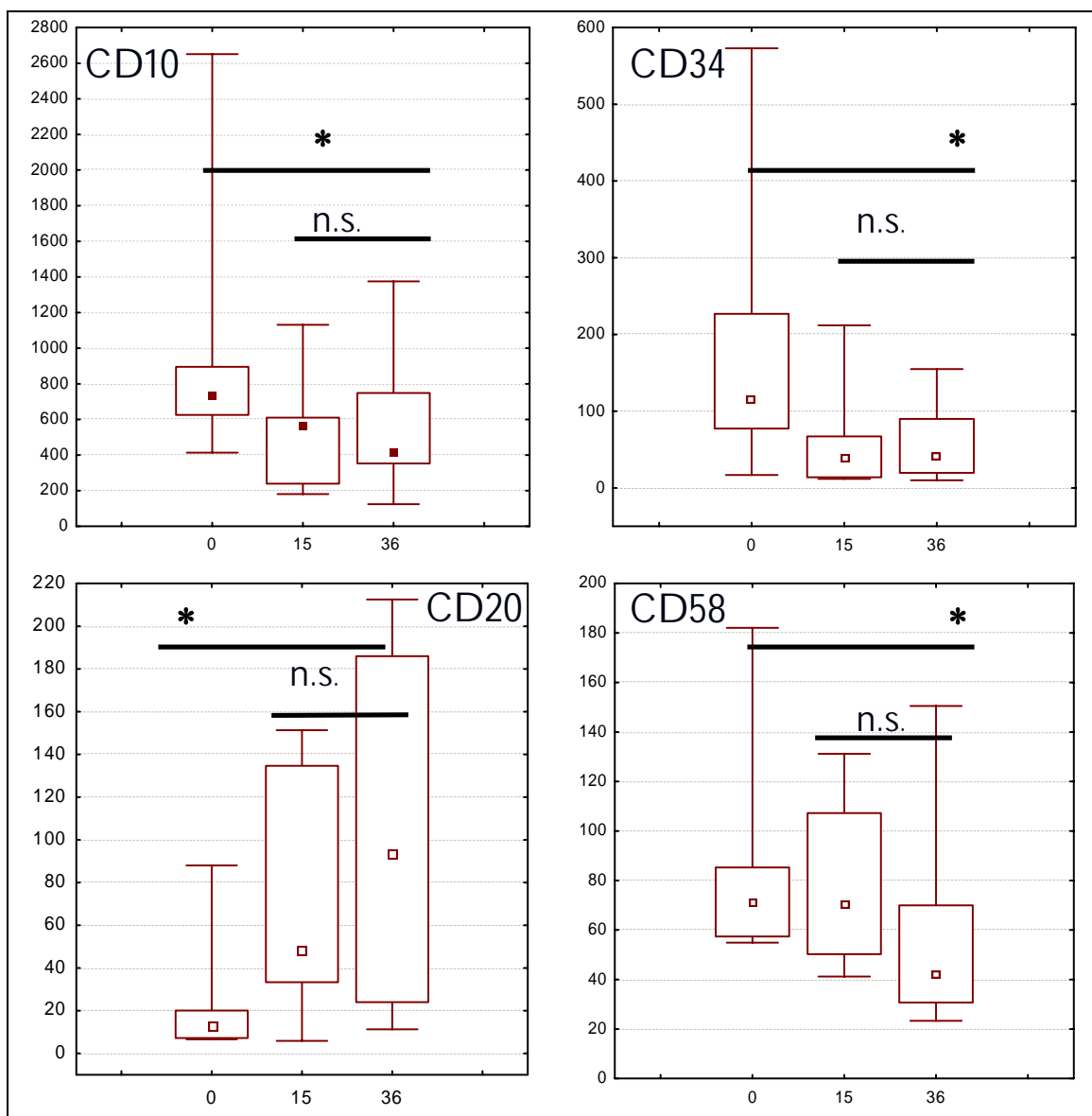
В ходе работы было установлено, что уже на начальных этапах химиотерапии ВП ОЛЛ у детей происходят существенные изменения в иммунофенотипе лейкозных клеток по сравнению с исходными показателями. Показано, что на 15-й день индукционной терапии на лейкозных клетках происходит статистически значимое снижение интенсивности экспрессии таких маркеров как CD10 и CD34. В противоположность, наблюдается значимое увеличение степени экспрессии антигенов CD20 и CD45. Стабильность экспрессии маркеров на данной точке исследования на опухолевых клетках характерна для CD58 и CD11a по сравнению с начальным уровнем экспрессии этих антигенов (рисунок 2).



