

# Az immunofenotipizálás szerepe a gyermekkori akut lymphoblastos leukaemiák diagnózisában és kórjóslatában

Horváth Adrienne<sup>1</sup>, Baghiu Maria Despina<sup>1</sup>, Köpeczi Beáta Judit<sup>2</sup>, Koncsag Előd<sup>1</sup>, Darkó Zsuzsanna<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Marosvásárhelyi 1.sz. Gyermekgyógyászati klinika, <sup>2</sup>Hematológia és Csontvelőátültető Központ Marosvásárhely, <sup>3</sup>Csontvelőátültető Osztály, <sup>3</sup>„Empátia” Családorvosi Rendelő

## Rolul imunofenotiparii în diagnosticul și prognosticul leucemiilor acute limfoblastice (LAL) la copil

Diagnosticul LAL se bazează pe caracteristicile morfologice, imunologice, citochimice și de biologie moleculară a limfoblaștilor. În perioada 2001-2007, am analizat la 42 bolnavi LAL 0-18 ani imunofenotipul blaștilor (n=29) corelat cu factorii de prognostic. LAL precursor-B am găsit în 22, T în 5 și B matur în 2 cazuri. Leucocitoza > 20.000/mm<sup>3</sup> la debut a fost prezentă la 54,5% dintre LAL precursor-B și 100% la LAL-T. Răspunsul precoce la corticoterapie a fost favorabil în 81% al LAL precursor-B și în 20% a LAL-T. Măduva osoasă la 33 zile a fost M1 la 23 și M2 la 3 bolnavi. 55% a pacienților LAL precursor-B și 100% a celor cu LAL-T au fost de risc înalt. Supraviețuirea generală a prezentat variații semnificative (p<0,001) în funcție de imunofenotip. Imunofenotiparea este esențială în stabilirea diagnosticului complet și evaluarea corectă a prognosticului LAL la copiii mici.

Cuvinte cheie: imunofenotip, supraviețuire, leucemie acută limfoblastică

## The role of immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemias (ALL)

The diagnosis of ALL is based upon the morphological, cytochemical, immunological and molecular analysis of lymphoblasts. We performed immunophenotyping in 29 out of 42 ALL patients aged 0 to 18 years during 2001-2007 and made some correlations with prognostic factors. Precursor-B ALL was found in 22, T-cell in 5 and mature B cell-ALL in 2 patients. Leucocytosis > 20.000/mm<sup>3</sup> appeared in 54,5% of precursor-B and in 100% of T cell ALL. Early cortisone response was good in 81% of precursor-B and 20% of T cell ALL. Bone marrow at 33 day was of M1 in 23 and M2 type in 3 cases. 55% of precursor-B ALL and 100% of T-cell ALL were of high risk. Overall survival presented significant variations related to immunophenotype. Immunophenotyping is essential in the establishment of a complete diagnosis and assessment of correct prognosis in childhood ALL.

Key words: immunophenotype, survival, acute lymphoblastic leukemias

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (2): 102-105

www.orvtudert.ro

Az akut lymphoblastos leukaemia (ALL) a leggyakoribb gyermekkori malignus megbetegedés. A gyermekkori rosszindulatú megbetegedések közel 25%-át valamint a gyermekkori leukémiák 75%-át az ALL teszi ki. Az ALL diagnózisában a csontvelői malignus sejtek morfológiai, immunológiai, cytogenetikai és molekuláris biológiai tulajdonságait veszik figyelembe, amelyekkel a különben nagyon heterogén ALL csoport különféle kórjóslatú típusait lehet megkülönböztetni. A lymphoblastok immunológiai vizsgálatát a marosvásárhelyi 1. sz. Gyermekgyógyászati Klinika beteganyagában 2001-től végzik, 2 ml EDTA-ra levett csontvelő aspirátumból Becton-Dickinson FACScan műszerrel.

A dolgozat célja a lymphoblastok immunológiai jellemzése és összefüggések keresése az immunofenotípus és a betegség lefolyása között.

## Anyag és módszer

A 2001-2007 között diagnosztizált 0-18 éves korcsoportú ALL-es betegeknél retrospektíven, a kórlapok adatai alapján vizsgáltuk a lymphoblastok immunológiai tulajdonságait és olyan prognosztikai tényezőket, mint életkor, nem, kezdeti fehérvérsejtszám, a lymphoblastok FAB (French-American-British) morfológiája, korai cortizon válasz, a 33. napi csontvelői kép, illetve összefüggések feltárását a vizsgált tényezők és a relapszusok valamint túlélés között. Az adatokat a SPSS statisztikai program segítségével dolgoztuk fel.

