

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-219-230

Имунофенотипирование в диагностике острых лейкозов неоднозначной линейности. Результаты централизованной диагностики и практические рекомендации

И.А. Дёмина¹, Е.В. Михайлова¹, А.А. Семченкова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Ж.В. Пермикин^{2,4},
С.А. Кашпор¹, Е.А. Зеркаленкова¹, Г.А. Цаур²⁻⁴, Ю.В. Ольшанская¹, Л.Г. Фечина^{2,3},
А.И. Карачунский^{1,5}, Г.А. Новичкова¹, А.М. Попов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург

³ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

⁴ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

⁵ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Острые лейкозы неоднозначной линейности (ОЛНЛ) – редко встречающиеся виды острых лейкозов (ОЛ), характеризующиеся специфическими признаками сразу нескольких линий гемопозеза или отсутствием четких признаков линейной дифференцировки. Имунофенотипирование играет ключевую роль в диагностике и классификации ОЛНЛ. Несмотря на предлагаемые различными исследовательскими группами критерии определения ОЛНЛ, эта редкая и гетерогенная группа ОЛ остается крайне сложной для точной диагностики. В данной работе представлен краткий анализ 97 случаев ОЛНЛ у детей. Такая существенная выборка (ОЛНЛ составляет менее 1% всех ОЛ детского возраста) получена по результатам централизованной диагностики ОЛ. С учетом полученных данных сформулированы рекомендации по анализу результатов иммунофенотипирования при диагностике ОЛНЛ, а также по интеграции цитометрических, цитоморфологических и генетических данных для точной диагностики и классификации этого типа ОЛ.

Ключевые слова: острые лейкозы неопределенной линейности, проточная цитометрия, иммунофенотипирование

Дёмина И.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (1): 219–30. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-219-230

Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukemias of ambiguous lineage. The results of centralized diagnosis and practical guidelines

I.A. Demina¹, E.V. Mikhailova¹, A.A. Semchenkova¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, Zh.V. Permikin^{2,4}, S.A. Kashpor¹,
E.A. Zerkalenkova¹, G.A. Tsaur²⁻⁴, Yu.V. Olshanskaya¹, L.G. Fechina^{2,3}, A.I. Karachunskiy^{1,5}, G.A. Novichkova¹,
A.M. Popov¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg

³Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg

⁴Ural State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yekaterinburg

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Acute leukemias of ambiguous lineage (ALAL) are rare acute leukemias (AL) that exhibit specific features of more than one hematopoietic lineage or show no distinct evidence of lineage differentiation. Immunophenotyping plays a key role in the diagnosis and classification of ALAL. Despite the availability of diagnostic criteria for ALAL proposed by different expert groups, the accurate diagnosis of ALAL representing a rare and heterogeneous group of diseases remains a challenge. In this paper, we present a brief analysis of 97 pediatric ALAL cases. Such a large cohort of cases with ALAL (ALALs comprising less than 1% of all pediatric AL) was obtained as a result of the centralized diagnosis of AL. With regard to the obtained results, we have developed the guidelines for the interpretation of the results of immunophenotyping in the diagnosis of ALAL and for the integration of findings from flow cytometry, cytomorphology and genetic testing for the accurate diagnosis and classification of this group of AL.

Key words: acute leukemia of ambiguous lineage, flow cytometry, immunophenotyping

Demina I.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (1): 219–30.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-219-230

Острые лейкозы неоднозначной линейности (ОЛНЛ) – редко встречающиеся виды острых лейкозов (ОЛ), характеризующиеся сложными нестандартными сочетаниями экспрессии

на опухолевых клетках как специфических В-линейных, Т-линейных, и миелоидных антигенов, так и маркеров ранних клеток-предшественников [1, 2]. Традиционно для систематизации ОЛНЛ приме-

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 21.02.2024

Принята к печати 14.03.2024



EDN: UDPCSA

Контактная информация:

Дёмина Ирина Андреевна,
врач клинической лабораторной
диагностики лаборатории
имунофенотипирования гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: idemina@mail.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 21.02.2024

Accepted 14.03.2024

Correspondence:

Irina A. Demina,
PhD, MD in Clinical Laboratory Medicine,
Leukemia Immunophenotyping Laboratory
at the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
117997, Moscow, Russia
E-mail: idemina@mail.ru

няется терминология, сформулированная Европейской группой по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, EGIL) [3], выделяющая отдельно острый бифенотипический лейкоз (ОБфЛ; признаки разных линий гемопоэза экспрессируются одними и теми же клетками), острый билинейный лейкоз (ОБлЛ; 2 популяции опухолевых клеток с иммунофенотипом разной линейной дифференцировки) и острый недифференцированный лейкоз (ОНдЛ) [3, 4]. В 2008 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объединила ОБлЛ и ОБфЛ в одну группу [1, 5], назвав их ОЛ со смешанным фенотипом (ОЛСФ, mixed-phenotype acute leukemia, MPAL).

Когда в костном мозге при иммунофенотипировании выявляются 2 отдельные популяции опухолевых клеток (ОБлЛ), то чаще всего сомнений в диагнозе не возникает [6–9]. В ситуации же выявления 1 популяции опухолевых клеток (остальные варианты ОЛНЛ), несущей маркеры разных клеточных линий [4, 6], вопрос правильного определения варианта лейкоза с учетом всех коэкспрессирующихся молекул становится чрезвычайно важным для решения о дальнейшем выборе максимально эффективной линии терапии [10, 11].

В классификации EGIL значимость экспрессии того или иного маркера для диагностики ОБфЛ учитывается в зависимости от его специфичности и полученные условные величины просто суммируются [3]. ОБфЛ диагностируют, когда для каждой линии (миелоидной и одной из лимфоидных) набирается более 2 баллов. Такой подход имеет как свои плюсы (простота и унифицированная значимость маркеров), так и минусы (сложность разграничения между лейкозом со множественными коэкспрессиями и ОЛСФ). Около 12% В-клеточных лейкозов с коэкспрессиями миелоидных антигенов могут быть отнесены к ОБфЛ по критериям EGIL, при этом имея явно выраженный лимфоидный иммунофенотип и довольно слабые проявления миелоидных черт [12]. В то же время рекомендации ВОЗ по определению специфических критериев линейности в случае наличия только 1 популяции опухолевых клеток существенно более строгие. Такое ужесточение диагностических критериев ведет к уменьшению числа некорректного определения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) или острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) как ОЛСФ.

По данным литературы, наиболее частыми вариантами ОЛСФ являются сочетания В-лимфоидной и миелоидной (В/Миело) линий, за которыми следует сочетание Т-лимфоидной и миелоидной (Т/Миело) линий. Трехлинейные ОЛСФ и сочетание 2 лимфоидных линий (В/Т) крайне редки.

Различными исследовательскими группами в разное время предлагались разные критерии для

определения ОЛСФ и четкой дифференцировки данного варианта ОЛ от ОЛЛ с коэкспрессией миелоидных и ОМЛ с коэкспрессией лимфоидных антигенов [3, 5, 11, 13–16]. При этом последние 15 лет все такие системы критериев принципиально строятся вокруг предложенной авторами классификации ВОЗ версии 2008 г. [5], уточняя и дополняя последнюю [4, 13–15, 17]. Кроме того, наиболее современные классификации ОЛНЛ подразумевают также учет цитогенетических и молекулярно-генетических данных [15, 17]. В итоге корректная диагностика ОЛНЛ остается достаточно сложной задачей, требующей не только корректной интерпретации результатов иммунофенотипирования, но и комплексной оценки всех лабораторных и клинических данных.

