

Анализ результатов применения различных антител для определения экспрессии CD1a при иммунофенотипировании Т-линейного острого лимфобластного лейкоза у детей

А.С. Аксёнова, О.И. Илларионова, Д.В. Литвинов, С.А. Кашпор, А.М. Попов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Уровень экспрессии антигена CD1a – важный прогностический фактор при Т-линейных острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ), поэтому в рамках многоцентровых исследований большое значение имеет стандартизация определения данного антигена на поверхности бластных клеток. Применение в лабораториях разных антител к CD1a может приводить к различиям при выборе тактики ведения пациентов. Цель данного исследования – анализ результатов иммунофенотипирования образцов костного мозга пациентов с Т-линейным ОЛЛ с применением разных антител к CD1a. Всего в исследование был включен 31 пациент (8 девочек и 23 мальчика) в возрасте от 1 года до 16 лет (медиана возраста – 7 лет). Исследование проводили методом многоцветной проточной цитометрии с использованием двух разных антител к CD1a. Анализ показал, что статистически значимого различия в результатах иммунофенотипирования при применении антител BL6 и SK9 нет, однако при использовании антитела BL6 опухолевая популяция лучше визуализируется на точечных графиках. Кроме того, мы обнаружили пациентов с различными результатами иммунофенотипирования при применении разных антител. Было принято решение применять антитело BL6.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, CD1a, проточная цитометрия

Аксёнова А.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2018; 17 (4): 23–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-23-26

The results of different antibodies application for CD1a expression evaluation in pediatric t-lineage all

A.S. Aksenova, O.I. Illarionova, D.V. Litvinov, S.A. Kashpor, A.M. Popov

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

CD1a antigen expression is an important prognostic factor in T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), thus standardized approach for this antigen expression detection is crucial for multicenter trials. The use of different antibodies in laboratories could lead to wrong decisions for patients management. The aim of the present study was to analyze the results of flow cytometric bone marrow investigation in children with T-ALL using different CD1a-directed antibodies. The bone marrow samples from 31 children (8 girls and 23 boys) with T-ALL aged from 1 to 16 years (median age 7) were studied by multicolor flow cytometry including two different antibodies against CD1a (BL6 and SK9). There were no significant differences in the immunophenotyping results. However, the CD1a-positivity of tumor cell population was visible in the dot plot better when BL6 antibody was used. In addition, two patients with discordant CD1a expression data were founded. Therefore, we antibody BL6 was recommended for routine T-ALL immunophenotyping.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, CD1a, flow cytometry

Aksenova A.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2018; 17 (4): 23–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-23-26

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)/лимфома – это опухоль, которая происходит из предшественников В- или Т-лимфоидной линии [1]. В европейской части России ОЛЛ из Т-клеток предшественников встречаются значительно реже по сравнению с ОЛЛ В-клеточного происхождения: около 25% общего числа острых лейкозов у взрослых и около 15% – у детей [2, 3]. Т-ОЛЛ характеризуется агрессивностью и быстрым прогрессированием [4].

Наиболее популярная классификация Т-линейных ОЛЛ – классификация EGIL, которая разделяет Т-линейные ОЛЛ на четыре варианта – TI, TII, TIII (кортикальный) и TIV – в зависимости от иммунофенотипа бластной популяции. Для кортикального (TIII) варианта Т-ОЛЛ характерна экспрессия сигнальной молекулы CD1a [5].

Рядом авторов обнаружена зависимость прогноза заболевания от наличия или отсутствия экспрес-

Контактная информация:

Попов Александр Михайлович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии и иммуногенеза НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

© 2018 by NMRC PHOI

Correspondence:

Alexander M. Popov, MD, PhD, Head of Cell immunology and immunogenesis laboratory Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

сии молекулы CD1a на поверхности опухолевых клеток. По литературным данным, кортикальный вариант Т-ОЛЛ ассоциирован с благоприятным исходом в связи с более высокой общей выживаемостью, прослеживается также корреляция с более низкой частотой возникновения рецидива [4, 6–8]. В педиатрической практике известно, что CD1a-положительный Т-линейный ОЛЛ ассоциирован с лучшими результатами в терапии [9].

