

# Особенности иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом и наличием транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$

Ж. В. Пермикин<sup>1,2</sup>, А. М. Попов<sup>3</sup>, Т. Ю. Вержбицкая<sup>2,4</sup>, Т. О. Ригер<sup>2,4</sup>, О. Р. Аракаев<sup>2,4</sup>, А. А. Власова<sup>2</sup>, Ю. В. Олышанская<sup>3</sup>, А. Н. Казакова<sup>3</sup>, С. В. Цвиренко<sup>1,2</sup>, Л. И. Савельев<sup>1,2,4</sup>, Г. А. Цаур<sup>1,2,4,5</sup>, Л. Г. Фечина<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 620028 Екатеринбург, ул. Репина, 3;

<sup>2</sup>ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>4</sup>ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

<sup>5</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»; Россия, 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

**Контакты:** Александр Михайлович Попов [uralcytometry@gmail.com](mailto:uralcytometry@gmail.com)

**Цель исследования** – поиск иммунофенотипических маркеров для прогнозирования наличия транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ .

**Результаты.** Транслокация  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  была обнаружена у 118 (22,4 %) из 526 обследованных пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. Опухолевые бласты пациентов с транслокацией  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  достоверно чаще имели высокую экспрессию CD10, а также коэкспрессию миелоидных маркеров CD13, CD33 и CD117. Для них также было типично отсутствие экспрессии CD20. В то же время полученные нами результаты не позволили найти отдельный иммунофенотипический маркер, который с высокой долей достоверности мог бы предсказывать наличие  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ .

**Заключение.** Таким образом, применение стандартного перечня иммунологических маркеров не позволяет уверенно выделить данную группу пациентов. Однако расширение диагностической панели, высокий уровень стандартизации проточной цитометрии и дополнительные методы анализа цитометрических данных могут позволить достаточно точное выявление пациентов, относящихся к этой клинически значимой подгруппе.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, иммунофенотипирование, транслокация  $t(12;21)(p13;q22)$

**Для цитирования:** Пермикин Ж. В., Попов А. М., Вержбицкая Т. Ю. и др. Особенности иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом и наличием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ . Онкогематология 2018;13(4): 95–103.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-4-95-103

## Flow cytometric analysis of leukemic blast cells in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with translocation $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$

Zh. V. Permikin<sup>1,2</sup>, A. M. Popov<sup>3</sup>, T. Yu. Verzhbitskaya<sup>2,4</sup>, T. O. Riger<sup>2,4</sup>, O. R. Arakaev<sup>2,4</sup>, A. A. Vlasova<sup>2</sup>, Yu. V. Olshanskaya<sup>3</sup>, A. N. Kazakova<sup>3</sup>, S. V. Tsvirenko<sup>1,2</sup>, L. I. Saveliev<sup>1,2,4</sup>, G. A. Tsaur<sup>1,2,4,5</sup>, L. G. Fechina<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Ural State Medical University; 3 Repina St., Ekaterinburg 620030, Russia;

<sup>2</sup>Regional Children's Hospital; 32 Serafimy Deryabinoy St., Ekaterinburg 620149, Russia;

<sup>3</sup>Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

<sup>4</sup>Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia;

<sup>5</sup>Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 106 Pervomayskaya St., Ekaterinburg 620049, Russia

**The objective** of the study was searching for surface antigen expression that could predict presence of translocation  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients.

**Results.** ETV6-RUNX1 fusion gene transcript was revealed in 118 (22.4 %) out of 526 children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemic blast cells in ETV6-RUNX1-positive patients more frequently had high CD10 expression, myeloid markers co-expression, including CD13, CD33, CD117, and absence of CD20 than in ETV6-RUNX1-negative ones. Nevertheless diagnostic test performance characteristics of each single parameter was not strong enough for predicting the presence of translocation  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ .

**Conclusion.** Thus application of conventional set of immunological markers does not allow reliable distinguishing this patients' subgroup.

However antibodies panel enlargement, high degree of flow cytometry standardization and additional analytical methods can potentially improve applicability of antigen profile analysis for separation of patients with translocation  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ .

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, immunophenotype, translocation  $t(12;21)(p13;q22)$

**For citation:** Permikin Zh. V., Popov A. M., Verzhbitskaya T. Yu. et al. Flow cytometric analysis of leukemic blast cells in pediatric b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with translocation  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ . *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(4): 95–103.

