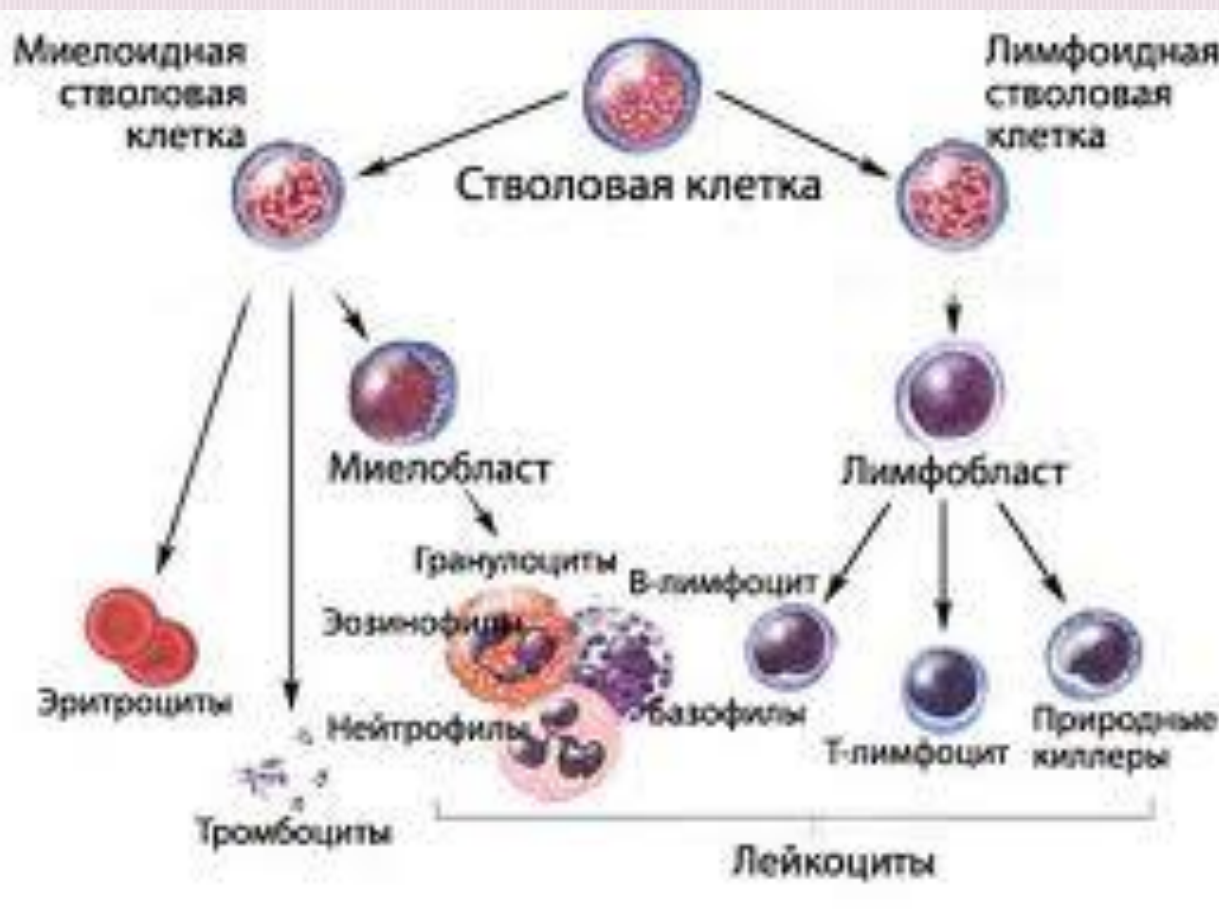


СРС

«Имунофенотипирование при остром лейкозе»



АСТАНА 2012

Острые лейкозы (ОЛ)

- гетерогенная группа опухолевых заболеваний системы крови — **гемобластозов**, которые характеризуются первичным поражением костного мозга морфологически незрелыми кроветворными (бластными) клетками с вытеснением ими нормальных элементов гемопоэза и инфильтрацией ими различных тканей и органов.