Учитывая большое прогностическое значение маркера CD1a при Т-линейных ОЛЛ, очень важно точное его определение. Для этой цели применяют меченые флуорохромом моноклональные антитела к CD1a, но результаты, полученные при использовании различных моноклональных антител к одному и тому же антигену, могут существенно отличаться, что недопустимо в условиях многоцентровых исследований.

Цель исследования: анализ результатов иммунофенотипирования образцов костного мозга пациентов с Т-линейным ОЛЛ с применением разных антител к CD1a.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала в данной работе использованы образцы костного мозга пациентов с Т-линейным ОЛЛ. Всего в исследование был включен 31 пациент (8 девочек и 23 мальчика); медиана

возраста – 7 лет (от 1 года до 16 лет). В исследуемую группу вошли 20 пациентов с кортикальным вариантом Т-линейного ОЛЛ. В группе сравнения было 11 детей с CD1a-негативным Т-линейным ОЛЛ, у 10 из которых, согласно критериям группы по классификации EGIL [5], диагностировали TII-вариант, у одного – TIV.

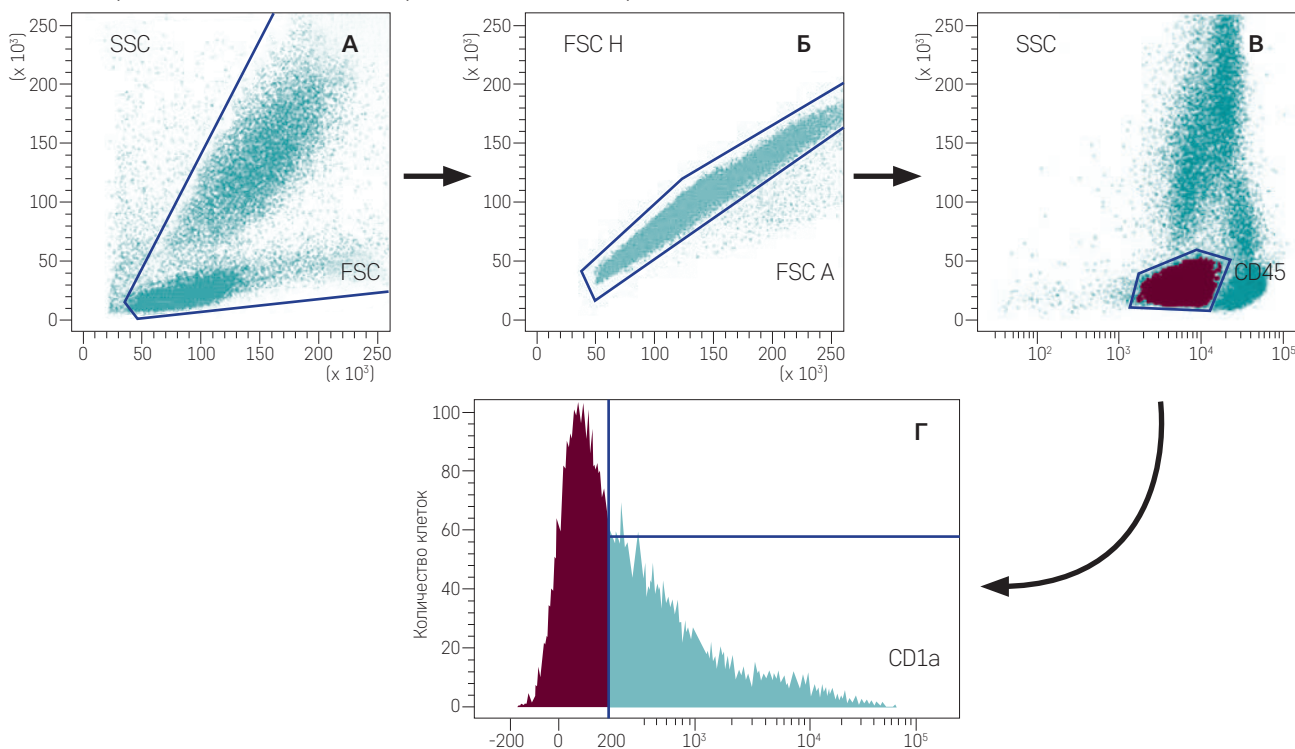
Иммунофенотипирование опухолевых клеток в костном мозге производили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе FACS Canto II (Becton Dickinson & Co (BD), США). Ежедневная настройка и мониторинг стабильности работы прибора осуществлялись с помощью частиц *Cytometer Setup and Tracking* (BD) согласно рекомендациям группы EuroFlow [10], что позволило получать воспроизводимые результаты определения средней интенсивности флуоресценции (*mean fluorescence intensity* – MFI). Расчет цифровой компенсации свечения флуорохромов производили с использованием калибровочной системы *CompBeads* (BD).