Ось Y – средняя интенсивность флуоресценции (усл.ед.). \* -  $p < 0,05$ ; n.s. -  $p > 0,05$ .

**Рисунок 2 - Сравнение уровней экспрессии иммунофенотипических маркеров лейкозными клетками при ВП ОЛЛ на 0-й и 15-й день химиотерапии**

На 36-й день противоопухолевой терапии сохраняется тенденция к снижению экспрессии маркеров CD10 и CD34. Однонаправленная тенденция к увеличению степени экспрессии выявляется к моменту окончания индукции ремиссии для маркера CD20. К 36-му дню индукционной терапии происходит значимое снижение экспрессии маркера CD58 по сравнению с его показателями до терапии (рисунок 3).



Ось Y – средняя интенсивность флуоресценции (усл.ед.). \* -  $p < 0,05$ ; n.s. -  $p > 0,05$ .

**Рисунок 3 - Сравнение уровней экспрессии иммунофенотипических маркеров лейкозными клетками при ВП ОЛЛ на 0-й, 15-й и 36-й дни химиотерапии**

Различия в степени экспрессии маркера CD45 к моменту окончания индукции ремиссии уже не выявляются. Антиген CD11a продолжает сохранять свою стабильность и на данной точке исследования. В результате проведенного исследования влияния дексаметазона *in vitro* на степень экспрессии ОК маркеров, нами установлено, что воздействие дексаметазона *in vitro* приводит к снижению уровня экспрессии лейкозными клетками антигенов CD10 и CD34. Направления

изменений, наблюдаемые *in vitro*, совпадают с изменениями экспрессии маркеров, наблюдаемыми *in vivo* ( $p \leq 0,05$ ).

В результате мониторинга МОБ установлено, что положительный уровень остаточных опухолевых клеток наблюдается в 71,1% случаев на 15-й день от начала индукции ремиссии и в 35,2% случаев на 36-й день терапии ВП ОЛЛ у детей согласно протоколу ОЛЛ-МБ-2008. В работе выявлено, что такие признаки как субвариант ВП ОЛЛ, а также иммунофенотипические особенности опухолевых клеток (асинхронная экспрессия дифференцировочных маркеров, коэкспрессия маркеров «чужих» линий гемопоэза, наличие или отсутствие на поверхности бластов экспрессии маркеров CD45, CD34) полномерно не влияют на уровень МОБ ( $p > 0,05$ ).

В работе мы также провели оценку количества клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+, как потенциальных лейкозных стволовых клеток (ЛСК) среди опухолевых клеток в КМ пациентов с ВП ОЛЛ на момент постановки диагноза, а также оценили взаимосвязь между их содержанием и ранним ответом на терапию, выраженным значением уровня МОБ. Проанализировали содержание клеток с исследуемым фенотипом в КМ у пациентов на 15-й и 36-й дни противоопухолевой терапии с положительным значением МОБ. Выявлено, что повышенное инициальное содержание клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ как потенциальных ЛСК среди общей популяции лейкозных клеток достоверно ассоциируется с худшим ответом на терапию, характеризующимся наличием МОБ и на 15-й и на 36-й день (таблица 4).

Таблица 4 – Инициальное содержание незрелых лейкозных клеток в группах пациентов с различным уровнем МОБ на 15-й и 36-й дни индукционной терапии ВП ОЛЛ у детей

Субпопуляции незрелых лейкозных клеток	Уровень незрелых лейкозных клеток, медиана (25-75 перцентилей)				p
	n	МОБ + 15 день	n	МОБ – 15 день	
CD34+CD38- CD34+CD38-CD19+	30	5,4 (1,3-20,9) 5,1 (1,1-20,9)	12	0,7 (0,06-2,4) 0,3 (0,03-2,4)	0,002 0,002
	n	МОБ + 15 день	n	МОБ – 36 день	p
CD34+CD38- CD34+CD38-CD19+	16	6,9 (4,5-20,1) 6,9 (4,3-19,9)	26	0,8 (0,4-6,7) 0,8 (0,1-6,7)	0,03 0,02

Также установлено, что количество предполагаемых ЛСК на 15-й и 36-й дни индукционной терапии достоверно коррелирует с количеством остаточных опухолевых клеток (таблица 5).