Все острые лейкозы **клональны**, т.е. возникают из одной мутировавшей кроветворной клетки, которая может относиться как к очень ранним, так и к коммитированным в направлении различных линий кроветворения клеткам-предшественницам.

Принадлежность бластных клеток к той или иной линии кроветворения, степень их дифференцировки обуславливают клиническое течение острого лейкоза, выбор терапии, эффективность проводимого лечения и, соответственно, прогноз заболевания.



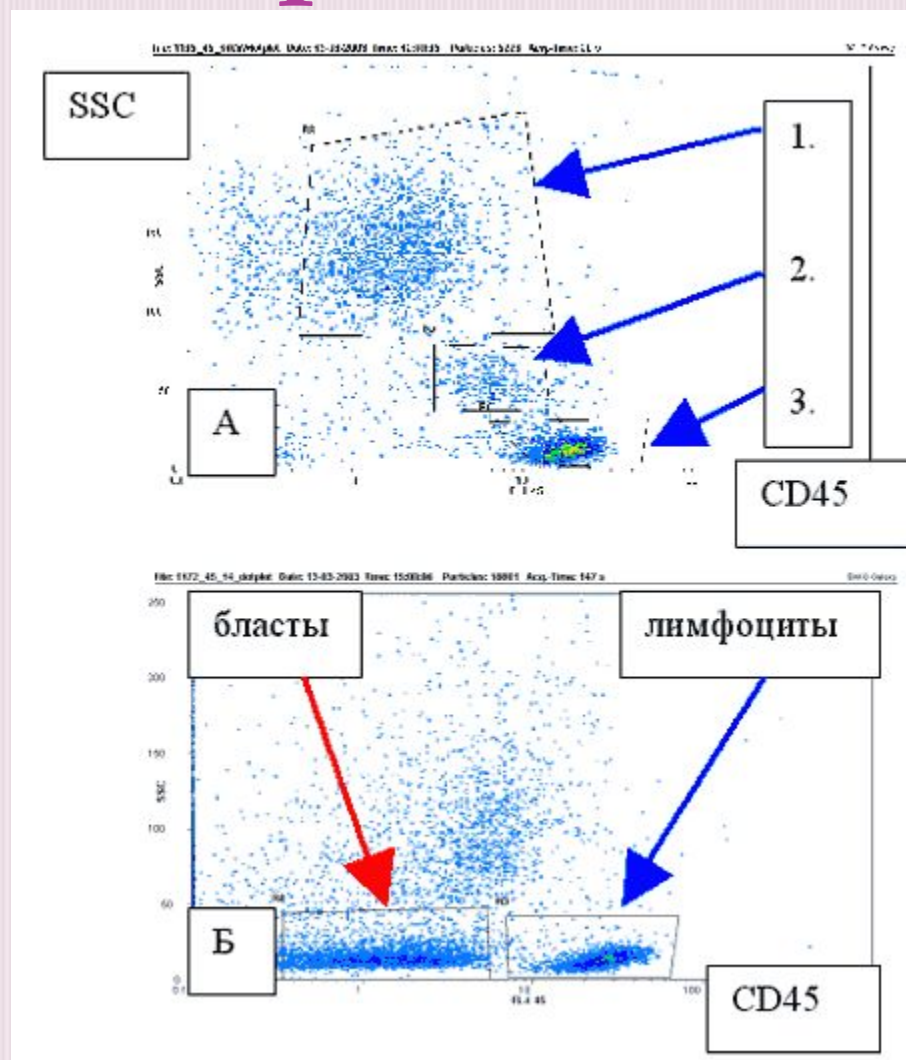
Основные методы, используемые для диагностики ОЛ

1. Морфологическое исследование.
2. Цитохимические методы исследования.
- 3. Иммунофенотипирование.**
4. Цитогенетические методы исследования.
5. Молекулярно-биологические методы исследования.