Dr. Horváth Adrienne

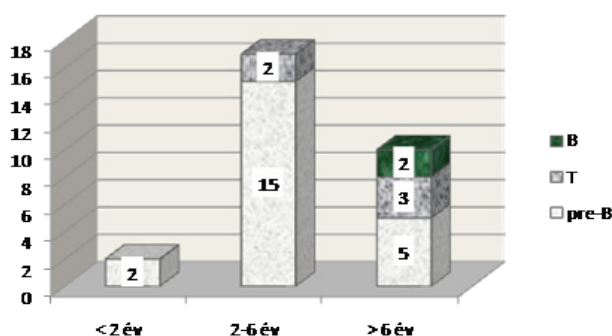
540091 Marosvásárhely – Târgu Mureș

str. Avram Iancu 49/2

E-mail: adigyer1@yahoo.com

## Eredmények

A 42 újonnan diagnosztizált ALL-es beteg (23 fiú és 19 lány) közül összesen 29 esetben (69%) sikerült a csontvelői lymphoblastok immunofenotipizálását elvégezni, ebből 22 esetben precursor-B sejtes (76%), 5 esetben T-sejtes (17,2%) és 2 esetben érett B-sejtes (6,8%) volt az ALL. Két évesnél fiatalabb betegeknél csak precursor-B sejtes ALL fordult elő, az életkor előrehaladásával megjelentek és gyakoribbá váltak a T-sejtes és érett B-sejtes formák (1. ábra). 20.000/mm<sup>3</sup> feletti kezdeti fehérvérsejtszám a precursor-B ALL 54,5%-ban, míg a T-sejtes ALL 100%-ban fordult elő. A korai cortizon választ a 7 napi Prednison kezelés után állapítottuk meg a perifériás vér abszolút lymphoblast száma alapján, az 1000/mm<sup>3</sup> alatti értékeket tartva kedvező eredménynek. A precursor-B ALL (n=21) 4 esetében (19%) és a T-sejtes ALL (n=5) közül 4 esetben (80%) találtunk 1000/mm<sup>3</sup>-nél magasabb abszolút lymphoblast számot. A chemoterápia 33. napján végzett kontroll csontvelő vizs-



1. ábra. Az életkor és lymphoblast immunofenotipusa közötti összefüggés

**1. táblázat.** Átlagos túlélési idő az immunofenotípus függvényében

Immunofenotípus	Átlagos túlélés (hónap)
pre-B	52,11
T	27,46
B	2,00

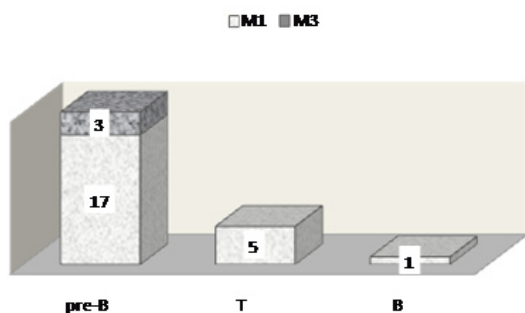
gálat 23 esetben volt a nagyon kedvező M1 típusú (<5% lymphoblast), 3 betegnél M2 típusú (5-25% lymphoblast), míg M3 típusú (>25% lymphoblast) nem észleltünk, ezek immunofenotípus szerinti megoszlását a **2. ábra** mutatja. Az immunofenotípusnak meghatározó szerepe volt a rizikó csoportok megjelölésében, így a precursor-B sejtből kiinduló ALL-es esetek 55%-a, míg az összes T-sejtes és érett B-sejtes ALL a magas malignitású csoportba került.

Immunofenotípus szerinti összehasonlításban az átlagos túlélés jelentős eltéréseket mutat (**1. táblázat**), a különbség szignifikáns  $p < 0,001$  szinten (Logrank-teszt). A legrosszabb prognózisú ALL az érett B-sejtes volt, míg a legkedvezőbb kórjólátot a precursor-B sejtes esetekben észleltük (**3. ábra**).

Az össz 42 betegből 16 beteget veszítettünk el (38,5%), főleg relapszusban és fertőzésekben (**2. táblázat**).

## Megbeszélés

Az ALL egy biológiailag heterogén betegcsoport, ezt igazolták a lymphoblastokon végzett morfológiai, immunológiai, citogenetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok. Történelmileg a lymphoblastok legkorábbi jellemzése **morfológiai** alapon történt. A FAB felosztás 3 típusú lymphoblastot különböztet meg a sejt nagysága, a mag chromatin szerkezete, alakja, nucleolusok jelenléte, citoplazma festődése, vacuolák jelenléte, mag/citoplazma arány szerint. Az L1 típusú lymphoblast viszonylag kicsi sejt, nucleolust tartalmazó nagy maggal, kevés citoplazmával. Az L2 típusú sejtek heterogén populációt alkotnak a méret és alak szempontjából, a mag bevágott, kávébab-szerű, nucleolust tartalmaz, több a citoplazma, amelyben néha vacuolák is megjelenhetnek. Az L3 típusú sejt mérete nagyobb az előbbiekéhez viszonyítva, a mélyen bazofil citoplazmában vacuolák, a magban nucleolusok vannak jelen. Prognosztikai szempontból az L1 típus a legkedvezőbb és az L3 típus a legrosszabb, ez utóbbi