Таблица 5 – Значение корреляции количества предполагаемых лейкозных стволовых клеток и уровня МОБ на 15-й и 36-й дни индукционной терапии

Субпопуляции незрелых лейкозных клеток	МОБ+ 15 день n=30		МОБ+ 36 день n=16	
	R	p	R	p
CD34+/CD38-	0,74	<0,001	0,59	0,02
CD34+CD38- CD19+	0,68	<0,001	0,53	0,04

В результате работы показано, что такие инициальные клинические факторы, на основании которых согласно протоколу ОЛЛ-МБ-2008 проводится стратификация пациентов на SGR и ImGR, как возраст, поражение центральной нервной системы, размер селезенки, не влияют на значение МОБ в ходе индукции ремиссии. Достоверно лучший ответ на терапию, выраженный отсутствием МОБ наблюдается на момент окончания индукционной терапии (36-й день) у пациентов с инициальным количеством лейкоцитов в периферической крови (ПК) <30 000 кл/мкл (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние исходных прогностических факторов риска на элиминацию ООК на 15-й и 36-й дни индукционной терапии ВП ОЛЛ у детей

Признак	15-й день терапии		36-й день терапии	
	МОБ+	МОБ-	МОБ+	МОБ-
Возраст, годы				
>1 и <10 (1-9)	82 (71%)	34 (29%)	38 (33%)	76(67%)
≥10	19 (73%)	7 (27%)	12 (43%)	16 (57%)
p	0,81		0,34	
Лейкоциты, кл/мкл				
<30000	82 (70%)	35 (30%)	37 (33%)	76 (67%)
≥30000 <100000	19 (83%)	4 (17%)	15 (56%)	12 (44%)
p	0,23		<b>0,03</b>	
Пораж ЦНС				
Да	2 (50%)	2 (50%)	1 (20%)	4 (80%)
Нет	99 (72%)	38 (28%)	49 (36%)	87 (64%)
p	0,33		0,79	
Спленомегалия				
<4	73 (70%)	31 (30%)	37 (37%)	64(63%)
≥4	27 (73%)	10 (27%)	13 (33%)	27 (67%)
p	0,75		0,64	

В работе также была проведена оценка влияния линии рандомизации противоопухолевой терапии ВП ОЛЛ по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 на элиминацию опухолевого клона. В соответствии с протоколом ОЛЛ-МБ-2008, в зависимости от применения Даунорубина (Daunorubicin (DNR)) и Пегилированной L – аспарагиназы (Peg-L-Asparaginase (PEG), ПЭГ-аспарагиназы), пациенты SGR получают индукционную терапию согласно одному из трех рукавов рандомизации: 1 PEG-;DNR+, 2 PEG+;DNR+, 3 PEG+;DNR-. Пациенты ImGR получают индукционную терапию согласно одному из двух рукавов рандомизации: 1 PEG-;DNR+, 2 PEG+;DNR+. Выявлено, что у детей SGR, рандомизированных по ветвям индукционной терапии в зависимости от применения ПЭГ-аспарагиназы, а именно PEG-;DNR+ и PEG+;DNR+, достоверно меньшее количество положительных случаев МОБ наблюдалось в группе PEG+;DNR+ на 15-й и 36-й дни индукции ремиссии. У пациентов с ImGR, в зависимости от применения ПЭГ-аспарагиназы, достоверно лучший МОБ-ответ отмечался на точке окончания индукционной терапии (36-й день) также в группе пациентов, рандомизированных на ветвь PEG+;DNR+ (таблица 7).

Таблица 7 – Значение уровня МОБ на 36-й день исследования в зависимости от линии рандомизации индукционной терапии ВП ОЛЛ у детей

Линия рандомизации	SGR		p	ImGR		p
	МОБ+	МОБ-		МОБ+	МОБ-	
PEG-DNR+	14(47%)	16(53%)	} 0,01	16(57%)	12(43%)	} 0,01
PEG+DNR+	5(17%)	24(83%)		7(23%)	23(77%)	
PEG+DNR-	8(32%)	17(68%)	} 0,21	-	-	-

Таким, образом, установлено, что у детей, как со стандартной, так и промежуточной группой риска, рандомизированных по ветвям индукционной терапии согласно протоколу ОЛЛ-МБ-2008 в зависимости от применения Пегилированной L–аспарагиназы, достоверно лучший ответ на терапию, выраженный отсутствием минимальной остаточной болезни наблюдается в группе пациентов с использованием Пегилированной L–аспарагиназы