Иммунофенотипирование

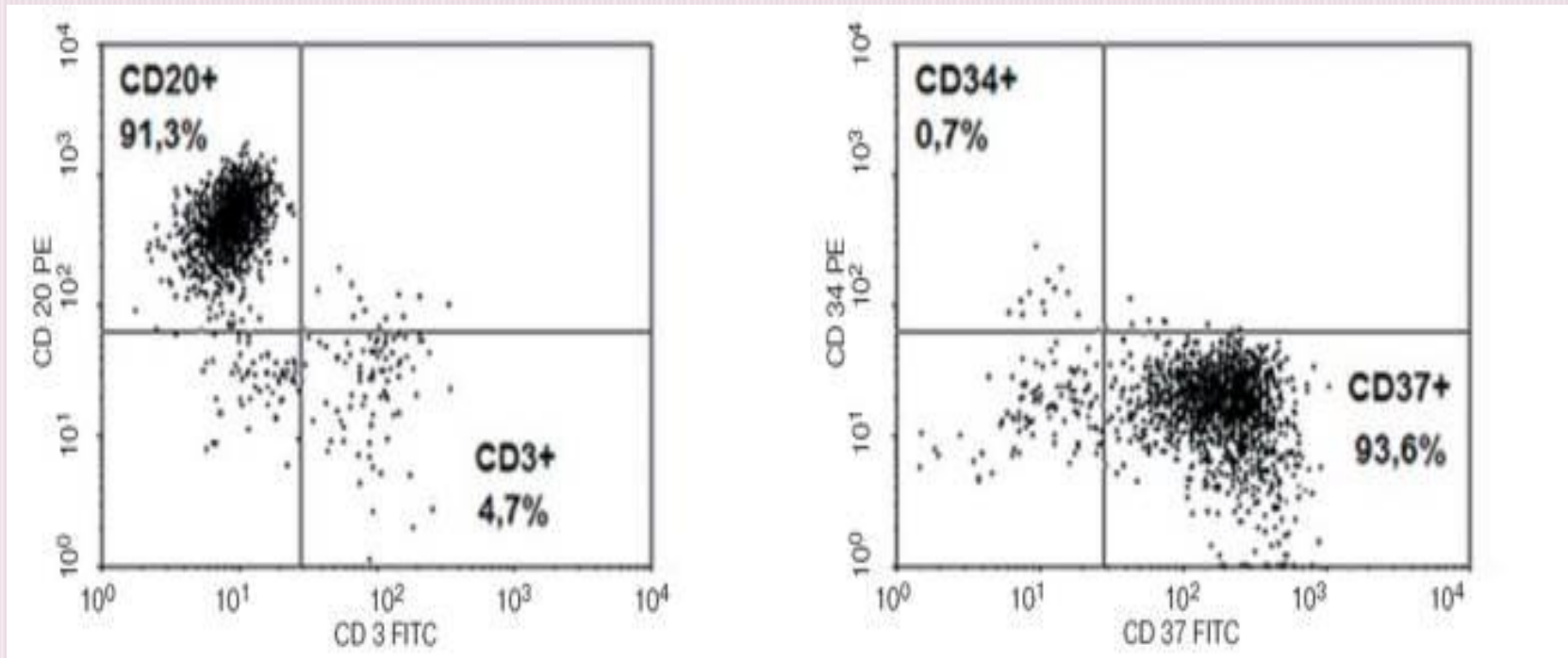
—
характеристика клеток при помощи моноклональных антител или каких-либо других зондов, позволяющих судить о их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров.



Двумерные гистограммы SSC/CD45.

Иммунофенотипирование бластных клеток является

определяющим моментом в диагностике острых лейкозов, их классификации в соответствии с линейной принадлежностью и стадией дифференцировки лейкоэмических клеток, а так же выделении прогностически важных подтипов и выборе методов рациональной терапии.



- *Экспрессия опухолевыми бластами молекул периферических этапов В-линейной дифференцировки CD20 и CD37 при отсутствии маркера клеток-предшественников CD34.*

Иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии

- этапность процесса созревания гемопозитических клеток-предшественников, из которых может развиться лейкозный клон.
- иммунофенотипическая характеристика бластных клеток при выявлении линейно-специфичных и стадийно-специфичных маркеров с помощью моноклональных антител (МКА)
- более точный метод, чем морфологический и цитохимический анализ.