### Введение

У детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и повторяющимися генетическими aberrациями наиболее часто встречающейся структурной перестройкой является транслокация  $t(12;21)(p13;q22)$ , ведущая к образованию химерного гена *ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)* [1–3]. Данная хромосомная aberrация считается криптической, т. е. ее невозможно выявить при стандартном цитогенетическом анализе [4]. Поэтому для ее определения необходимо использовать такие высокотехнологичные методы клинической лабораторной диагностики, как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) [4–6]. К сожалению, в нашей стране эти методы используются только в ограниченном числе лабораторий. Важность выявления транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  связана с тем, что она ассоциирована с благоприятным прогнозом при ОЛЛ у детей [7–11], в том числе при существенном снижении продолжительности терапии [12].

Ранее неоднократно предпринимались попытки найти иммунофенотипические маркеры, ассоциированные с наличием данной транслокации для того, чтобы проводить прицельный поиск транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ . Наиболее убедительные данные получены для иммунофенотипа, соответствующего ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) с экспрессией CD27, отсутствием и/или слабой экспрессией CD44, а также с отсутствием экспрессии CD20, CD9, CD66c [13–19]. Однако вышеперечисленные маркеры, кроме CD20, редко используются на этапе первичного иммунофенотипирования при установлении диагноза ОЛЛ. Поэтому нами был принят поиск иммунофенотипических критериев, применяемых в общепринятой диагностической панели [20, 21], для прогнозирования наличия транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ .

**Цель исследования** – оценить особенности иммунофенотипа бластных клеток у детей с ВП-ОЛЛ и наличием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$

### Материалы и методы

Исследование проводилось в лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Отдела детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы г. Екатеринбург с марта 2008 г. по декабрь 2017 г. В исследуе-

мую группу были включены 526 пациентов с диагнозом ВП-ОЛЛ. Медиана возраста составила 3,4 года (1 мес–17 лет). Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании стандартных цитологических критериев [22], дополненных результатами иммунофенотипирования согласно рекомендациям группы EGIL [23, 24]. Выявление транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  проводили методом двухстадийной («гнездной») ОТ-ПЦР по ранее описанной методике [25].

Имунофенотипирование опухолевых клеток в костном мозге выполняли методом 4–8-цветной проточной цитометрии на приборе FACS Canto II (Becton & Dickinson (BD), США). Настройку прибора производили с использованием калибровочной системы Comp Beads (BD). Мониторинг стабильности работы прибора осуществляли с помощью калибровочных частиц Cytometer Setup and Tracking (BD). Диагностическая панель включала комбинацию антител, приведенных в табл. 1. Окрашивание первичномеченными моноклональными антителами проводили согласно инструкции производителя. После инкубации суспензии костномозговых клеток с первичномеченными моноклональными антителами взвесь обрабатывали лизирующим раствором (FACS Lysing solution, BD), а затем отмывали фосфатно-солевым буфером (Cell Wash, BD). Результаты иммунофенотипирования оценивали с помощью программного обеспечения FACS Diva 4.0–6.1 (BD). Объединение цитометрических данных разных пациентов проводили с использованием программы Kaluza 2.1 (Beckman Coulter (BC), США). Объединяли данные только тех пациентов, иммунофенотипирование которых было выполнено по идентичным протоколам работы, одинаковыми комбинациями антител и флуорохромов, а также при стабильных настройках проточного цитометра. Оценку и интерпретацию результатов иммунофенотипирования проводили в соответствии со стандартом российско-белорусской кооперативной группы «Москва–Берлин» [21]. Для сравнения уровня экспрессии антигенов использовали значения средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI). Поскольку величина MFI напрямую зависит от используемых сочетаний антител с флуорохромами, а также от настроек проточного цитометра, прямое сопоставление MFI оказалось возможным для 103 пациентов.

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 7.0. Статистическую значимость

**Таблица 1.** Моноклональные антитела, применявшиеся для диагностического иммунофенотипирования острого лейкоза

**Table 1.** Monoclonal antibodies used for diagnostic immunophenotyping of acute leukemia

Моноклональное антитело Monoclonal antibody	Флуорохром Fluorochrome	Производитель Manufacturer
CD7	FITC	BD
NG2	PE	BD
CD45	PerCP	BD
CD34	PE-Cy7	BD
CD19	PE-Cy7/APC	BD
CD3	APC-Cy7/APC-H7	BD
CD10	PE/BV421	BD
CD56	BV510	BD
CD15	FITC/BV510	BD
CD13	PE/PE-Cy7	BD
CD33	PerCP/PE-Cy7/APC	BD
CD11c	APC/BV510	BD
CD14	APC-Cy7/APC-H7	BD
CD117	PE/APC/BV421	BD
CD64	FITC/BV510	BD
iLysozime	FITC	Invitrogen
iMPO	FITC/PE	BD/Invitrogen
iCD22	PE-Cy7/BV421	BD
iCD79a	APC	BC, BD
CD58	FITC	BD, BC
CD20	APC-Cy7	BD
CD38	BV510	BD
Anti-Lambda	FITC/PE	BD
Anti-Kappa	FITC/PE	BD
IgM	APC	BD
CD5	PE-Cy7	BD

**Примечание.** BD – Becton & Dickinson, США; BC – Beckman Coulter, США.

Note. BD – Becton & Dickinson, USA; BC – Beckman Coulter, USA.