Для пациентов стандартной группы риска в зависимости от применения Даунорубина на 15-й и 36-й дни противоопухолевой терапии различий в значениях уровня остаточных опухолевых клеток не выявлено.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что такие аберрации иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с острым лейкозом из предшественников В-лимфоцитов как асинхронная экспрессия антигенов CD10, CD20, CD45, CD34, сниженная интенсивность экспрессии CD45, CD19, CD38 и повышенная интенсивность экспрессии CD10, CD34, CD58, CD11a позволяют использовать данные маркеры для мониторинга минимальной остаточной болезни [2, 6, 15].

2. К окончанию индукционной терапии под действием химиопрепаратов на опухолевых клетках происходит достоверное снижение экспрессии таких иммунофенотипических маркеров как CD10 ( $p=0,03$ ), CD34 ( $p=0,02$ ), CD58 ( $p=0,01$ ) и достоверное увеличение CD20 ( $p=0,008$ ) [1, 8, 11, 14].

3. Иммунофенотипические особенности лейкозных клеток и клинические факторы, такие как возраст, пол, поражение ЦНС, спленомегалия не влияют на уровень минимальной остаточной болезни ( $p>0,05$  для всех исследованных факторов). Установлено, что лучший ответ на терапию, выраженный отсутствием минимальной остаточной болезни, характерен для пациентов с инициальным количеством лейкоцитов в периферической крови  $<30\ 000$  кл/мкл ( $p=0,03$ ) [5, 7, 12].

4. Установлено, что у детей как со стандартной, так и промежуточной группой риска, рандомизированных по ветвям индукционной терапии согласно протоколу ОЛЛ-МБ-2008 в зависимости от применения Пегилированной L-аспарагиназы, достоверно лучший ответ на терапию, выраженный отсутствием минимальной остаточной болезни наблюдается в группе пациентов с использованием Пегилированной L-аспарагиназы (для стандартной группы риска  $p=0,01$ ; для промежуточной группы риска  $p=0,01$ ).

Для пациентов со стандартной группой риска в зависимости от применения Даунорубина различий в значениях минимальной остаточной болезни не выявлено ( $p=0,21$ ) [5, 12].

5. У пациентов с положительным уровнем минимальной остаточной болезни на 15-й и 36-й дни терапии среди общей популяции опухолевых клеток выявлено достоверно более высокое инициальное содержание клеток с фенотипом CD34+CD38- (на 15-й день  $p=0,002$ ; на 36-й день  $p=0,03$ ) и CD34+CD38-CD19+ (на 15-й день  $p=0,002$ ; на 36-й день  $p=0,02$ ). Установлено, что на 15-й и 36-й дни терапии количество клеток с фенотипом CD34+CD38- (на 15-й день  $p<0,001$ ; на 36-й день  $p=0,02$ ) и CD34+CD38-CD19+ (на 15-й день  $p<0,001$ ; на 36-й день  $p=0,04$ ) коррелирует с количеством остаточных опухолевых клеток [3, 4, 9, 10, 13].

### Рекомендации по практическому использованию результатов

В ходе выполнения диссертационной работы с использованием полученных результатов исследования внедрены следующие разработки:

1. Утверждена Министерством Здравоохранения инструкция по применению: «Определение линейной принадлежности и стадии дифференцировки опухолевых клеток при остром лейкозе у детей методом многопараметрической проточной цитометрии» Белевцев М.В., Мовчан Л. В., Шман Т. В., Савицкий В.П., №139-1110, 29.12.2010 г..

2. Утверждена Министерством Здравоохранения инструкция по применению: «Метод определения количества стволовых лейкоэмических клеток при острых лейкозах» Шман Т. В., Мовчан Л. В., Тарасова А.В., Белевцев М.В., Алейникова О.В., № 236-1213, 9.12.2014 г..

3. Получен патент на изобретение «Способ определения наличия остаточных опухолевых клеток при лечении Common-B (CD10+) или Пре-B (CD10+) субтипов острого лимфобластного лейкоза у ребенка» Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев, Т. В Шман, Н. Н. Савва; патентовладелец ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». - №18696 от 29.07.2014 г.