В данной работе представлены результаты централизованной диагностики ОЛНЛ у детей в Российской Федерации и практические рекомендации по иммунофенотипированию этой редкой формы ОЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 2016 по 2022 г. в лабораториях ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва) и ГАУЗ СО ОДКБ (Екатеринбург) была проведена инициальная диагностика 9851 ребенку в возрасте от рождения до 18 лет с первично выявленным ОЛ. Иммунофенотипирование опухолевых клеток в костном мозге производили согласно стандарту российско-белорусской кооперативной группы по диагностике ОЛ у детей [18]. Цитогенетические и молекулярно-генетические исследования проводились в соответствии с рекомендациями Организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среди обследованных детей ($n = 9851$) в 97 (0,98%) случаях были диагностированы ОЛНЛ по критериям классификации ВОЗ 2016 г. [13]. Среди этих 97 пациентов (58 мальчиков и 39 девочек, медиана возраста 8 лет) было одинаковое количество случаев с 1 и 2 опухолевыми популяциями (по 48 пациентов), а у 1 ребенка наблюдалось 3 опухолевые популяции [20]. Было выявлено 7 основных вариантов комбинаций маркеров (*рисунок 1*). Чаще всего ($n = 47$, 48,5%) встречался ОЛСФ типа В/Миело как с преобладающей В-линейной, так и с преобладающей миелоидной составляющей. Вторым по частоте вариантом являлся ОЛСФ варианта Т/Миело ($n = 29$, 29,9%). Также среди диагностированных ОЛСФ были отмечены крайне редкие варианты иммунофенотипов, такие как лейкозы со смешанным лимфоидным

иммунофенотипом (В/Т; $n = 3$, 3,1%), сочетание В-линейной и недифференцированной опухолевых популяций ($n = 1$, 1,0%), а также варианты с 3 отдельными опухолевыми популяциями, которые относились к 3 разным клеточным линиям ($n = 1$, 1,0%). Кроме того, были выявлены 3 (3,1%) случая ОНДЛ, в которых опухолевые клетки не экспрессировали никаких линейно-специфических антигенов, а только ранние гемопоэтические маркеры. Случаи неклассифицируемого ОЛ (ОНклЛ), когда комбинации экспрессирующихся на клетках маркеров не позволяют отнести их к конкретной клеточной линии или ОЛСФ, но при этом также отсутствует экспрессия антигенов гемопоэтических предшественников, составили 13,4% от общего числа выявленных ОЛНЛ.

Среди диагностированного нами наиболее частого варианта ОЛСФ В/Миело более чем в 3/4 случаев имелись 2 относительно отдельные популяции, а в остальных – 1 опухолевая популяция несла маркеры и В-лимфоидной, и миелоидной линии (рисунки 2). Для Т/Миело ОЛСФ чаще встречались случаи с 1 популяцией, из 3 пациентов с вариантом В/Т 2 детей имели 1 популяцию и 1 ребенок – 2 популяции. Все недифференцированные и неклассифицируемые лейкозы имели только 1 опухолевую популяцию (рисунки 2).

Типичные примеры распределения клеточных популяций при ОЛСФ типов В/Миело и Т/Миело представлены на рисунках 3, 4. Несмотря на то, что показанные маркеры не являются строго линейно-специфическими (CD7, CD33), а некоторые входят в классификационную систему ВОЗ с определенными ограничениями (CD19), чаще всего именно их сочетания позволяют заподозрить ОЛСФ по более или менее типичному расположению лейкоцитарных бластов на точечных графиках. К таким «типичным» распределениям относится прежде всего наличие 2 отдельных или связанных между собой опухолевых популяций, экспрессирующих разные линейные антигены, либо, наоборот, 1 опухолевая популяция с частичной экспрессией линейно-специфических маркеров разными клетками. Относительно распространенной является и одновременная экспрессия маркеров разных линий всеми опухолевыми клетками, но чаще всего такой тип распределения характерен для относительно ранних и ограниченно специфических антигенов, поэтому является лишь своего рода «индикатором» возможной смешанно-линейной природы лейкоза и требует уточнения при помощи более точных критериев.

Цитогенетические и молекулярно-генетические данные были доступны у 89 пациентов. Распределение результатов генетических вариантов ОЛНЛ показано на рисунке 5. Наиболее часто в исследуемой группе встречались различные перестройки

гена *KMT2A* ($n = 21$, 23,6%) и $t(9;22)/BCR::ABL1$ ($n = 8$, 9,0%), в то время как на долю других рекуррентных перестроек приходилось существенно меньшее количество случаев. Приблизительно в половине случаев рекуррентных хромосомных аберраций выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имунофенотипирование играет ключевую роль в верификации линейной принадлежности опухолевых клеток при диагностике ОЛ [15, 18, 21]. Именно определенный при помощи проточной цитометрии антигенный профиль лейкоцитарных бластов позволяет отнести опухоль к лимфоидной или миело-

Рисунок 1
Распределение вариантов ОЛНЛ в исследуемой группе ($n = 97$)

Figure 1
The distribution of subtypes of acute leukemia of ambiguous lineage (ALAL) in the group of interest ($n = 97$)
AUL – acute undifferentiated leukemia; MPAL – mixed-phenotype acute leukemias

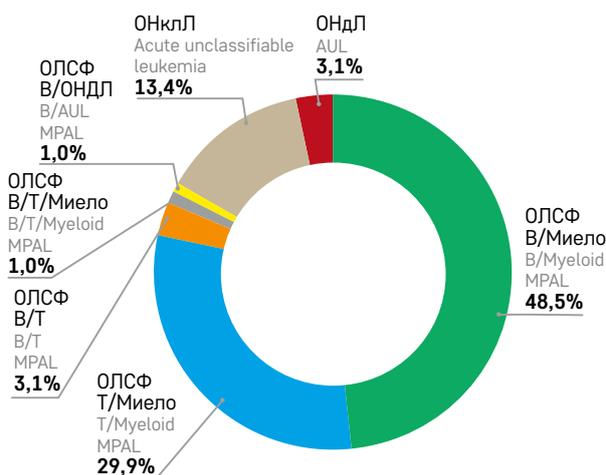
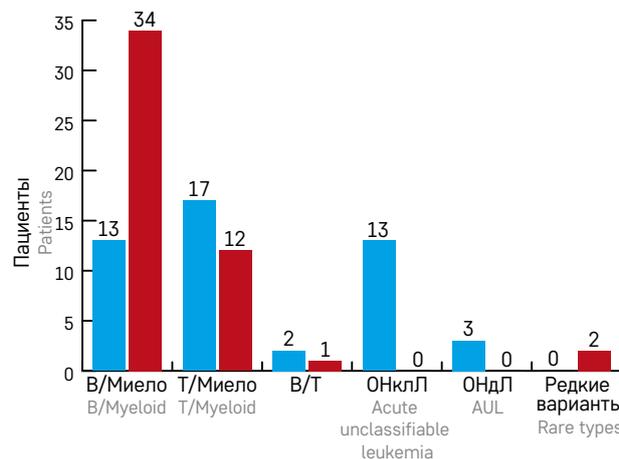


Рисунок 2
Распределение встречаемости вариантов ОЛНЛ с 1 (голубой цвет) или 2 (красный цвет) опухолевыми популяциями ($n = 97$)

Figure 2
The distribution of ALAL subtypes with one (blue color) and two (red color) malignant (blast) populations ($n = 97$)



идной линии. Одновременно с этим при отсутствии четких признаков линейности или наличия признаков дифференцировки сразу в нескольких направлениях только иммунофенотипирование позволяет диагностировать различные варианты ОЛНЛ [1, 4]. Отсутствие четких морфологических признаков и большое разнообразие цитогенетических и молекулярно-биологических аномалий не позволяют достоверно выявлять такие типы ОЛ другими методами. При этом диагностика всех вариантов ОЛНЛ является достаточно сложной задачей, требующей как корректно подобранной панели антител и правильно настроенного цитометра, так и наличия боль-

шого опыта у специалиста, проводящего анализ и интерпретацию цитометрических данных. Учитывая исключительную редкость как ОЛНЛ в целом (0,98% среди всех ОЛ у детей в нашем исследовании), так и отдельных вариантов ОЛНЛ, такие пациенты должны быть обследованы исключительно в рамках централизованного иммунофенотипирования в референсных лабораториях, предусмотренных в рамках крупных исследовательских групп. Кроме того, для окончательной классификации ОЛНЛ обязательно выполнение централизованного цитоморфологического и генетического анализа костного мозга.