Классификационные схемы острых лейкозов, построенные с учетом данных **иммунофенотипирования** опухолевых клеток, отражают существующие стадии дифференцировки их нормальных аналогов, начиная с костно-мозговых клеток-предшественников.

Иммунологическая классификация **Европейской группы по иммунологическому изучению лейкозов (EGIL)** предполагает использование стандартизированной панели МКА, что позволяет определить происхождение бластных клеток более чем в 98% случаев ОЛ.



- Определение линейной принадлежности лейкозных бластов является обязательной частью обследования пациентов с подозрением на гемобластоз. Для этого может быть достаточной **оценка экспрессии маркеров скриннинговой панели:**

Линейную принадлежность клеток определяют:

(а) миелоидные маркеры: МПО, CD13, CD33;

(б) Лимфоидные маркеры:

1. Маркеры Т-лимфоцитов - CD2, CD7, cyCD3 и sCD3;

2. Маркеры В-лимфоцитов - CD10, CD19, cyCD22 и sCD22.

Незрелость клетки характеризуют TdT, CD34, HLA-DR.

линейно-специфические маркеры:

- сCD3, MPO, сCD79а, CD7, CD2, CD10, CD19, CD22 (п или ц), Ig, CD13, CD33.

стадийно-специфичные маркеры:

- DR, CD1а, CD4, CD5, CD8, CD3 (п), IgM (ц), CD14, CD117, CD65, CD41 или CD61, CD238 (гликофорин А) или CD36.

дополнительные маркеры:

- CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD35/36, CD58, CD64, CD68 (ц), CD71, CD86, CD99, CD123, TCR / или / , CD56, CD45, CD34, CD68, TdT.

Примечание. С — цитоплазматический антиген; MPO — миелопероксидаза, TdT — терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

Классификация EGIL-95

Выделяют **4 основных группы острых лейкозов:**

1. Острые лимфобластные лейкозы.
2. Острые миелобластные лейкозы.
3. Бифенотипические острые лейкозы (БОЛ).
4. Недифференцированные острые лейкозы.

- В группе острых лимфобластных лейкозов выделяют 4 подтипа В-линейных и 5 подтипов Т-линейных лимфолейкозов, различающихся по степени дифференцировки лейкозных клеток, а также ОЛЛ с коэкспрессией миеломаркеров.

Иммунофенотипическая классификация острых лимфобластных лейкозов

Вариант ОЛЛ	Характерные маркеры
•Ранний пре-В	CD10-,CD19+,clg-, slg-, сCD79α, сCD22
•Пре-В	CD10+,CD19+,clg+,slg-
•В	CD10+,CD19+,clg-,slg+
•Пре-Т	CD7+,сCD3+
•Т	CD1+,CD3+,CD4+,CD7+,CD8+