различий определяли с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и  $\chi^2$  с поправкой Йетса. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Для оценки ассоциации между экспрессией отдельных иммунофенотипических маркеров и выявлением  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  проводили расчет диагностической чувствительности, специфичности, предска-

тельной ценности положительного и отрицательного результатов, диагностической эффективности теста [26].

### Результаты

Транслокация  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  была обнаружена у 118 (22,4 %) из 526 обследованных пациентов. Иммунофенотип опухолевых клеток всех пациентов с транслокацией  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  соответствовал варианту ВП, в то время как при отсутствии данной генетической аберрации этот вариант был диагностирован достоверно реже – у 365 (89,5 %) из 408 пациентов ( $p < 0,001$ ). Профиль экспрессии антигенов при ОЛЛ с наличием перестройки  $ETV6-RUNX1$  и без нее существенно различался (табл. 2). Опухолевые blasts при наличии транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  достоверно чаще экспрессировали CD10, CD45 и CD34, но реже CD20 и внутриклеточную  $\mu$ -цепь иммуноглобулина. Наиболее же существенным отличием стало крайне высокое число пациентов, у которых опухолевые клетки коэкспрессировали миелоидные антигены. У 76,3 % пациентов с  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  была выявлена экспрессия как минимум одного из исследованных миелоидных маркеров. Эти различия оказались значимыми для CD13, CD33 и CD117, проанализированных по отдельности. Даже CD117, ранее считавшийся достаточно специфичным признаком миелоидной дифференцировки [27], был обнаружен на опухолевых клетках в 37,2 % случаев при ОЛЛ с наличием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ . Кроме того, почти у половины пациентов с данной генетической аберрацией было определено более одного миелоидного маркера, а 13,6 % детей по классификации EGIL [23] должны быть отнесены к категории острого бифенотипического лейкоза, поскольку у них опухолевые клетки коэкспрессировали все 3 перечисленных антигена.

Характеристики параметров диагностической эффективности определения отдельных антигенов для прогнозирования наличия перестройки  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  представлены в табл. 3. Как видно из представленных данных, наибольшей диагностической эффективностью обладала экспрессия CD117 (89,4 %), крайне редко определявшаяся у пациентов без этой транслокации. Однако данная высокая диагностическая эффективность была достигнута исключительно за счет высокой специфичности (97,1 %) при достаточно низкой чувствительности (37,3 %). Максимальной же специфичностью обладала экспрессия 3 миелоидных антигенов (99,3 %).

Среди исследованных маркеров только CD10 был экспрессирован в подавляющем большинстве случаев (более 90 % пациентов) в обеих исследованных группах, поэтому нами была предпринята попытка количественного сравнения экспрессии данного антигена при CD10-положительном ОЛЛ. Результаты сравнения представлены на рис. 1а. Несмотря на значимо более высокую MFI CD10 у пациентов с  $t(12;21)(p13;q22)/$

**Таблица 2.** Число пациентов, бластные клетки которых экспрессируют различные антигены в зависимости от наличия транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ Table 2. Number of patients whose blast cells express various antigens depending on the presence of translocation  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ 

Маркер Marker	Пациенты с $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ (n = 118), n (%) Patients with $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ (n = 118), n (%)	Пациенты без $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ (n = 408), n (%) Patients without $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ (n = 408), n (%)	<i>p</i>
Экспрессия CD10 CD10 expression	118 (100)	387 (94,9)	<b>0,025</b>
Экспрессия CD20 CD20 expression	31 (26,3)	180 (44,1)	<b>&lt;0,001</b>
Экспрессия CD45 CD45 expression	101 (85,6)	304 (74,5)	<b>0,017</b>
Экспрессия CD34 CD34 expression	108 (91,5)	337 (82,6)	<b>0,008</b>
Экспрессия CD33 CD33 expression	40 (33,9)	62 (15,2)	<b>&lt;0,001</b>
Экспрессия CD117 CD117 expression	44 (37,2)	12 (2,9)	<b>&lt;0,001</b>
Экспрессия CD13 CD13 expression	75 (63,6)	104 (25,5)	<b>&lt;0,001</b>
Экспрессия как минимум одного миелоидного антигена Expression of at least one myeloid antigen	90 (76,3)	140 (34,3)	<b>&lt;0,001</b>
Экспрессия не менее двух миелоидных антигенов Expression of two or more myeloid antigens	54 (45,8)	34 (8,3)	<b>&lt;0,001</b>
Экспрессия трех миелоидных антигенов Expression of three myeloid antigens	16 (13,6)	3 (0,7)	<b>&lt;0,001</b>
Внутриклеточная экспрессия IgM Intracellular IgM expression	0	24 (5,9)	<b>0,014</b>
Мембранная экспрессия IgM Membrane IgM expression	0	3 (0,7)	0,810