Рисунок 3

Типичные примеры распределения клеточных популяций при ОЛСФ типов В/Миело (верхний ряд) и Т/Миело (нижний ряд) при анализе экспрессии ранних и наиболее чувствительных антигенов всех 3 основных направлений дифференцировки (CD7, CD19 и CD33)

А – пример коэкспрессии антигенов на 1 опухолевой популяции; Б – пример частичной гетерогенной экспрессии антигенов 1 опухолевой популяцией; В – пример определения 2 отдельных опухолевых популяций; Г – пример не полностью отделенных друг от друга опухолевых популяций, соединенных «перемычкой» из клеток с промежуточной экспрессией антигенов

Figure 3

Characteristic examples of the distribution of cell populations in B/Myeloid MPAL (upper row) and T/Myeloid MPAL (lower row) seen when analyzing expression patterns of the early and most sensitive antigens of all three main lineages of differentiation (CD7, CD19 and CD33)

A – an example of antigen co-expression on a single blast population; B – an example of partial heterogeneous expression of a single blast population; В – an example of recognizing two distinct blast populations; Г – an example of blast cell populations that are not completely separate from each other; they are joined by a “bridge” of cells with intermediate antigen expression

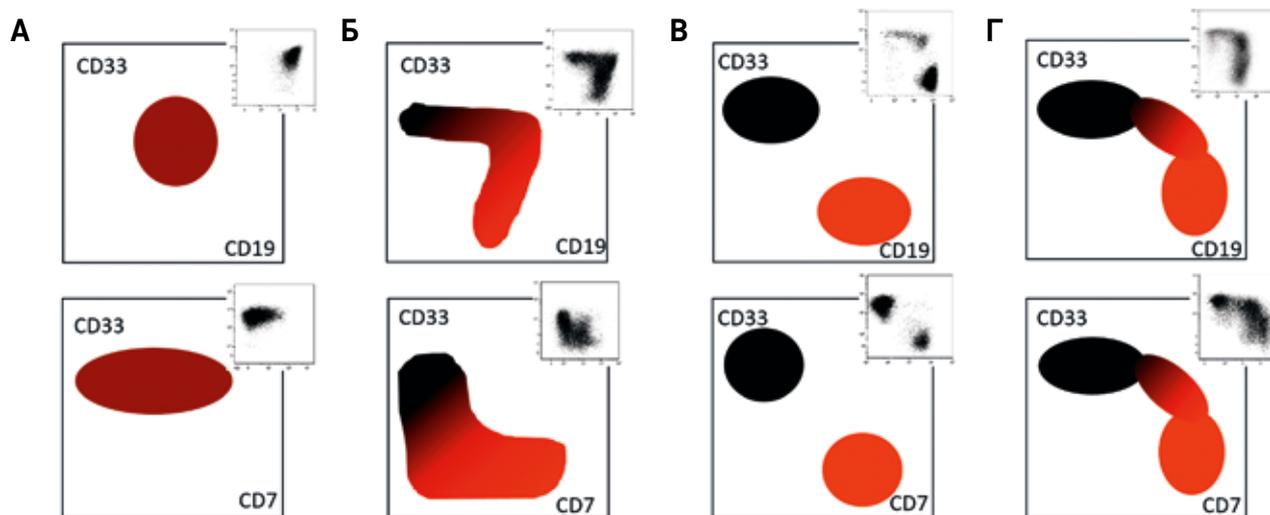


Рисунок 4

Типичные примеры распределения клеточных популяций при ОЛСФ типов В/Миело и Т/Миело при анализе линейно-специфичных внутриклеточных антигенов

Слева направо: пример определения 2 отдельных опухолевых популяций, пример гомогенной коэкспрессии антигенов на 1 опухолевой популяции, примеры частичной гетерогенной экспрессии антигенов 1 опухолевой популяцией

Figure 4

Characteristic examples of the distribution of cell populations in B/Myeloid MPAL and T/Myeloid MPAL seen when analyzing lineage specific intracellular antigens

From left to right: an example of recognizing two distinct blast populations; an example of homogeneous antigen co-expression in one blast population; examples of partial heterogeneous expression of antigens in one blast population

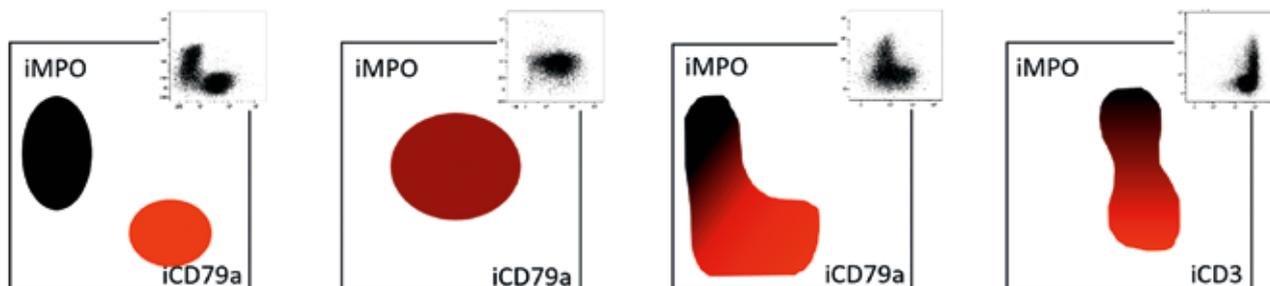
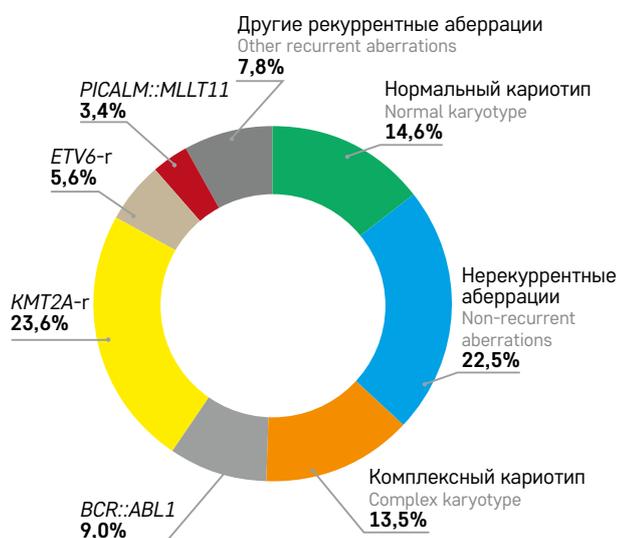


Рисунок 5
Распределение генетических aberrаций при ОЛНЛ в исследуемой группе ($n = 89$)

Figure 5
The distribution of genetic aberrations in ALAL in the group of interest ($n = 89$)



В проведенном нами исследовании ожидаемо большинство пациентов с ОЛНЛ имели ОЛСФ варианта В/Миело (48,5%), при этом чаще всего лейкоэмическая популяция в костном мозге была представлена 2 относительно отдельными компонентами, а иногда эти 2 опухолевые субпопуляции были «соединены» между собой, указывая на то, что практически все варианты ОЛСФ представляют собой единую опухоль вне зависимости от того, насколько различный иммунофенотип имеют лимфоидный и миелоидный компоненты. Для второго по частоте встречаемости варианта ОЛНЛ – ОЛСФ варианта Т/Миело – наоборот, было более характерно наличие только 1 опухолевой популяции с иммунофенотипическими признаками обеих линий, однако случаи с 2 лейкоэмическими популяциями встречались ненамного реже. В целом среди всех ОЛСФ в данном исследовании ($n = 81$) 2 опухолевые популяции и более встречались существенно чаще, чем 1 ($n = 49$ и $n = 32$ соответственно). Полученные данные о частоте встречаемости различных вариантов ОЛНЛ лишь частично согласуются с результатами других крупных исследований, которые, в свою очередь, плохо согласуются и между собой [10, 11, 22, 23]. Основных причин подобных расхождений две. Во-первых, ОЛНЛ является крайне редким и очень гетерогенным типом ОЛ, поэтому в разных публикациях в исследуемые когорты попадают очень разные пациенты. Во-вторых, сложность диагностики ОЛНЛ и возможность крайне неоднозначной интерпретации диагностических критериев также влияет на формирование исследуемых групп в разных работах.