Для определения экспрессии CD1a использовали два разных моноклональных антитела (МКАТ) BL6 и SK9, меченные R-фикоэритрином (PE). Окрашивание первично-мечеными МКАТ выполняли согласно инструкции производителя по стандартной методике [11].

Первоначально все образцы костного мозга исследовали для выявления патологической популяции и оценки ее линейной принадлежности. При

Рисунок 1

Анализ результатов проточной цитометрии; последовательность действий: **А** – точечный график расположения клеток образца костного мозга в зависимости от гранулярности (SSC) и размера (FSC), отделение от дедбриса; **Б** – отделение исследуемого образца от конгломератов клеток по параметрам светорассеяния FSC-H и FSC-A; **В** – выделение опухолевой популяции по параметрам SSC и экспрессии CD45; **Г** – оценка экспрессии CD1a на гистограмме



подтверждении Т-линейной принадлежности дополнительно проводили исследование экспрессии CD1a с помощью антител BL6 и SK9. Полученные данные – не менее 10 тыс. ядродержащих клеток – анализировали с помощью программного обеспечения *Kaluza Flow Analysis Software 1.5a* (Beckman Coulter, США). Для учета результатов проточной цитометрии применяли тактику поэтапного гейтирования (рисунок 1) [11]. Опухолевую популяцию выделяли, основываясь на оценке бокового светорассеяния, экспрессии CD45 и других линейно-ассоциированных маркерах. В выделенной патологической популяции клеток определяли уровень экспрессии маркера CD1a (рисунок 1). Оценивали следующие параметры: MFI и коэффициент вариации (CV) опухолевой популяции; MFI и CV CD1a-позитивной популяции; MFI и CV контрольных лимфоцитов; процент позитивных

Рисунок 2

MFI CD1a-бластной популяции (А); процент CD1a-позитивных клеток (Б); выделены образцы (о), в которых была выявлена существенная разница при оценке процента позитивных клеток с помощью разных МКАТ