*с- цитоплазматический, s- поверхностный,
мембранный*

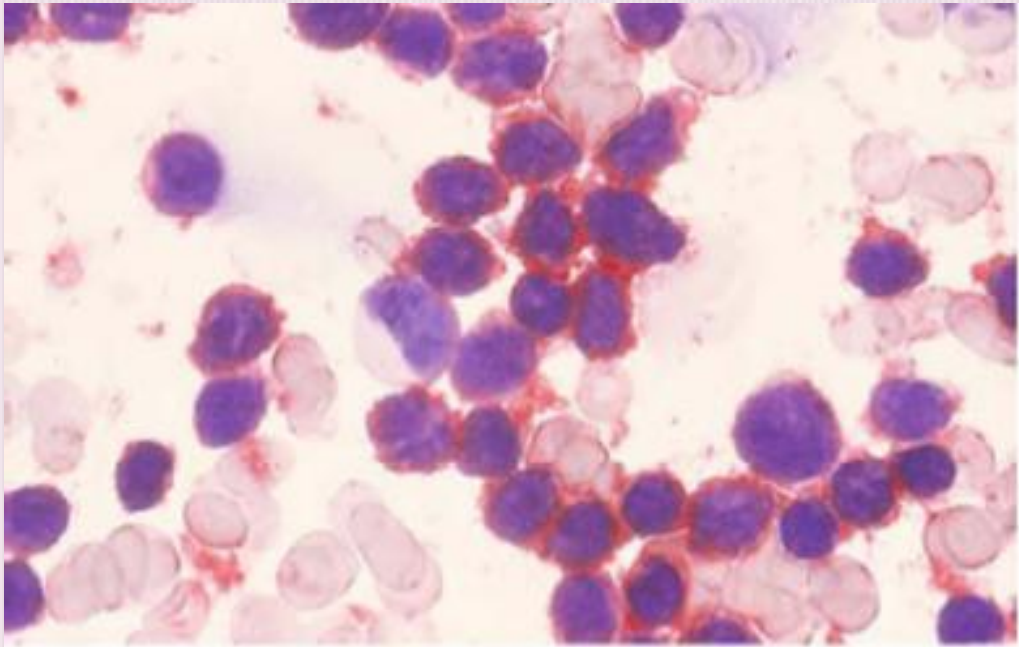
- Иммунофенотипирование при острых миелобластных лейкозах (ОМЛ) не несет столь существенной диагностической нагрузки.
- Для ОМЛ (за исключением M0, M7) иммунофенотипирование не является принципиальным методом, оно лишь подтверждает диагноз ОЛ, однако иммунофенотипическая оценка лейкемических клеток при ОМЛ необходима для дальнейшего мониторинга остаточных опухолевых клеток в ходе терапии.
- Лишь в случае M0 и M7 использование иммунофенотипирования позволяет достоверно установить диагноз.

С внедрением в практику метода иммунофенотипирования и созданием большого количества моноклональных антител появилось понятие **бифенотипического и билинейного** острого лейкоза.

Чаще всего речь идет о тех случаях, когда лейкоэмические клетки несут на себе маркеры двух или более линий кроветворения (миелоидной и лимфоидной, например).

Диагноз **бифенотипического** острого лейкоза устанавливается в тех ситуациях, когда цитохимически и морфологически не представляется возможным определить принадлежность клеток к той или иной линии кроветворения, а при иммунофенотипировании на мембране этих клеток экспрессируются принципиально значимые маркеры (оцениваемые по специальной шкале в баллах) как лимфоидные, так и миелоидные.

Реже наблюдаются случаи, когда сосуществуют две популяции бластных клеток, иммунофенотипически принадлежащих к различным линиям кроветворения. Этот вариант острого лейкоза называют **билинейным**.



*Иммунофенотипирование: CD19
(все клетки положительные)*

Иммунофенотипирование выполняется с использованием панели МАТ (фирмы «Becton Dickinson» и «Beckman Coulter»), выявляющих

- поверхностные маркеры (CD45, CD14, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD10, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD117, CD15, CD11b, sIgM);
- внутриклеточные (cγIgM, MPO, TdT, CD79a, cγCD3).

Результаты учитывают методом проточной цитометрии (на аппарате Cytomics FC500 фирмы «Beckman Coulter»), регистрируя долю позитивных клеток по каждому маркеру.

Позитивность определяется по отношению к пробам с негативным изотипическим контролем.

Положительными считают пробы, в которых МКА прореагировали не менее чем с 20% бластных клеток.



Описание технологии метода определения поверхностных маркеров лейкозных клеток

- **Материал для исследования** - пунктат костного мозга или периферическая кровь.
- Исследуемый материал доставляют в специальных пробирках, в которые предварительно вносится антикоагулянт (3,8% цитрат натрия или ЭДТА натрия).
- Кровь или костный мозг набирают в объеме от 2,5 до 5 мл в зависимости от клеточности.