В настоящее время в самых современных версиях 2 основных классификаций (ВОЗ [15] и ИСС [17]) в отдельные группы выделены ОЛСФ с определенными генетическими aberrациями (таблица 1). Необходимо отметить, что в нашем исследовании всего около 1/3 всех пациентов с ОЛНЛ могли быть отнесены к какой-либо из предложенных классификационных категорий ($n = 29$, 32,5% всех пациентов с известными генетическими данными), остальные же могли быть классифицированы только иммунофенотипически.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Так как иммунофенотипирование играет ведущую роль в диагностике ОЛНЛ, мы считаем важным указать на некоторые особенности диагностических алгоритмов, необходимых для правильной диагностики этой крайне редкой категории ОЛ. Ключевым фактором правильной интерпретации получаемых данных об экспрессии тех или иных наборов маркеров является четкое следование классификационным требованиям.

Для диагностики ОЛСФ мы рекомендуем использовать алгоритм, предложенный в классификации ВОЗ 2008 г. [5] и модифицированный в классификации ВОЗ 2016 г. [13], с небольшими изменениями нашей группы (таблица 2) [18]. Уточнения анализа цитометрических данных, предложенные обновленной группой ВОЗ в 2022 г. [15], нам кажутся сложными для гармонизации интерпретации данных, поэтому мы не рекомендуем их применять в буквальном виде в настоящее время. ОЛСФ диагностируют в тех случаях, когда бластные клетки экспрессируют одновременно специфические маркеры миелоидной и одной из лимфоидных линий (бифенотипический вариант, таблица 2 с модификациями из [5]), либо определяются 2 опухолевые популяции с разной линейной принадлежностью (билинейный вариант) [13]. Учитывая генетическую и клональную схожесть отдельных частей опухолевой популяции при билинейной разновидности ОЛСФ [9, 20, 22], предпочтительно не разграничивать билинейный и бифенотипический варианты, а в обоих случаях диагностировать ОЛСФ, используя для этого лишь разные подходы: определение экспрессии специфических маркеров (таблица 2) или 2 отдельных популяций опухолевых клеток соответственно [13].

В случае обнаружения 2 отдельных популяций опухолевых клеток с разной линейной принадлежностью сложностей с установлением ОЛСФ теоретически возникать не должно. Тем не менее могут существовать 2 группы сложностей в диагностике такого ОЛСФ.

Первая – сложность в обнаружении «второй» лейкоэмической популяции при очевидной «основной».

Таблица 1
Варианты ОЛСФ в классификациях ВОЗ и ICC 2022 г. [15, 17]

Table 1
MPAL according to the WHO classification and the ICC adopted in 2022 [15, 17].

ВОЗ-2022 2022 WHO classification	ICC-2022 2022 ICC
ОЛСФ с определенными генетическими перестройками MPAL with defining genetic alterations	
ОЛСФ с <i>BCR::ABL1</i> MPAL with <i>BCR::ABL1</i>	ОЛСФ с <i>BCR::ABL1</i> MPAL with <i>BCR::ABL1</i>
ОЛСФ с <i>KMT2A</i> -г MPAL with <i>KMT2A</i> -rearrangement	ОЛСФ с <i>KMT2A</i> -г MPAL with <i>KMT2A</i> -rearrangement
ОЛСФ с <i>ZNF384</i> -г MPAL with <i>ZNF384</i> -rearrangement	ОЛСФ с <i>ZNF384</i> -г MPAL with <i>ZNF384</i> -rearrangement
ОЛСФ с <i>BCL11B</i> -г MPAL with <i>BCL11B</i> -rearrangement	ОЛСФ с активацией <i>BCL11B</i> MPAL with <i>BCL11B</i> activation
ОЛСФ, определенные иммунофенотипически MPAL defined immunophenotypically	
ОЛСФ В/Миело В/Myeloid MPAL	ОЛСФ В/Миело В/Myeloid MPAL
ОЛСФ Т/Миело Т/Myeloid MPAL	ОЛСФ Т/Миело Т/Myeloid MPAL
ОЛСФ, редкие варианты MPAL, rare types	ОЛСФ В/Т/Миело В/Т/Myeloid MPAL
	ОЛСФ В/Т В/Т MPAL

Таблица 2
Специфические признаки разных линий гемопоэза, используемые для диагностики ОЛСФ

Table 2
Specific features of different hematopoietic lineages used in the diagnosis of MPAL

Линия Lineage	Критерий Criterion
В-линия B lineage	Яркая экспрессия CD19 и как минимум одного из следующих антигенов: CD10, CD22, iCD79a или слабая экспрессия CD19 и яркая экспрессия как минимум двух из следующих антигенов: CD10, CD22, iCD79a Strong expression of CD19 and at least one of the following antigens: CD10, CD22, iCD79a or weak expression of CD19 and strong expression of at least two of the following antigens: CD10, CD22, iCD79a
Т-линия T lineage	Цитоплазматическая экспрессия CD3, определенная методом проточной цитометрии с использованием антител к ϵ -цепи рецептора Cytoplasmic CD3 expression as determined by flow cytometry using an anti-CD3 ϵ -chain antibody
Миелоидная линия Myeloid lineage	МПО, определенная любым методом, или не менее двух моноцитарных антигенов (CD11c, CD64, CD14, лизоцим) Myeloperoxidase expression assessed by any technique or expression of at least two monocytic antigens (CD11c, CD64, CD14, lysozyme)

Примечание. i – внутриклеточный антиген.
Note. i, an intracellular antigen

Ключевых моментов в решении этой проблемы несколько.

- При обзорном иммунофенотипировании костного мозга необходимо начинать выделение опухолевой популяции по маркеру CD45 [18]. Это позволяет избежать потери опухолевых клеток, которая может произойти при гейтировании сразу по какому-либо линейному маркеру, поскольку в этом случае в дальнейший анализ могут не попасть опухолевые клетки другой линейной направленности.

- В 1 комбинацию антител для обзорного (первичного) иммунофенотипирования должны входить ранние и наиболее чувствительные антигены всех 3 основных направлений дифференцировки (например, CD7, CD19 и CD33), что позволяет оценить распределение клеток на точечных графиках именно по экспрессии антигенов разных линий. В данном контексте не имеет значения то, что эти антигены не являются строго линейно-специфическими, а могут коэкспрессироваться на ОЛ другой линии (CD7 и CD19 на ОМЛ, а CD33 – на ОЛЛ). Ключевой задачей становится анализ распределения клеток, зачастую являющегося достаточно типичным для ОЛСФ (рисунки 3, 4), позволяющий идентифицировать 2 опухолевые популяции вне зависимости от того, расположены они отдельно друг от друга на графике или соединены между собой.

- Чаще всего лейкоэмические популяции разных линий не полностью отделены друг от друга на точечных графиках, а соединены своего рода «перемычкой» из клеток, имеющих промежуточный уровень экспрессии линейных антигенов. Эти клетки могут быть видны при обзорном иммунофенотипировании на стандартных графиках, отображающих экспрессию одного из лимфоидных маркеров и значение параметра бокового светорассеяния (SSC) по снижению уровня экспрессии и одновременному повышению SSC, что характерно для «миелоидного» компонента опухоли (рисунок 6). Даже при очень малом количестве такие клетки достаточно заметны и являются косвенным индикатором возможного ОЛСФ, требующим обратить внимание на экспрессию антигенов разных линий. Так как существенное большинство ОЛСФ представлено именно наличием 2 опухолевых популяций (рисунок 2), такой подход является достаточно универсальным для диагностики ОЛСФ в целом.