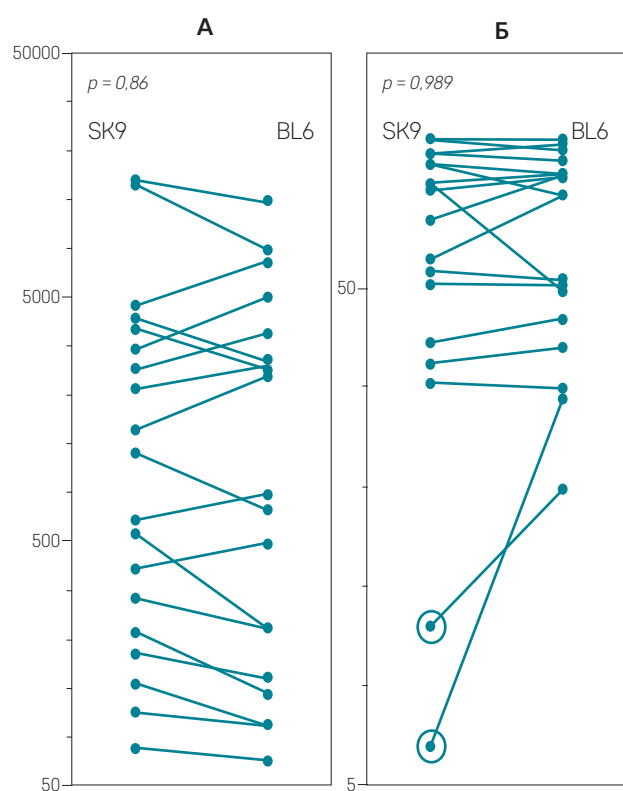
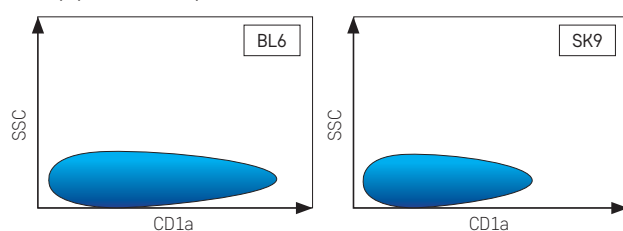


Рисунок 3

Зависимость визуализации позитивности популяции на графике от распределения клеток по экспрессии CD1a (коэффициента вариации)



клеток; относительная MFI (отношение общей MFI к MFI контрольных лимфоцитов).

Статистический анализ проводили с помощью программного пакета *Statistica 7.0*. Для сравнения количественных показателей применяли критерий Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В целом статистически значимого различия в MFI клеток опухолевой популяции при использовании антител двух разных клонов не обнаружено ($p = 0,86$, рисунок 2 а). Аналогичный результат получен при оценке процента CD1a-позитивных опухолевых клеток, исследованных с помощью антител двух разных клонов ($p = 0,989$); при этом обнаружены два образца с абсолютно разными значениями (рисунок 2 б). Анализ MFI CD1a-позитивной популяции также подтвердил, что использование разных МКАТ не влияет на достоверность результата ($p = 0,394$). Однако при оценке CV CD1a-позитивной популяции обнаружено различие в пользу антител BL6. При использовании данного антитела позитивная популяция имеет больший коэффициент вариации, поэтому лучше визуализируется на точечном графике (рисунок 3). В рамках исследования контрольных лимфоцитов оценивали MFI, CV и относительную MFI. Статистическую значимость имели различия в MFI контрольных лимфоцитов ($p = 0,04$), при этом MFI (SK9) была больше, чем MFI (BL6). Кроме того, были проанализированы CD1a-негативные образцы: обнаружены различия в MFI в пользу антитела SK9 ($p = 0,001$), в CV – в пользу BL6 ($p = 0,004$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

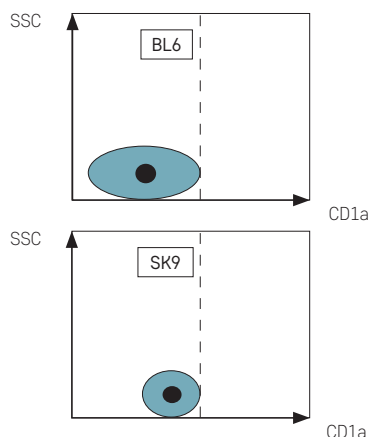
CD1a – важный прогностический фактор при Т-линейном ОЛЛ. По данным многих авторов, экспрессия CD1a на поверхности клеток опухолевого клона ассоциирована с благоприятным исходом [4, 7–9].

Стандартизация диагностического иммунофенотипирования ОЛЛ важна и необходима, особенно в формате мультицентровых исследований. Это более чем актуально для такого важного маркера, как CD1a, поскольку от результата этого исследования зависит выбор дальнейшей терапии. Применение в референсных лабораториях разных антител к CD1a может приводить к различиям в выборе тактики ведения пациентов.