4. Принята заявка на патент «Способ оценки остаточных опухолевых клеток при лечении острого лимфобластного лейкоза у ребенка» Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев, Т. В Шман. - Заявка на патент №а2014 0124 от 19.02.2014.

Результаты диссертационной работы могут использоваться в клинической практике, для стандартизации межлабораторных кооперативных исследований, в научных исследованиях для изучения особенностей формирования гемобластозов, а также в учебной деятельности.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах

1. Мовчан Л. В. Изменение иммунофенотипа лейкемических клеток на этапах индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей / Л. В. Мовчан, Т. В. Шман, М. В. Белевцев, В. П. Савицкий, Н. Н. Савва, О. В. Алейникова // *Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 21–26.
2. Мовчан Л. В. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов / Л. В. Мовчан // *Онкогематология.* – 2012. – № 1. – С. 22–28.
3. Мовчан Л. В. Содержание незрелых CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ субпопуляций при остром лимфобластном лейкозе у детей / Л. В. Мовчан, Т. В. Шман, О. В. Алейникова // *Весті НАН Беларусі.* – Серія мед. навук. – 2012. – № 4. – С. 69–74.
4. Shman T. V. Frequencies of immature CD34 + CD38 - and CD34 + CD38-CD19 + blasts correlate with minimal residual disease level in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia / T. V. Shman, L. V. Movchan, O. V. Aleinikova // *Leuk. and Lymphoma.* – 2013. – Vol. 54, № 11. – P. 2560–2562.
5. Мигаль Н. В. Прогностическое значение минимальной резидуальной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом / Н. В. Мигаль, М. В. Белевцев, Л. В. Мовчан, О. В. Алейникова // *Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 50–57.

### Статьи и тезисы в материалах конференций

6. Белевцев М. В. Иммунофенотипическая диагностика острых лейкозов у детей. Мониторинг минимальной резидуальной болезни / М. В. Белевцев, В. П. Савицкий, Л. В. Мовчан, Н. В. Мигаль, Н. Н. Савва, О. В. Алейникова // *Клиническая лабораторная диагностика в XXI веке: сб. материалов VII съезда специалистов клинич. лаб. диагностики Респ. Беларусь, Минск, 25-26 окт. 2007 г.* / БелМАПО; Респ. центр по клинич. лаб. диагностики; ред.: В.И. Жарко [и др.]. Минск, 2007. – С. 51–54.
7. Мигаль Н. В. Клиническая оценка минимальной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом на этапах полихимиотерапии / Н. В. Мигаль, Н. Н. Савва, М. В. Белевцев, В. П. Савицкий, А. Н. Мелешко, А. М. Кустанович, Л. В. Мовчан, Л. В. Спивак, О. В. Алейникова // *Достижения медицинской науки Беларуси : рец. науч.-практ. ежегод.* / ГУ РНМБ; ред. И. Н. Семененя. – Минск, 2008. – Вып. 13. – С. 67–68.
8. Мовчан Л. В. Изменение лейкоз-ассоциированного фенотипа опухолевых клеток на ранних этапах химиотерапии В-линейных острых лимфобластных лейкозов у детей / Л. В. Мовчан, Т. В. Шман, М. В. Белевцев, В. П. Савицкий, Н. В. Мигаль, Н. Н. Савва, О. В. Алейникова // *Патогенез социально значимых заболеваний человека: материалы конф.* / Белорус. гос. мед. ун-т; под ред. С. Л. Кабака. – Минск, 2010. – С. 41–45.