**Примечание.** Жирным шрифтом в таблице выделены показатели, имеющие статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ).Note. In bold there are indicators that have statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

*ETV6-RUNX1*, четкого разделения только по экспрессии данного антигена получить не удалось. Проведенный ROC-анализ (рис. 1б) также показал достоверную ассоциацию MFI и наличия  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ , однако полученный пороговый уровень, лучше всего разделяющий пациентов с наличием и отсутствием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ , позволил получить диагностическую эффективность лишь в 80,6 % случаев.

Таким образом, несмотря на существенные различия в антигенном профиле между пациентами с транслокацией  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  и без нее, выявить какой-то отдельный маркер, точно разделяющий эти 2 подгруппы ОЛЛ, нам не удалось.

Такой результат, прежде всего, связан с биологической гетерогенностью *ETV6-RUNX1*-отрицательной группы, включающей пациентов как с известными

генетическими абберациями (в том числе высокая гипердиплоидия, гиподиплоидный кариотип, транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$ ,  $t(1;19)(q23;p13)$ , перестройки гена *MLL*), так и относящихся к группе «В-другие» ОЛЛ. В то же время случаи, ассоциированные с наличием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ , по экспрессии антигенов оказались крайне похожими между собой. Одинаковыми были не только «формальные» иммунофенотипические признаки, такие как наличие или отсутствие того или иного маркера, но и распределения клеток на точечных бифлуоресцентных графиках. Так, при совмещении цитометрических данных 10 пациентов с  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  распределение клеток в объединенном массиве данных было практически идентичным распределениям у каждого из включенных в анализ пациентов (рис. 2).



**Таблица 3.** Диагностическая ценность иммунофенотипических маркеров для прогнозирования наличия транслокации  $t(12;21)(p13.2;q22.1)/ETV6-RUNX1$

**Table 3.** The diagnostic test performance of immunophenotypic markers for predicting the presence of translocation  $t(12;21)(p13.2;q22.1)/ETV6-RUNX1$

Маркер Marker	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Предсказательная ценность положительного результата Positive predictive value	Предсказательная ценность отрицательного результата Negative predictive value	Диагностическая эффективность Overall correct prediction
Экспрессия CD10 CD10 expression	100	5,1	23,4	100	26,4
Отсутствие экспрессии CD20 The absence of CD20 expression	73,7	44,1	27,6	85,3	50,8
Экспрессия CD45 CD45 expression	85,6	25,5	24,9	85,9	39,0
Экспрессия CD34 CD34 expression	91,5	17,4	24,3	87,7	33,8
Экспрессия CD33 CD33 expression	33,9	84,8	39,2	81,6	73,4
Экспрессия CD117 CD117 expression	37,3	97,1	78,6	84,3	89,4
Экспрессия CD13 CD13 expression	63,6	74,5	41,9	87,6	72,1
Экспрессия как минимум одного миелоидного антигена Expression of at least one myeloid antigen	76,3	65,7	39,1	90,5	68,1
Экспрессия не менее двух миелоидных антигенов Expression of two or more myeloid antigens	45,8	91,7	61,4	85,4	81,4
Экспрессия трех миелоидных антигенов Expression of three myeloid antigens	14,8	99,3	84,2	79,9	80,0
Отсутствие внутриклеточной экспрессии IgM Absence of intracellular IgM expression	100	5,9	23,5	100	27,0