В данной работе мы провели сравнение двух антител к CD1a, которые наиболее часто используют в диагностике. Оценка MFI-бластной популяции и CD1a-позитивной популяции, процентного содержания CD1a-позитивных бластных клеток не показала

Рисунок 4

Разница в распределении CD1a-негативной популяции при применении двух различных антител; пунктиром показана граница между CD1a-негативными и CD1a-положительными клетками



значимых различий при применении различных антител. Но вместе с тем мы обнаружили несколько пациентов с существенными различиями в проценте blastов, имеющих на поверхности CD1a. Кроме того, в связи с более гетерогенным распределением клеток по экспрессии CD1a при использовании антитела BL6 позитивность популяции лучше визуализируется на графике, что облегчает задачу по оценке иммунофенотипа (рисунок 3). Что касается различий в средней интенсивности флуоресценции и коэффициенте вариации для CD1a-негативных образцов, то, несмотря на это, стоит отметить, что при использовании обоих антител граница между CD1a-положительными и CD1a-негативными клетками приблизительно совпадает для обоих антител (рисунок 4). Это связано с

тем, что при использовании антитела SK9 клеточная популяция имеет MFI выше, чем при использовании антитела BL6, при этом вариация величины экспрессии меньше. За счет этих различий, независимо от используемых МКАТ, граница между положительными и негативными клетками располагается на графике примерно в одной области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ результатов иммунофенотипирования образцов костного мозга пациентов с Т-лимфобластным ОЛЛ с применением разных антител к CD1a. Несмотря на отсутствие серьезных различий в анализируемых параметрах при исследовании образцов с помощью двух различных антител, было принято решение применять антитело BL6 в связи с обнаружением спорных результатов у некоторых пациентов и лучшей визуализацией опухолевой популяции на дотплоте.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Aksenova A.S. ORCID <http://orcid.org/0000-0001-5354-7067>

Illarionova O.I. ORCID <http://orcid.org/0000-0003-2685-674X>

Litvinov D.V. ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7461-0050>

Kashpor S.A. ORCID <http://orcid.org/0000-0002-5220-7412>

Popov A.M. ORCID <http://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

1. Swerdlow S.H. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition, IARC 2008.
2. Зуева Е.Е., Куртова А.В., Русанова Е.Б. Диагностика онкогематологических заболеваний с помощью проточной цитометрии: справочник. – СПб.: СпецЛит, 2017.
3. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас (4-е изд., доп.). – Москва-Тверь: ООО «Издательство «Трида», 2016.
4. Chiaretti S., Foà R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. Hematologica 2009; 94 (2): 160–2.
5. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. Leukemia 1995; 9: 1783–86.
6. Babusikova O., Stevulova L., Fajtova M. Immunophenotyping parameters as prognostic factors in T-acute leukemia patients. Neoplasma 2009; 56 (6): 508–13.
7. Mugairi Dalal B.I., Pi S., Lee S.Y., Khare N.S., Pal J., Vakilet A., et al. Thymic Immunophenotype, and Expression of CD4 and Myeloid Antigens is Associated with Outcome in Adult Patients with T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. J Leuk 2015; 3 (1): 2–6.
8. Marks D.I., Paietta E.M., Moorman A.V., Richards S.M., Buck G., DeWald G., et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). Blood 2009; 114 (25): 5136–45.
9. Grotel van M., Meijerink J.P., van Wering E.R., Langerak A.W., Beverloo H.B., Buijs-Gladdines J.G., et al. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. Leukemia 2008; 22: 124–31.
10. Kalina T., Flores-Montero J., van der Velden V. H. J., Martin-Ayuso M., Böttcher S., Ritgen M., et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia 2012; 26: 1986–2010.
11. Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В. и др. Стандарт Российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. Онкогематология 2018; 13 (1): 56–65.