Описание технологии метода определения поверхностных маркеров лейкозных клеток

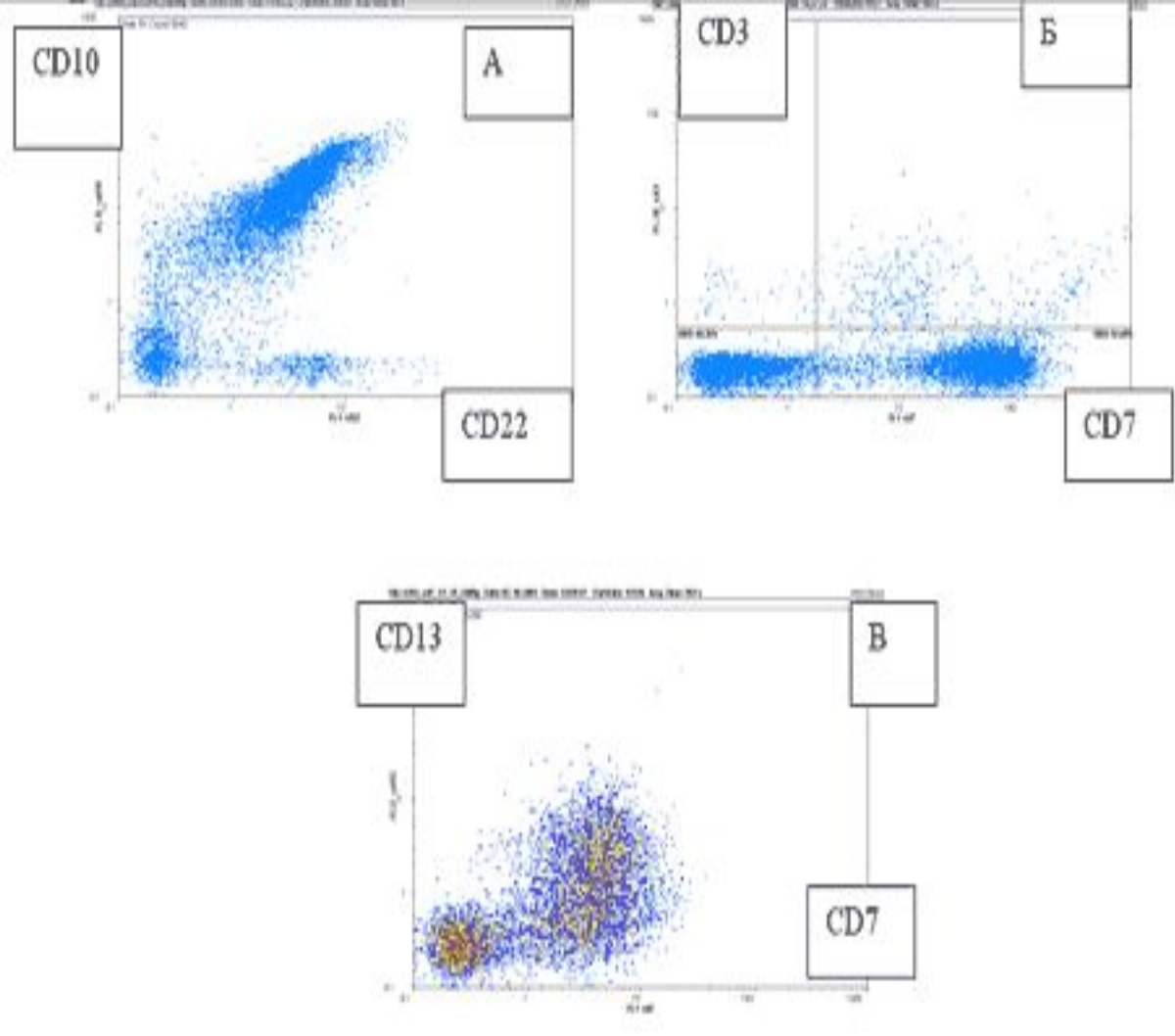
- **Методика определения** поверхностных антигенов выполняется с предварительным выделением мононуклеаров.
- Для этого вначале разводим костный мозг в 2 раза раствором фосфатного буфера (Phosphate buffered saline=PBS); периферическую кровь разводить не следует.
- Для выделения мононуклеаров в пробирку наливают 2,5 мл Histopaque (жидкость для разделения клеток в градиенте плотности). Пастеровской пипеткой сверху наслаивают 5 мл разведенного костного мозга или цельной периферической крови. Центрифугируют 30 мин. при 1500 об./мин. Пастеровской пипеткой собирают «кольцо» мононуклеаров в интерфазе, переносят в сухую пробирку, остаток выбрасывают. Добавляют 5 мл PBS, центрифугируют 3 мин при 2200 об./мин. Надосадо́к сливают, осадок встряхивают. Взвесь клеток заливают лизирующим раствором для лизиса эритроцитов, до 5–8 мл, оставляют при комнатной температуре на 3 мин.