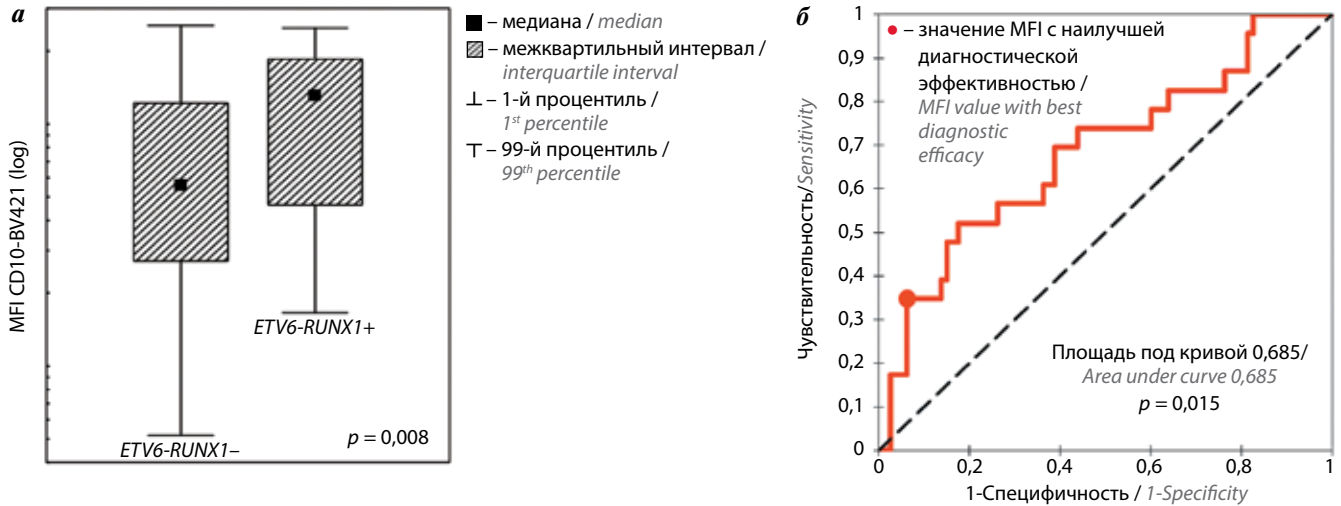
**Обсуждение**

Иммунофенотипирование бластных клеток костного мозга является одним из широко распространенных методов диагностики ОЛЛ. Ранее было показано, что при ВП-ОЛЛ у детей существует корреляция антигенного профиля опухолевых клеток с наличием известных молекулярно-генетических aberrаций. По иммунофенотипу наиболее точное прогнозирование возможно для перестроек гена *KMT2A (MLL)* [28, 29], а также транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$  с образованием химерного гена *BCR-ABL1* [28, 30]. Кроме того, продолжают попытки определения типичного профиля экспрессии антигенов и для других клинически значимых генетических aberrаций, в том числе и  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ .

К наиболее типичным иммунофенотипическим маркерам, характеризующим группу пациентов с на-

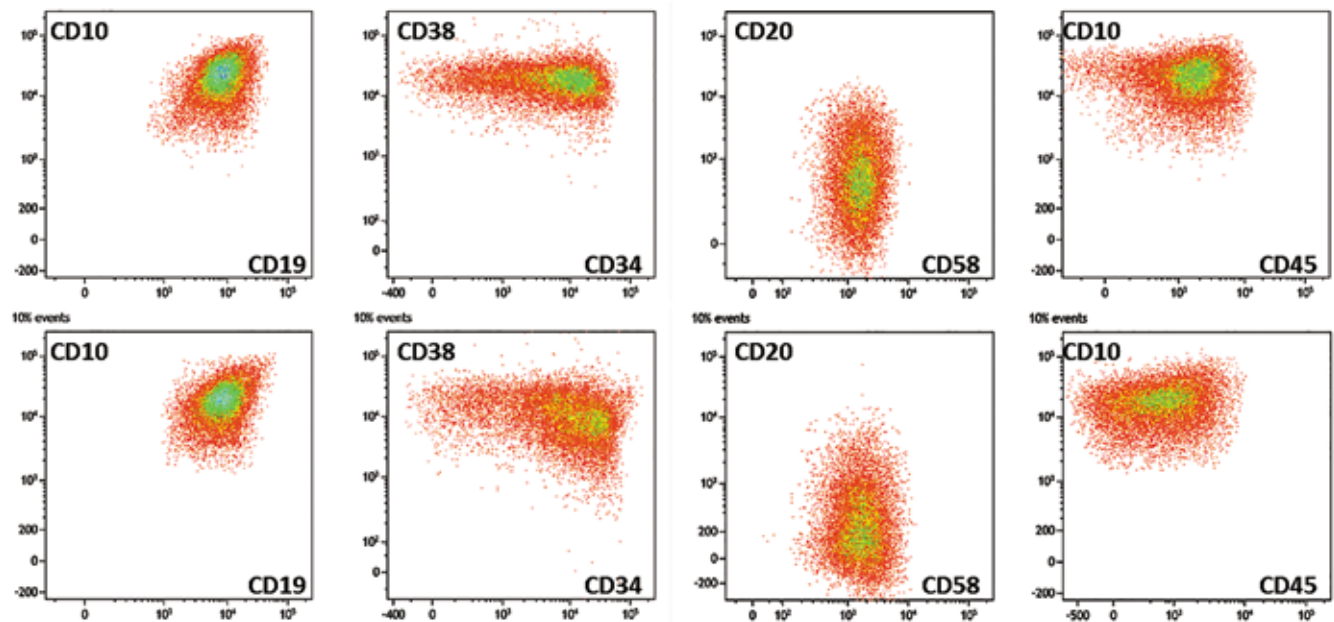
личием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ , чаще всего относят отсутствие экспрессии CD9, CD20, CD66c [13–17], несколько реже – высокую экспрессию CD10 [31], CD40 [32], CD135 [31] и HLA-DR [31, 32], а также низкую экспрессию CD20 [13] и CD86 [32], коэкспрессию миелоидных антигенов CD13, CD33, CDw65 [5]. В то же время наиболее убедительно выглядят результаты другого исследования, указывающие на то, что экспрессия CD27 и отсутствие/слабая экспрессия CD44 специфичны для случаев с наличием транслокации  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  [18, 19].