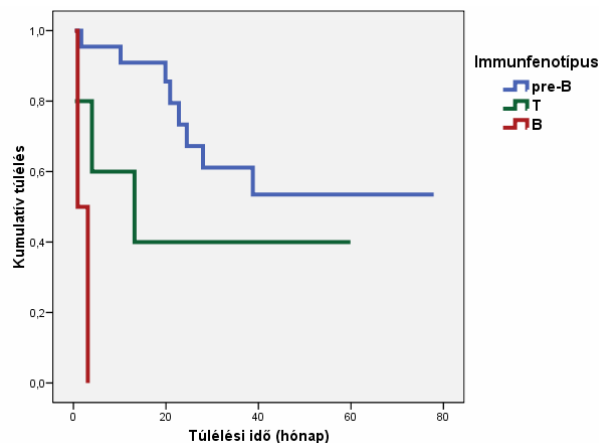
**2. ábra.** A 33. napi csontvelővizsgálat és immunofenotípus közötti összefüggés

**2. táblázat.** Elhalálozások okai ALL-ben

Halálozási ok	Esetszám	%-os arány az összbeteg számból
Relapszus	8 (Pre-B: 6, T:1 Nem meghatározott: 1)	19%
Fertőzések	3	7,14
Kezelés abbahagyása	2	4,76
Tumor lysis syndrome	2	4,76
Hydrocephalus, beékelődés	1	2,38
Összesen	16	38,5

különben az érett B-sejtes (Burkitt) ALL-nek felel meg. **Citogenetikailag** a malignusan átalakult sejtekben a kromoszómák számbeli vagy strukturális elváltozásait figyelhetjük meg. A számbeli eltérést illetően (ploidia) megjegyzendő, hogy a hyperdiploidia, főleg az 56-67 kromoszóma szám kedvező prognoszt jelent [1]. A strukturális elváltozások között megemlítendő a deletiok, translocatiok és duplicatiok [2, 9].

Egyes translocatiok [t(12;21)], kedvező prognoszt jelentenek, mások [t(8;14), t(9;22), t(4;11)] kedvezőtlen. A csontvelői blaszok citogenetikai vizsgálatát az ALL diagnózisában az USA-ban 1979-ben vezették be, az immunofenotípezálással egyidőben. Klinikánkon 2000-től sporadikusan végeztünk citogenetikai vizsgálatokat, az ország különböző városaiban működő genetikai laboratóriumokban, a szállítás és más okok miatti kétes eredményekkel. Egyetemünk genetikai laboratóriuma 2 éve végez citogenetikai vizsgálatokat leukémiás gyermekeknél. Immunhisztokémiával és immunocytológiával, monoklonális antitestek felhasználásával meg tudjuk állapítani, hogy a lymphoblastok a B- vagy T-sejtsorhoz tartoznak és a differenciálódás milyen fokán következett be a malignus transformatio és a kóros klón kialakulása. A 200 feletti sejtfelszíni és citoplazmái antigén közül (CD-cluster of differentiation) csak néhány specifikus a B- illetve T-sejtsorokra, így a B-sejtsorra jellemző a