- Выявленные при исследовании костного мозга «подозрительные» популяции клеток (любой линии) на фоне основной лейкоэмической составляющей должны быть исследованы с применением алгоритмов оценки минимальной остаточной болезни, так как именно такие подходы максимально эффективны в дифференцировании нормальных и опухолевых клеток. В случае отсутствия явных лейкоз-ассоциированных аберраций антигенного профиля, но при наличии косвенных признаков ОЛСФ клетки могут быть выделены в виде чистой популяции при помощи проточной сортировки для дальнейших генетических исследований, позволяющих доказать их опухолевую природу [24, 25].

Вторая группа сложностей при диагностике ОЛСФ с 2 лейкоэмическими компонентами – сложности в анализе, интерпретации и описании иммунофенотипа выявленных субпопуляций бластов. Наша группа рекомендует следующие особенности

алгоритма анализа данных при таком варианте ОЛСФ.

- Следует учитывать, что для билинейного варианта ОЛСФ не должны применяться критерии, указанные в *таблице 2* [13], поскольку они разработаны для оценки линейной принадлежности опухолевых клеток с максимальной специфичностью, поэтому для определения направления дифференцировки каждой отдельной опухолевой популяции являются излишне строгими. Для этого достаточно выполнение стандартных критериев определения доминирующей линии при иммунофенотипировании ОЛ [18, 21].

- В случае, если популяции имеют между собой своего рода «перемычку» из клеток, имеющих разный уровень экспрессии линейных маркеров, сложность

может заключаться в определении правильного места, где можно эти популяции разделить. Для уточнения места проведения раздела можно использовать вспомогательные варианты отображения клеток на точечных графиках, такие как распределение по плотности и построение контурных изображений (*рисунок 7*).

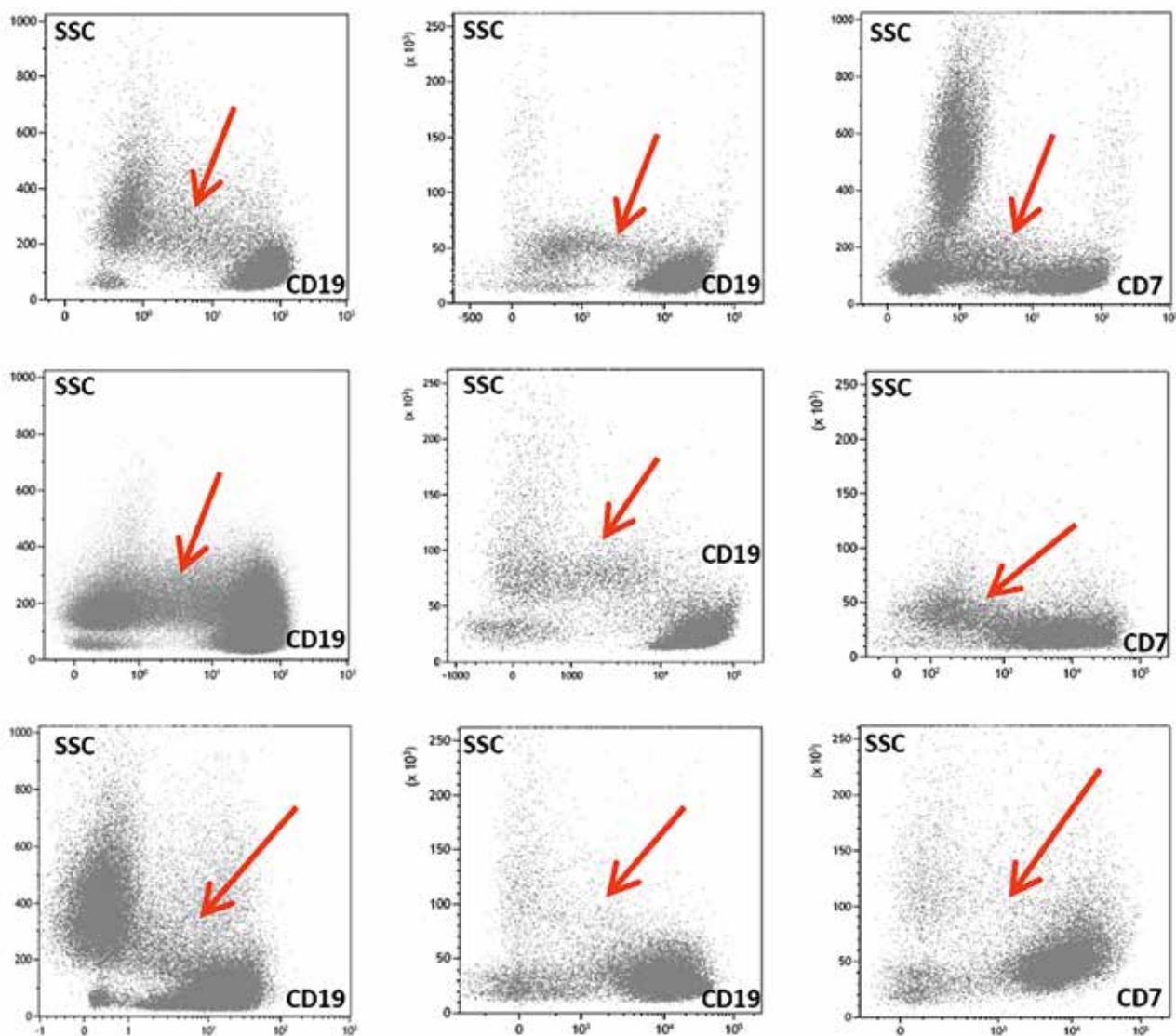
- При наличии в костном мозге нескольких четко идентифицируемых методом проточной цитометрии популяций опухолевых клеток их раздельное описание приемлемо далеко не во всех случаях. Так, при ОМЛ вследствие «созревания» лейкоэмических бластов нередко может наблюдаться несколько субпопуляций опухолевых клеток, различающихся иммунофенотипически и цитоморфологически. Однако раздельное описание опухолевого пула в данном

Рисунок 6

Примеры точечных графиков экспрессии ранних лимфоидных антигенов (CD19 – левый и средний столбцы, CD7 – правый столбец) и значения параметра SSC клеток костного мозга при диагностике ОЛСФ. «Промежуточные» между лимфоидной и миелоидной клеточные популяции указаны красными стрелками

Figure 6

Examples of dot plots showing the expression of early lymphoid antigens (CD19: the left and middle columns; CD7: the right column) and side scatter (SSC) of bone marrow cells in the diagnosis of MPAL. Cell populations “intermediate” between lymphoid and myeloid lineages are shown by red arrows



случае не приведет к изменению итогового заключения о миелоидной природе опухолевых клеток, но может ввести в заблуждение лечащего врача. Раздельное описание нескольких популяций бластов должно выполняться только в том случае, если указанные популяции относятся к разным линиям гемопоэза или если как минимум одна из них соответствует ОЛСФ.

- Иммунофенотип каждой части опухолевой популяции должен быть проанализирован отдельно. Для этого изменяется стандартный алгоритм проведения иммунофенотипирования, и обязательно выполняется анализ в соответствии не с одним, а с двумя возможными направлениями дифференцировки опухолевых клеток.