Однако далеко не все эти антигены используются для первичной диагностики острых лейкозов. Поэтому нами была предпринята попытка охарактеризовать иммунофенотип на основании имеющихся в нашем распоряжении сведений, полученных в ходе применения стандартной диагностической панели. Нами были



**Рис. 1.** Корреляция экспрессии CD10 с наличием  $t(12;21)(p13;q22)$ : а – сравнение средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD10-BV421 между пациентами с данной перестройкой ( $n = 23$ ) и без нее ( $n = 79$ ); б – ROC-кривая оценки возможности прогнозирования наличия ETV6-RUNX1 в зависимости от экспрессии CD10

**Fig. 1.** Correlation of CD10 expression with presence of translocation  $t(12;21)(p13;q22)$ : а – comparison of mean fluorescence intensity (MFI) CD10-BV421 between patients with ( $n = 23$ ) and without this aberration ( $n = 79$ ); б – ROC-curve analysis for prediction of  $t(12;21)(p13;q22)$ /ETV6-RUNX1 presence by CD10 expression



**Рис. 2.** Схожесть распределения клеток на точечных бифлуоресцентных графиках единичного пациента с ETV6-RUNX1 (верхний ряд) и 10 пациентов с данной генетической абберацией (совмещенные цитометрические данные, нижний ряд)

**Fig. 2.** The similarity of cell distribution on bifluorescent dot-plots of a single patient with ETV6-RUNX1 (top row) and 10 patients with this genetic aberration (combined cytometric data, bottom row)

получены убедительные данные о том, что пациенты с ETV6-RUNX1 имеют достаточно специфический антигенный профиль, характеризующийся, прежде всего, высокой экспрессией CD10 и коэкспрессией CD13, CD33 и/или CD117. Кроме того, внутри данной группы ОЛЛ одинаковым было и распределение клеток на графиках цитометрических данных.

В то же время полученные нами результаты не позволили найти отдельный иммунофенотипический маркер, который с высокой долей достоверности мог бы

предсказывать наличие  $t(12;21)(p13;q22)$ /ETV6-RUNX1. Каждый из исследованных маркеров отличался относительно высоким значением либо чувствительности, либо специфичности, что в итоге приводило к относительно низкой диагностической эффективности. Отсутствие же хотя бы двух параметров с высокими значениями обоих основных диагностических показателей не позволило применять для разделения пациентов какие-либо иммунофенотипические комбинации. В итоге наибольшей предсказательной ценностью

обладали антигены с высокой специфичностью, но не чувствительностью, что связано с существенно большим размером группы пациентов без транслокации t(12;21).

Ранее для прогнозирования наличия транслокации t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* у пациентов с ВП-ОЛЛ чаще всего сравнивали наличие/отсутствие экспрессии отдельных маркеров (чаще) или их комбинаций (реже) между группами с транслокацией t(12;21) и без нее. Оценку показателей диагностической ценности применяли гораздо реже [13, 14, 31]. Например, в работе М. Вогowitz и соавт. комбинация отсутствия или низкой экспрессии CD9 и CD20 обладала диагностической чувствительностью 0,88, специфичностью 0,71, предсказательной ценностью положительного результата 0,47, отрицательного результата 0,95 [13], что довольно близко к полученным нами значениям. Чуть более высокие показатели диагностической ценности были получены в работе V. Gandemer и соавт. при использовании комбинации низкой MFI CD9 ( $\leq 20$ ) и доли CD10-положительных клеток ( $>40\%$ ): чувствительность 0,812, специфичность 0,921, диагностическая эффективность теста 0,900 [14]. Однако использование значений MFI в рутинной диагностике требует крайне высокого уровня стандартизации исследований, что далеко не всегда достижимо в рамках рутинной диагностики ОЛЛ [16]. Отсутствие экспрессии CD66c, которую описывают как один из наиболее специфических изолированных маркеров t(12;21)-положительного ОЛЛ, также типично для ОЛЛ с перестройками гена *KMT2A* и ОЛЛ с наличием транслокации t(1;19)(q23;p13)/*TCF3-PBX1* [15].