Описание технологии метода определения поверхностных маркеров лейкозных клеток

- Клетки осаждают центрифугированием (3 мин при 2200 об./мин.), надосадок сливают, клетки встряхивают и добавляют 500 мкл PBS (отмывка). Повторяют отмывку 2 раза. Готовят рабочее разведение клеточной взвеси в PBS в концентрации 1 млн/мл (проверяют в камере Горяева).
- В специальные пробирки разливают готовую взвесь клеток по 100 мкл. Число пробирок зависит от числа используемых в каждом конкретном случае моноклональных антител. Наиболее полная **панель для первичной диагностики формы лейкоза** включает следующие МКА: Control, CD45, CD14, CD2, CD5, CD7, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD10, HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD15, CD11c, pIgM .

Описание технологии метода определения поверхностных маркеров лейкозных клеток

- Пробирки подписывают по названию МКА. В каждую пробирку с взвесью клеток вносят МКА в количестве 10 мкл (согласно инструкции).
- Далее добавляют CD45+ — МКА к общему лейкоцитарному антигену. Пробы инкубируют в холодильнике (+4оС) 30 мин. После инкубации клетки отмывают PBS 2 раза. Если используется МКА без флуоресцентной метки, то после первой отмывки к пробе добавляют 10 мкл вторичных антител, меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE), инкубируют в холодильнике 15 мин, после чего отмывают 1 раз. После отмывки пробы заливают 500 мкл раствора параформальдегида (1%).
- Результаты учитывают на (проточном цитофлуориметре) аппарате CytomicsFC500 (фирмы «Beckman Coulter») согласно инструкции фирмы-производителя.



Примеры aberrантности иммунофенотипического профиля лейкозных бластов при ОЛ

А - асинхронная экспрессия антигенов, относящихся к разным стадиям дифференцировки. На гистограмме представлен костный мозг больной 14 лет с В-клеточным ОЛ (Common вариант). Основная масса бластов одновременно экспрессирует CD10 и CD22, т.е. определяется одновременная экспрессия ранних и поздних антигенов.

Б - фенотипический профиль, практически не встречающийся в норме

(клетки с яркой экспрессией CD7 определяются в костном мозге в норме с частотой <math>< 1/104</math>). Представлена периферическая кровь пациентки 38 лет с бластозом периферической крови до 50%. Все опухолевые клетки ярко экспрессируют CD7. Популяция клеток, одновременно экспрессирующих CD3 и CD7 представлена минимально.

В - выявление маркеров другой линейной принадлежности, например, лимфоидных маркеров при ОМЛ. Представлена гистограмма костного мозга больного ОМЛ (вариант М2) с яркой экспрессией CD7.

Литература

1. Клиническая онкогематология: руководство для врачей. Под ред. М.А.Волковой. - М.: Медицина, 2001. - 576 с.
2. Руководство по гематологии в 3 т. Т.1. Под ред. А. И.Воробьева. - М.: Ньюдиамед, 2002, - 280с.
3. Методы проточной цитометрии в медицинских и биологических исследованиях. Под ред. М. Потапнева. - Минск: ГУРНМБ, 2003, -136с.

**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!**