- В том случае, если меньшая популяция составляет 10% и более всех ядросодержащих клеток (ЯСК) костного мозга, иммунофенотип обеих субпопуляций описывается одинаково подробно. Если доля меньшей части лейкоэмического пула составляет более 5%, но не превышает 10% – подробно описывается антигенный профиль большей популяции, но после основной части заключения делается уточ-

нение, что выявляется минорная популяция клеток, возможно, опухолевых, с указанием их процента от ЯСК, суммарного иммунофенотипа и при возможности линейной принадлежности. В том случае, если меньшая опухолевая популяция составляет менее 5% всех ЯСК, она не упоминается в заключении, но предпочтительно ее указывать в рабочем листе лаборатории для последующего анализа в случае изменения иммунофенотипа ОЛ в процессе лечения.

При бифенотипическом варианте ОЛСФ, т. е. наличии только 1 опухолевой популяции, сочетающей иммунофенотипические признаки разных линий дифференцировки, диагностика целиком зависит от выполнения классификационных критериев (таблица 2). Единственным существенным требованием кроме точного выполнения критериев диагностики является достаточное количество маркеров в панели антител, позволяющее эти критерии выполнить, а также адекватный подбор антител и флуорохромоов для классифицирующих антигенов, корректные пробоподготовка и настройка проточного цитометра во избежание ложной оценки экспрессии данных маркеров. Суще-

Рисунок 7

Примеры визуализации разделения опухолевых популяций на точечных графиках (левый столбец), графиках плотности (средний столбец) и контурных графиках (правый столбец) при ОЛСФ вариантов В/Миело (верхний ряд) и Т/Миело (нижний ряд)

Figure 7
Examples of visual delineation of different blast cell populations in dot plots (left column), color density plots (middle column) and contour plots (right column) in B/Myeloid MPAL (upper row) and T/Myeloid MPAL (lower row)

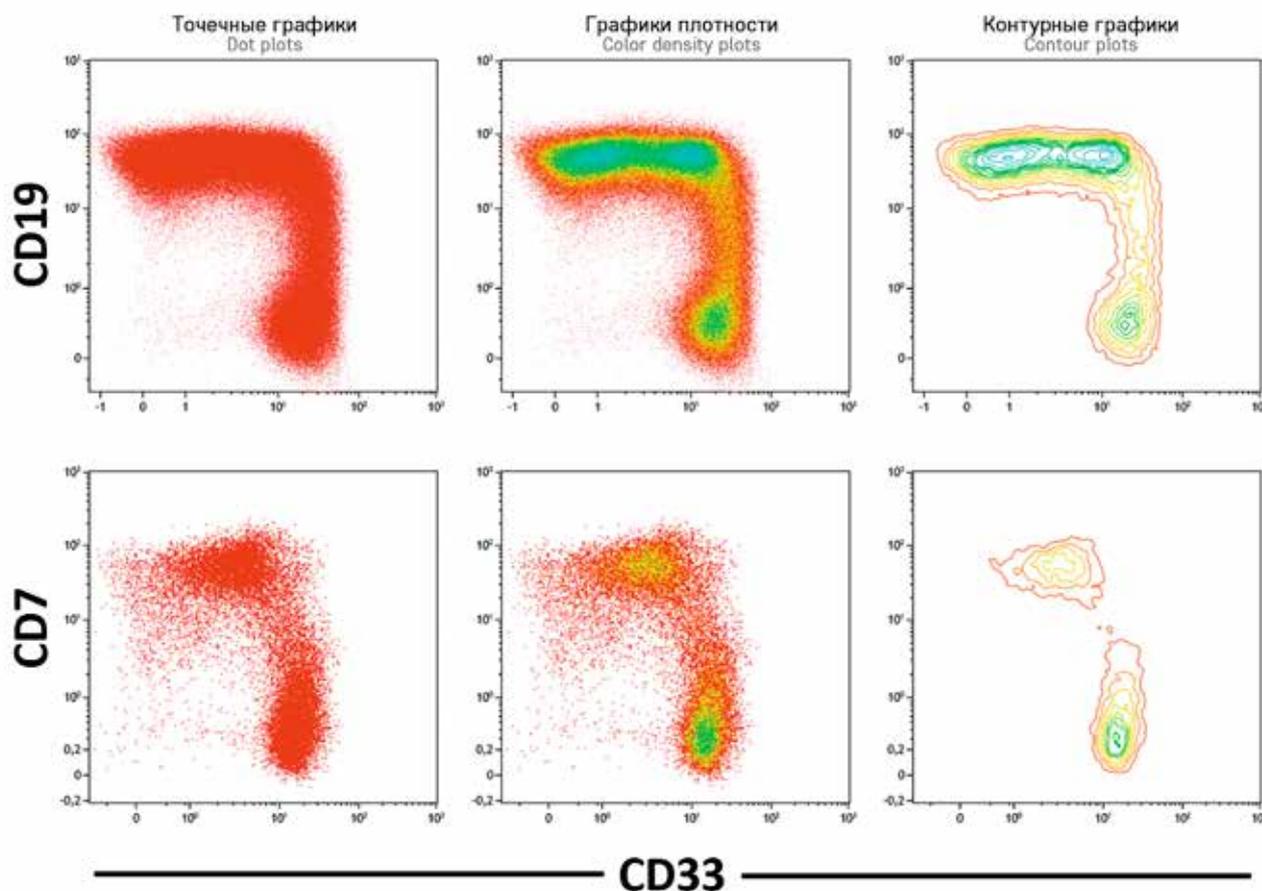
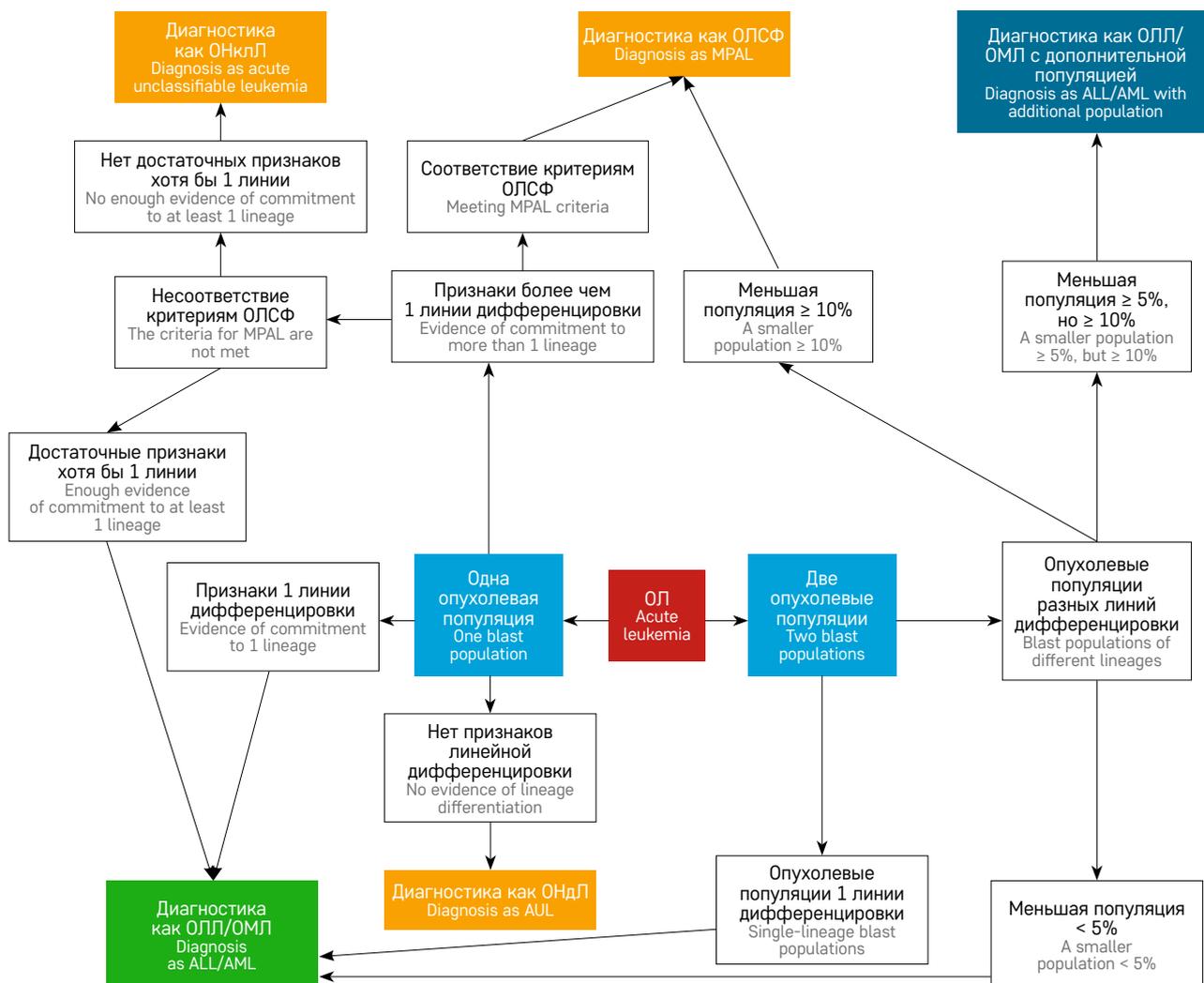