Несмотря на вышеупомянутые недостатки, представляется интересным и важным расширить используемую диагностическую панель, включив в нее CD27, CD44, CD9 и, возможно, ряд других маркеров, а также применять не качественное, а количественное (оценка MFI) исследование экспрессии всех антигенов, в том числе и с использованием математических методов анализа [33]. Это даст более детальный ответ на вопрос, можно ли точно предсказывать наличие транслокации t(12;21)(p13;q22), однако потребует существенно большей стандартизации проведения проточной цитометрии. В случае успеха станет возможным выделение не только *ETV6-RUNX1*-положительных, но и *ETV6-RUNX1*-подобных пациентов [18].

### Заключение

Таким образом, пациенты с ОЛЛ и наличием транслокации t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* имеют весьма специфический иммунофенотип, который существенно отличается от ОЛЛ без данной генетической аберрации. При t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* опухолевые клетки достоверно чаще имеют высокую экспрессию CD10 и коэкспрессию миелоидных антигенов. Тем не менее применение стандартного перечня иммунологических маркеров не позволяет уверенно выделить данную группу пациентов. Расширение диагностической панели, высокий уровень стандартизации проточной цитометрии и дополнительные методы анализа цитометрических данных могут позволить достаточно точно выявление пациентов, относящихся к этой клинически значимой подгруппе.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Romana S.P., Le Coniat M., Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9(3):186–91. PMID: 7515661.
- Golub T., Barker G., Bohlander S. et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the *AML1* gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(11):4917–21. PMID: 7761424.
- Romana S.P., Mauchauffe M., Le Coniat M. et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a *tel-AML1* gene fusion. *Blood* 1995;85(12):3662–70. PMID: 7780150.
- Shurtleff S., Buijs A., Behm F. et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9(12):1985–9. PMID: 8609706.
- Borkhardt A., Cazzaniga G., Viehmann S. et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood* 1997;90(2):571–7. PMID: 9226156.
- Kobayashi H., Rowley J. Identification of cytogenetically undetected 12p13 translocations and associated deletions with fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(1):66–9. PMID: 7534114.
- Moricke A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265–84. DOI: 10.1038/leu.2009.257. PMID: 20010625.
- Moorman A., Ensor H., Richards S. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11(5):429–38. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70066–8. PMID: 20409752.
- Loh M., Goldwasser M., Silverman L. et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95–01. *Blood* 2006;107(11):4508–13. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3451. PMID: 16493009.
- Forestier E., Heyman M., Andersen M.K. et al. Outcome of *ETV6/RUNX1*-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol* 2008;140(6):665–72. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.06980.x. PMID: 18241254.
- Bhojwani D., Pei D., Sandlund J. et al. *ETV6-RUNX1*-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia* 2012;26(2):265–70. DOI: 10.1038/leu.2011.227. PMID: 21869842.