9. Шман Т. В. Влияние свойств лейкемических клеток, ассоциированных с лекарственной резистентностью, на уровень минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах у детей / Т. В. Шман, Л. В. Мовчан, В. П. Савицкий // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегод. / ГУ РНМБ; ред. И. Н. Семененя. – Минск, 2010. – Вып. 15. – С. 43–44.
10. Мовчан Л. В. Анализ количества клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ в качестве потенциальных лейкемических стволовых клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей / Л. В. Мовчан, Т. В. Шман // Актуальные вопросы гематологии: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 15-16 сент. 2011 г. [опубл. в журн.] Проб. здоровья и экологии. – 2011. – № 2, прил. – С. 66–69.
11. Шман Т. В. Изменение экспрессии иммунофенотипических маркеров лейкемических клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом и из предшественников В-лимфоцитов IN VITRO И IN VIVO / Т. В. Шман, Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: сб. науч. тр. VII съезда гематологов и трансфузиологов Респ. Беларусь, к 80-летию гематологической и трансфузиологической служб Республики Беларусь, Минск, 24-25 мая 2012 г. / Респ. науч.-практ. центр трансфузиологии и мед. биотехнологий; под ред. Г. Я. Хулупа. – Минск, 2012. – С. 392–394.
12. Мовчан Л. В. Элиминация опухолевых клеток на этапах индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей в зависимости от иммунофенотипических особенностей лейкемических клеток, стандартных прогностических факторов и терапевтических подходов / Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев, Т. В. Шман, Н. В. Мигаль, О. В. Алейникова // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии: сб. материалов XII междунар. науч.-практ. конф. / Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии; ред.: О. В. Алейникова [и др.]. – Минск, 2012. – С. 163–170.
13. Шман Т. В. Взаимосвязь количества стволовых клеток, выявляемых по фенотипу CD34+CD38- или CD34+CD38-CD19+, и ответа пациентов на индукционную терапию при В-клеточных острых лейкозах у детей / Т. В. Шман, Л. В. Мовчан, А. В. Тарасова, О. В. Алейникова // Достижения медицинской науки: рец. науч.-практ. ежегод. / ГУ РНМБ; ред. колл.: В. И. Жарко [и др.]. – Минск, 2013. – Вып. 18. – С. 26–28.
14. Изменение лейкоз-ассоциированного фенотипа опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом в процессе химиотерапии / Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев, В. П. Савицкий // Онкогематология: материалы VI симпозиума «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний». – 2008. – № 4. – С. 58–59.
15. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток на этапах диагностики и интенсивной химиотерапии у детей с острым лимфобластным лейкозом / Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев // Тезисы X юбилейной научной конференции молодых ученых с участием международных специалистов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической онкологии», Украина, Киев, 22-24 апреля 2010г. – С. 42-43.

## Патент

1. Мовчан Л. В. Способ определения наличия остаточных опухолевых клеток при лечении Common-B (CD10+) или Пре-B (CD10+) субтипов острого лимфобластного лейкоза у ребенка. / Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев, Т. В Шман, Н. Н. Савва; патентовладелец ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». - №18696 от 29.07.2014 г.

2. Мовчан Л. В. Способ оценки остаточных опухолевых клеток при лечении острого лимфобластного лейкоза у ребенка. / Л. В. Мовчан, М. В. Белевцев, Т. В Шман. - Заявка на патент №а2014 0124 от 19.02.2014 г. (Уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение от 25.05.2014г.).

## Резюме

Мовчан Людмила Викторовна

### Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток на этапах диагностики и интенсивной химиотерапии у детей с острым лимфобластным лейкозом

**Ключевые слова:** дети, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый лимфобластный лейкоз из предшественников В-лимфоцитов (ВП ОЛЛ), лейкоз-ассоциированный иммунофенотип (ЛАИФ), минимальная остаточная болезнь (МОБ), проточная цитофлуориметрия (ПЦФ).

**Цель работы:** оценить особенности лейкоз-ассоциированного фенотипа лейкозных клеток на этапах диагностики и интенсивной химиотерапии ВП ОЛЛ у детей для определения уровня остаточных опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии.

**Методы исследования:** клинические, лабораторные, культуральные, статистические.

**Полученные результаты:** основные отличия опухолевых клеток от нормальных предшественников В-лимфоцитов выражаются достоверным различием в интенсивности экспрессии таких маркеров как CD45, CD10, CD20, CD34, CD38, CD58, и CD11a, что позволяет использовать их для мониторинга МОБ. К окончанию индукционной терапии под действием химиопрепаратов на опухолевых клетках происходит достоверное снижение экспрессии маркеров CD10, CD34, CD58 и достоверное увеличение CD20. Выявленные иммунофенотипические особенности опухолевых клеток и клинические факторы, такие как возраст, пол, поражение ЦНС, спленомегалия не влияют на уровень МОБ. Установлено, что лучший ответ на терапию, выраженный отсутствием минимальной остаточной болезни, характерен для пациентов с инициальным количеством лейкоцитов в периферической крови <30 000 кл/мкл. Также установлено, что у детей как со стандартной (SGR), так и промежуточной (ImGR) группой риска достоверно лучший ответ на терапию наблюдается в группе пациентов с использованием Пегилированной L – аспарагиназы. У пациентов с положительным уровнем минимальной остаточной болезни на 15-й и 36-й дни терапии среди общей популяции опухолевых клеток выявлено достоверно более высокое инициальное содержание клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+. Установлено, что на 15-й и 36-й дни терапии количество клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ коррелирует с количеством остаточных опухолевых клеток.