Рисунок 8

Алгоритм анализа цитометрических данных для дифференциальной диагностики ОЛЛ/ОМЛ и различных вариантов ОЛНЛ

Figure 8

An algorithm of flow cytometry data analysis for the differential diagnosis between acute lymphoblastic leukemia (ALL)/acute myeloid leukemia (AML) and various types of ALAL



ственным нюансом, упомянутым в классификации ВОЗ 2016 г., является также возможное иммунофенотипическое определение миелопероксидазы (МПО) у пациентов с относительно «типичным» В-линейным ОЛЛ [13, 26–29]. Такие случаи должны анализироваться отдельно, с дополнительным вниманием к результатам цитохимического и генетического исследований.

Кроме ОЛСФ существуют еще 2 достаточно редкие категории ОЛНЛ, требующие тем не менее существенного внимания при диагностике. В случае отсутствия экспрессии линейно-специфических антигенов и яркой тотальной экспрессии маркеров клеток-предшественников диагностируется ОНдЛ. От ОНдЛ необходимо отличать ОЛ, не имеющий определенных признаков линейной дифференцировки, но и не экспрессирующий маркеры ранних гемопоэтических предшественников (CD34, CD99, CD117, TdT

и др.). В таких случаях могут гетерогенно экспрессироваться антигены разных линий гемопоэза, но (ключевой нюанс!) не будут выполнены критерии определения ни одной линии, разработанные для иммунофенотипирования ОЛ. Мы рекомендуем определять такой лейкоз как ОНклЛ, поскольку он не может быть отнесен к какой-либо классификационной категории по имеющимся признакам. Этот вариант ОЛ примерно соответствует «ОЛНЛ, не определенному иным способом» из классификации ВОЗ, однако рекомендуемый нами термин представляется более удачным и точно описывающим иммунофенотип ОЛ. Среди всех ОЛНЛ ОНклЛ является третьим по частоте встречаемости в нашей популяции (13,4% пациентов), поэтому его диагностика также заслуживает внимания.

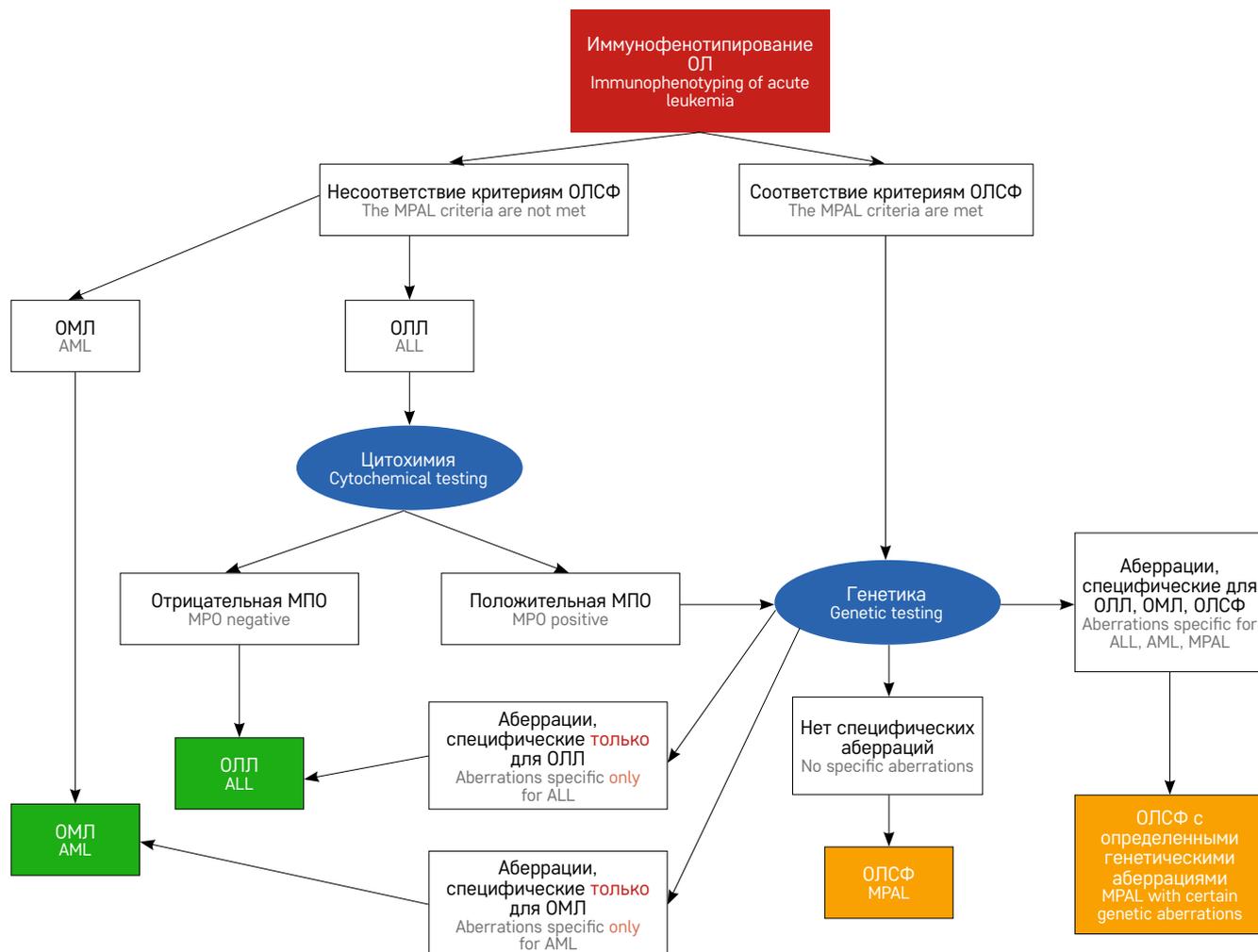
Суммарно алгоритм анализа цитометрических данных для дифференциальной диагностики

Рисунок 9

Суммарный алгоритм интеграции иммунофенотипирования, цитохимии, цитогенетики и молекулярной генетики для диагностики ОЛСФ

Figure 9

A summary algorithm for integrating immunophenotyping, cytochemical, cytogenetic, and molecular genetic testing in establishing the diagnosis of MPAL
MPO – myeloperoxidase



ОЛЛ/ОМЛ и различных вариантов ОЛНЛ представлен на *рисунке 8*.