12. Kato M., Ishimaru S., Seki M. et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia* 2017;31(3):580–4. DOI: 10.1038/leu.2016.274. PMID: 27698447.
13. Borowitz M., Rubnitz K., Nash M. et al. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1998;12(11):1764–70. PMID: 9823952.
14. Gandemer V., Aubry M., Roussel M. et al. CD9 expression can be used to predict childhood TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia: proposal for an accelerated diagnostic flowchart. *Leuk Res* 2010;34(4):430–7. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.09.033. PMID: 19896186.
15. Kiyokawa N., Iijima K., Tomita O. et al. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2014;38(1):42–8. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.10.008. PMID: 24231528.
16. van Dongen J., Lhermitte L., Boettcher S. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26(9):1908–75. DOI: 10.1038/leu.2012.120. PMID: 22552007.
17. Kalina T., Vaskova M., Mejstrikova E. et al. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer* 2005;5:38. DOI: 10.1186/1471-2407-5-38. PMID: 15826304.
18. Zaliouva M., Kotrova M., Bresolin S. et al. *ETV6/RUNX1*-like acute lymphoblastic leukemia: a novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2017;56(8):608–16. DOI: 10.1002/gcc.22464. PMID: 28395118.
19. Vaskova M., Mejstrikova E., Kalina T. et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005;19(5):876–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403706. PMID: 15759032.
20. Dworzak M.N., Buldini B., Gaipa G. 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. DOI: 10.1002/cyto.b.21518. PMID: 28187514.
21. Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В. и др. Стандарт российской-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. *Онкогематология* 2018;13(1):73–82. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-73-82. [Novikova I.A., Verzhbitskaya T.Y., Movchan L.V. et al. Russian-Belarusian multicenter group standard guidelines for childhood acute lymphoblastic leukemia flow cytometric diagnostics. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):73–82. (In Russ.)].
22. Bennett J., Catovsky D., Daniel M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451–8. PMID: 188440.
23. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W. 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. PMID: 7564526.
24. Béné M.C., Nebe T., Bettelheim P. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567–74. DOI: 10.1038/leu.2010.312. PMID: 21252983.
25. Harbott J., Viehmann S., Borkhardt A. et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* 1997;90(12):4933–7. PMID: 9389711.
26. ГОСТ Р 53022.3–2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/1200072565>. Режим доступа: 16.08.2017. [GOST(State Standard) P 53022.3–2008. Clinical laboratory technologies. Quality requirements for clinical laboratory tests. Part 3. Rules for assessment the clinical informativity of laboratory tests. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200072565>. Access Mode 08/16/2017. (In Russ.)].
27. Bene M.C., Bernier M., Casanovas R.O. et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998;92(2):596–9. PMID: 9657760.
28. Hrusák O., Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16(7):1233–58. DOI: 10.1038/sj.leu.2402504. PMID: 12094248.
29. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Иммунофенотипическая характеристика острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2012;7(2):14–24. DOI: 10.17650/1818-8346-2012-7-2-14-24. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Y. et al. Immunophenotypic investigation of infant acute lymphoblastic leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2012;7(2):14–24. (In Russ.)].
30. Buldini B., Zangrando A., Michielotto B. et al. Identification of immunophenotypic signatures by clustering analysis in pediatric patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2010;85(2):138–41. DOI: 10.1002/ajh.21595. PMID: 20095033.
31. De Zen L., Orfao A., Cazzaniga G. et al. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. *ETV6/AML1 ALLs* identification. *Leukemia* 2000;14(7):1225–31. PMID: 10914546.
32. Alessandri A., Reid G., Bader S. et al. *ETV6(TEL)–AML1* pre-B acute lymphoblastic leukaemia cells are associated with a distinct antigen-presenting phenotype. *Br J Haematol* 2002;116(2):266–72. PMID: 11841426.
33. Saeys Y., Van Gassen S., Lambrecht B.N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol* 2016;16(7):449–62. DOI: 10.1038/nri.2016.56. PMID: 27320317.

**Вклад авторов**

Ж.В. Пермикин: разработка дизайна исследования, анализ цитометрических данных, обзор публикаций, написание текста статьи;  
 А.М. Попов, Г.А. Цаур: разработка дизайна исследования, анализ данных, написание и редактирование текста статьи;  
 Т.Ю. Вержбицкая: анализ данных иммунофенотипирования;  
 Т.О. Ригер: анализ молекулярно-генетических данных;  
 О.Р. Аракаев, А.А. Власова, С.В. Цвиренко, Л.И. Савельев: написание и редактирование статьи;  
 Ю.В. Ольшанская, А.Н. Казакова: получение цитогенетических данных;  
 Л.Г. Фечина: общее руководство исследованием, редактирование статьи, обзор публикаций.



**Authors' contributions**

Zh.V. Permikin: study design development, cytometric data analysis, reviewing of publications, article writing;  
A.M. Popov, G.A. Tsauro: study design development, analysis of data, article writing and editing;  
T.Yu. Verzhbitskaya: immunophenotyping data analysis;  
T.O. Riger: analysis of molecular genetic data;  
O.R. Arakaev, A.A. Vlasova, S.V. Tsvirenko, L.I. Saveliev: article writing and editing;  
Yu.V. Olshanskaya, A.N. Kazakova: obtaining cytogenetic data;  
L.G. Fechina: general research leadership, article editing, reviewing of publications.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Ж.В. Пермикин/Zh.V. Permikin: <https://orcid.org/0000-0003-1904-4989>  
А.М. Попов/A.M. Popov: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>  
Т.Ю. Вержбицкая/T.Yu. Verzhbitskaya: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>  
Ю.В. Ольшанская/Yu.V. Olshanskaya: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>  
А.Н. Казакова/A.N. Kazakova: <https://orcid.org/0000-0002-1085-4646>  
С.В. Цвиренко/S.V. Tsvirenko: <http://orcid.org/0000-0003-0185-0050>  
Л.И. Савельев/L.I. Saveliev: <https://orcid.org/0000-0002-5180-6560>  
Г.А. Цаур/G.A. Tsauro: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>  
Л.Г. Фечина/L.G. Fechina: <https://orcid.org/0000-0002-1885-3912>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Родители пациентов подписали информированное согласие на участие детей в исследовании.  
**Informed consent.** There is given the parental informed consent to the children's participation in the study.