**Научная новизна:** разработана и запатентована оригинальная панель дифференциально-диагностических маркеров для мониторинга МОБ; выявлены особенности изменения экспрессии иммунофенотипических маркеров под действием химиопрепаратов на ранних этапах противоопухолевой терапии протокола ОЛЛ-МБ-2008 *in vivo* и в эксперименте *in vitro*; определена взаимосвязь особенностей иммунофенотипа опухолевых клеток, исходных клинических факторов, используемых для стратификации пациентов на SGR и ImGR в рамках протокола ОЛЛ-МБ-2008 на элиминацию опухолевых клеток при ВП ОЛЛ у детей; установлено, что использование Пегилированной L–аспарагиназы в ходе индукции ремиссии по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 способствует эффективной элиминации остаточных опухолевых клеток; установлена взаимосвязь количества клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ в качестве потенциальных лейкозных стволовых клеток с уровнем МОБ на этапе индукции ремиссии ВП ОЛЛ у детей.

**Рекомендации по использованию:** разработана и запатентована оригинальная панель дифференциально-диагностических маркеров для мониторинга МОБ.

**Область применения:** гематология, онкология, клиническая лабораторная диагностика.

## Рэзюмэ

Моўчан Людміла Віктараўна

### Лейкоз-асацыіраваны імунафенатып пухлінавых клетак на этапах дыягностыкі і інтэнсіўнай хіміятэрапіі ў дзяцей з вострым лімфобласным лейкозам

**Ключавыя словы:** дзеці, востры лімфобласны лейкоз (ВЛЛ), востры лімфобласны лейкоз з папярэднікаў В-лімфацытаў (ВП ВЛЛ), лейкоз-асацыіраваны імунафенатып (ЛАІФ), мінімальная рэшткавая хвароба (МРХ), проточная цытафлуарыметрыя (ПЦФ).

**Мэта працы:** ацаніць асаблівасці лейкоз-асацыіраванага фенатыпу лейкозных клетак на этапах дыягностыкі і інтэнсіўнай хіміятэрапіі ВП ВЛЛ ў дзяцей для вызначэння ўзроўню рэшткавых пухлінавых клетак метадам праточнай цытафлуарыметрыі.

**Метады даследавання:** клінічныя, лабараторныя, культуральныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі:** асноўныя адрозненні пухлінавых клетак ад нармальных папярэднікаў В-лімфацытаў выяўляюцца пэўным адрозненнем у інтэнсіўнасці экспрэсіі такіх маркераў як CD45, CD10, CD20, CD34, CD38, CD58, і CD11a, што дазваляе выкарыстоўваць іх для маніторынгу МРХ. Да заканчэння індукцыйнай тэрапіі пад дзеяннем хіміяпрэпаратаў на пухлінавых клетках адбываецца пэўнае зніжэнне экспрэсіі маркераў CD10, CD34, CD58 і пэўнае павелічэнне CD20. Выяўленыя імунафенатыпічныя асаблівасці пухлінавых клетак і клінічныя фактары, такія як ўзрост, пол, паражэнне ЦНС, спленамегалія не ўплываюць на ўзровень МРХ. Вызначана, што лепшы адказ на тэрапію, выражаны адсутнасцю мінімальнай рэшткавай хваробы, характэрны для пацыентаў з пачатковай колькасцю лейкацытаў у перыферычнай крыві < 30 000 кл / мкл. Таксама вызначана, што ў дзяцей як са стандартнай (SGR), так і прамежкавай (ImGR) групай рызыкі пэўна лепшы адказ на тэрапію назіраецца ў групе пацыентаў з выкарыстаннем Пэгіліраванай L - аспарагіназы. У пацыентаў з станоўчым узроўнем мінімальнай рэшткавай хваробы на 15-й і 36-й дні тэрапіі сярод агульнай папуляцыі пухлінавых клетак выяўлена пэўна больш высокая пачатковая колькасць клетак з фенатыпам CD34 + CD38- і CD34 + CD38-CD19 +. Вызначана, што на 15-й і 36-й дні тэрапіі колькасць клетак з фенатыпам CD34 + CD38- і CD34 + CD38-CD19 + карэлюе з колькасцю рэшткавых пухлінавых клетак.