Необходимо отметить, что полноценная диагностика ОЛСФ включает не только иммунофенотипирование, но и анализ результатов цитоморфологического (прежде всего цитохимического) и цитогенетического/молекулярно-генетического исследований. Цитохимическое определение активности МПО является безусловным признаком миелоидной дифференцировки при диагностике ОЛСФ [5], следовательно, результаты цитохимического исследования должны обязательно учитываться при диагностике ОЛЛ. Наличие определенных генетических перестроек позволяет более точно диагностировать ОЛСФ (*таблица 1*). Кроме того, в классификации ВОЗ 2016 г. указано, что даже при соответствии иммунофенотипа ОЛ критериям ОЛСФ при выявлении генетических перестроек, харак-

терных только для ОМЛ или ОЛЛ, и относящих эти ОЛ в какую-либо классификационную категорию внутри ОМЛ или ОЛЛ (например, *RUNX1::RUNX1T1* или *ETV6::RUNX1* соответственно), такие пациенты не могут быть диагностированы как ОЛСФ [13]. Суммарный алгоритм интеграции иммунофенотипирования, цитохимии, цитогенетики и молекулярной генетики для диагностики ОЛСФ представлен на *рисунке 9*.

В заключении по результатам иммунофенотипирования ОЛСФ должно быть указано, что иммунофенотип опухолевой популяции соответствует ОЛСФ, или МРАЛ (более распространенное сокращение), с указанием конкретного варианта (например, В/Миело или др.) либо ОНкЛЛ, либо ОНДЛ. Алгоритм описания ОЛСФ с 2 опухолевыми популяциями детально расписан выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ОЛНЛ являются редкой и крайне гетерогенной группой ОЛ, составляющей менее 1% всех случаев ОЛ у детей. При этом как варианты ОЛНЛ, так и выявляемые генетические aberrации настолько разнообразны, что корректная диагностика ОЛНЛ становится достаточно сложной задачей. Представленные в данной работе диагностические рекомендации, основанные на опыте централизованного иммунофенотипирования и генетической диагностики ОЛ, позволяют проводить эффективную и надежную диагностику ОЛНЛ у пациентов любого возраста в рамках как многоцентровых исследований, так и отдельных лабораторий.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Demina I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4317-2094>
Mikhailova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3450-0498>
Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>
Kashpor S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5220-7412>
Zerkalenkova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9634-5828>
Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>
Fechina L.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1885-3912>
Karachunskiy A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9300-198X>
Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>
Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

- Borowitz M.J. Mixed phenotype acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; 86 (3): 152–3.
- Bene M.C., Porwit A. Acute leukemias of ambiguous lineage. *Semin Diagn Pathol* 2012; 29 (1): 12–8.
- Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9 (10): 1783–6.
- Bene M.C. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! *Haematologica* 2009; 94 (7): 891–3.
- Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114 (5): 937–51.
- Porwit A., Bene M.C. Acute leukemias of ambiguous origin. *Am J Clin Pathol* 2015; 144 (3): 361–76.
- Porwit A., Bene M.C. Multiparameter flow cytometry applications in the diagnosis of mixed phenotype acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96 (3): 183–94.
- Charles N.J., Boyer D.F. Mixed-Phenotype Acute Leukemia: Diagnostic Criteria and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141 (11): 1462–8.
- Kotrova M., Musilova A., Stuchly J., Fiser K., Starkova J., Mejstrikova E., et al. Distinct bilineal leukemia immunophenotypes are not genetically determined. *Blood* 2016; 128 (18): 2263–6.
- Hrusak O., de Haas V., Stancikova J., Vkrmanova B., Janotova I., Mejstrikova E., et al. International cooperative study identifies treatment strategy in childhood ambiguous lineage leukemia. *Blood* 2018; 132 (3): 264–76.
- Matutes E., Pickl W.F., Van't Veer M., Morilla R., Swansbury J., Strobl H., et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* 2011; 117 (11): 3163–71.
- Seegmiller A.C., Kroft S.H., Karandikar N.J., McKenna R.W. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 132 (6): 940–9.
- Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391–405.
- Weinberg O.K., Arber D.A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia* 2010; 24 (11): 1844–51.
- Khoury J.D., Solary E., Abba O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J.F., et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36 (7): 1703–19.
- Mejstrikova E., Volejnikova J., Fronkova E., Zdrahalova K., Kalina T., Sterba J., et al. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica* 2010; 95 (6): 928–35.
- Weinberg O.K., Arber D.A., Dohner H., Mullighan C.G., Orgel E., Porwit A., et al. The International Consensus Classification of acute leukemias of ambiguous lineage. *Blood* 2023; 141 (18): 2275–7.
- Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Дёмина И.А., Михайлова Е.В., Семченкова А.А. и др. Диагностическое иммунофенотипирование острых лейкозов. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов

- у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (1): 165–77. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-165-177 [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Movchan L.V., Demina I.A., Mikhailova E.V., Semchenkova A.A., et al. Flow cytometry in acute leukemia diagnostics. Guidelines of Russian-Belarusian multicenter group for pediatric leukemia studies. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (1): 165–77. (In Russ.)].
19. Цаур Г.А., Ольшанская Ю.В., Обухова Т.Н., Судариков А.Б., Лазарева О.В., Гиндина Т.Л. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика онкогематологических заболеваний: позиция Организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии. *Гематология и трансфузиология* 2023; 68 (1): 129–43. DOI: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-129-143 [Tsaur G.A., Olshanskaya Yu.V., Obukhova T.N., Sudarikov A.B., Lazareva O.V., Gindina T.L. Cytogenetic and molecular genetic diagnostics in oncohematological disorders: a position paper of the Organization of Molecular Geneticists in Oncology and Oncohematology. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2023; 68 (1): 129–43. (In Russ.)].
20. Demina I., Zerkalenkova E., Semchenkova A., Volchkov E., Boychenko E., Prudnikova M., et al. Rare case of pediatric trilineal mixed-phenotype acute leukemia with t(11;19)(q23.3;p13)/KMT2A::ELL. *Leuk Res* 2023; 125: 107018.
21. Dworzak M.N., Buldini B., Gaipa G., Ratei R., Hrusak O., Luria D., et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (1): 82–93.
22. Alexander T.B., Gu Z., Iacobucci I., Dickerson K., Choi J.K., Xu B., et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* 2018; 562 (7727): 373–9.
23. Shi R., Munker R. Survival of patients with mixed phenotype acute leukemias: A large population-based study. *Leuk Res* 2015; 39 (6): 606–16.
24. Семченкова А.А., Илларионова О.И., Дёмина И.А., Михайлова Е.В., Зеркаленкова Е.А., Захарова Е.С., et al. Рекомендации по применению проточной сортировки клеток в диагностике и мониторинге острых лейкозов. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (4): 186–205. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-4-186-205 [Semchenkova A.A., Illarionova O.I., Demina I.A., Mikhailova E.V., Zerkalenkova E.A., Zakharova E.S., et al. Guidelines for the use of flow cell sorting in diagnosis and monitoring of acute leukemia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (4): 186–205 (In Russ.)].
25. Semchenkova A., Zerkalenkova E., Demina I., Kashpor S., Volchkov E., Zakharova E., et al. Recognizing Minor Leukemic Populations with Monocytic Features in Mixed-Phenotype Acute Leukemia by Flow Cell Sorting Followed by Cytogenetic and Molecular Studies: Report of Five Exemplary Cases. *Int J Mol Sci* 2023; 24 (6): 5260.
26. McGinnis E., Yang D., Au N., Morrison D., Chipperfield K.M., Setiadi A.F., et al. Clinical and laboratory features associated with myeloperoxidase expression in pediatric B-lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2021; 100 (4): 446–53.
27. Oberley M.J., Li S., Orgel E., Phei Wee C., Hagiya A., O’Gorman M.R.G. Clinical Significance of Isolated Myeloperoxidase Expression in Pediatric B-Lymphoblastic Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2017; 147 (4): 374–81.
28. Raikar S.S., Park S.I., Leong T., Jaye D.L., Keller F.G., Horan J.T., et al. Isolated myeloperoxidase expression in pediatric B/myeloid mixed phenotype acute leukemia is linked with better survival. *Blood* 2018; 131 (5): 573–7.
29. Savasan S., Buck S., Gadageel M., Gabali A. Flow cytometric false myeloperoxidase-positive childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (3): 477–83.