**Навуковая навізна:** распрацавана і запатэнтавана арыгінальная панэль дыферэнцыяльна-дыягнастычных маркераў для маніторынгу МРХ; выяўлены асаблівасці змены экспрэсіі імунафенатыпічных маркераў пад дзеяннем хіміяпрэпаратаў на ранніх этапах супрацьпухлінавай тэрапіі пратаколу ВЛЛ-МБ-2008 *in vivo* і ў эксперыменце *in vitro*; вызначана ўзаемасувязь асаблівасцяў імунафенатыпа пухлінавых клетак, зыходных клінічных фактараў, якія выкарыстоўваюцца для стратыфікацыі пацыентаў на SGR і ImGR ў рамках пратаколу ВЛЛ-МБ-2008 на элімінацыю пухлінавых клетак пры ВП ВЛЛ ў дзяцей; вызначана, што выкарыстанне Пэгіліраванай L-аспарагіназы падчас індукцыі рэмісіі па пратаколе ВЛЛ-МБ-2008 спрыяе эфектыўнай элімінацыі рэшткавых пухлінавых клетак; вызначана ўзаемасувязь колькасці клетак з імунафенатыпам CD34 + CD38- і CD34 + CD38-CD19 + у якасці патэнцыйных лейкозных ствалавых клетак з узроўнем МРХ на этапе індукцыі рэмісіі ВП ВЛЛ ў дзяцей.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** распрацавана і запатэнтавана арыгінальная панэль дыферэнцыяльна-дыягнастычных маркераў для маніторынгу МРХ.

**Галіна ўжывання:** гематалогія, анкалогія, клінічная лабараторная дыягностыка.

## Summary

Movchan Ludmila

### **Leukemia-associated immunophenotype of tumor cells at the stages of diagnosis and intensive chemotherapy in childhood B-precursors acute lymphoblastic leukemia**

**Key words:** children, acute lymphoblastic leukemia (ALL), B-precursors acute lymphoblastic leukemia (BP ALL), leukemia-associated immunophenotype (LAIP), minimal residual disease (MRD), flow cytometry (FC).

**Purpose of the study:** to estimate the features of leukemia-associated immunophenotype of tumor cells on the stages of diagnostic and intensive chemotherapy in childhood BP ALL for detection of minimal residual disease by flow cytometry.

**Methods of the study:** clinical, laboratory, cultural and statistical .

**Obtained results:** the main differences between tumor and normal bone marrow cells are CD45, CD10, CD20, CD34, CD38, CD58, and CD11a expression, that allow to use these markers combination for MRD monitoring. At the end of induction chemotherapy the levels of expression of CD10, CD34 and CD58 decrease while the intensity of CD20 increases significantly. Immunophenotypic features of tumor cells and clinical factors such as age, sex, lesion of CNS, size of spleen not influence on the level of MRD. Patients with initial level of leukocytes below of 30 000 cells/mkl have better treatment response that was detected by the absence of MRD. The children from the SGR and ImGR risk groups which were treated with PEG- L-Asparaginase have significantly better treatment response. The high percentage of both CD34+CD38- and CD34+CD38-CD19+ among the general population leukemic cells is associate with a worse response on the 15th and 36th days of induction therapy. It is revealed that on the 15th and 36th days of therapy the amount of cells with phenotype of CD34+CD38- and CD34+CD38-CD19+ correlates with the amount of residual tumor cells.

**Scientific novelty:** developed and patented original combination of differential-diagnostic markers for MRD monitoring; it is revealed specific changes in expression of immunophenotype markers *in vivo* and *in vitro* at early stages of induction chemotherapy according to ALL-MB-2008 protocol); it is found relations between immunophenotypic features of leukemia cells, initial clinical factors of stratification patients into SGR and ImGR groups and elimination of cancer cells in childhood BP ALL; it is detected that the use of PEG- L-Asparaginase in the induction remission of protocol ALL-MB-2008 promote the effective elimination of residual tumor cells; it is revealed relations between the quantity of CD34+CD38- and CD34+CD38-CD19+ cells and the levels of MRD at induction chemotherapy in childhood BP ALL.

**Recommendations for use:** developed and patented the original combination of differential-diagnostic markers for MRD monitoring.

**Field of application:** hematology, oncology, clinical laboratory diagnostics.