**3. ábra.** Túlélési görbe az immunofenotípus szerint

CD79 és immunoglobulinok jelenléte, míg a T-sejtsorra jellemző a TCR (T cell receptor) és a citoplazmai CD3. A B-sejtsort tovább oszthatjuk a maturatio szerint korai pre-B (pre-pre-B vagy pro-B sejtek), pre-B, tranzitios pre-B és érett B-sejtekre, a T-sejtsort pedig korai, közepesen érett és érett thymocytákra. A sejtsorok meghatározásának prognosztikai és terápiás jelentősége van. A precursor-B sejtés ALL teszi ki a gyermekkori akut lymphoblastos leukémiák 80-85%-át, jellemző antigénei a CD79a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD21. A CALLA-nak is nevezett (common ALL antigen) CD10 antigén a precursor-B sejtés lymphoblastok 80%-án megtalálható és kedvező prognózist jelez, akárcsak a CD34 jelenléte. A CALLA negativitás gyakran társul a MLL gén átrendeződésével és t(4;11) translocatioval, klinikailag gyakoribb csecsemőkben és súlyos a prognózisa [6]. A pro-B CD10 pozitív de citoplazmai és sejtfelszíni immunoglobulin nélküli ALL a betegek 60-70%-ban van jelen és jobb a prognózisa. A pre-B sejtek immunoglobulint tartalmaznak a citoplazmájukban, ami egy intermedier érési stádiumot jelez. Az átmeneti pre-B ALL (3%) a sejtfelszínen immunoglobulin nehéz láncot expresszál de könnyű lánc nélkül. Az ALL-es betegek körülbelül 2-3%-ában érett B-sejtből indul ki a malignus transformatio. A diagnózishoz szükséges a sejtfelszíni immunoglobulinok kimutatása. Morfológiailag az L3-as FAB típusnak felelnek meg, klinikailag extramedullaris, főleg hasi, cerebrealis, cervicalis daganatokban, KIR érintettségben nyilvánul meg. Az érett B-sejtés ALL tulajdonképpen a Burkitt vagy Burkitt-szerű non-Hodgkin lymphoma szisztémás megjelenése, a kezelése is a non-Hodgkin lymphomáéval egyezik meg [4, 5]. A T-sejtés ALL a CD3, CD7, CD2, CD5 jelenléte alapján diagnosztizálható, gyakoribb az idősebb fiúgyermekekben, hyperleucocytosisal és gyakran mediastinalis tumorról, pleura érintettséggel társul. A prognózis kedvezőtlenebb a precursor-B ALL-hez viszonyítva, habár az intenzívebb kezelési módok csökkenteni látszanak ezt a különbséget [8]. Kedvezőtlen lefolyás főleg azokban az esetekben jelentkezik, amelyeket immunológiailag a sejtfelszíni CD3 jelenléte, a CD2 és CD5 expresszió hiánya és CD10 negativitás jellemez. Az ALL esetek 1/3-ban mieloid markerek is jelen vannak a sejtfelszínen. Ezeknek az eseteknek csak akkor rosszabb a prognózisuk, ha egyidejűleg kedvezőtlen citogenetikai és

molekuláris genetikai elváltozások is jelen vannak, mint pl. a MLL vagy TEL-AML1 gének átrendeződése [10]. Mieloid marker coexpressio jelenléte ALL-ben nem indokolja a terápia módosítását.

A multicolor/multiparaméteres áramlásos citometria egyazon sejten expresszált maximum 5 különböző antigént képes kimutatni és eléggé érzékeny teszt arra, hogy kimutassa a blaszt populáció klonalitását valamint a fenotípus szerinti abnormalis sejteket  $10^{-4}$  szenzitivitással. Természetesen a CD13 és CD33 panmyeloid, a CD15, CD14, CD11c monocytára jellemző markerek segítségével az immunofenotípezésnek szerepe van az ALL-nek az akut mieloid leukémiától való elkülönítésében is.

A különböző ALL típusok százalékos megoszlását, immunológiai jellemzőit a **3. táblázat** mutatja be.

Beteganyagunkban is ehhez hasonló megoszlását találtuk a különböző immunofenotípusú ALL formáknak: a precursor-B ALL 76%-ban volt jelen, a T-sejtés ALL 17,2%-ban, mindössze az érett B-sejtés ALL jelentkezett a megszo- kottnál gyakrabban (6,8%), ami az alacsony esetszám miatt fordulhatott elő.

A két leggyakoribb ALL forma, a pro-B CALLA pozitív és a T-sejtés ALL kliniko-biológiai jellemzőit a **4. táblázat** mutatja be.

A lymphoblast immunofenotípusának prognosztikai szerepét a vizsgált betegek esetében is láthattuk, ahol a precursor-B sejtés ALL betegek 5 éves túlélése 57% volt, míg a T-sejtés leukémiáké 2 év után alig 40%-osra becsülhető, továbbá egyetlen érett B-sejtés ALL eset (2) sem élte túl a betegséget, a diagnózis utáni első három hónapban elhaláloztak. A különbség szignifikáns ( $p < 0,001$ ). Pui Ch-H. et al. 1999-ben az Amerikai Egyesült Államokban 2055 betegen vizsgálta a 10 éves túlélést az immunofenotípus és nem függvényében. B-sejtsorú ALL esetében szignifikáns különbség jelentkezett a 10 éves túlélésben a lányok és fiúk között a lányok javára 83,9%-os túléléssel, a fiúk 78,6%-os túléléssel szemben ( $p = 0,108$ ), míg a T-sejtés ALL esetében a nemek között nem mutatkozott különbség a túlélésről illetően, amely sokkal alacsonyabb, 54% volt [3]. Az amerikai eredményekhez képest sokkal szerényebb saját eredmények okai összetettek, sokrétűek, amelyek közül a legfontosabb a pontos diagnózis felállításának nehézsége, ami

**3. táblázat.** A gyermekkori ALL immunológiai felosztása (Rubnitz és Pui C-H. után, 2008) [7]

Immunofenotípus	Antigén expresszió	Gakoriság
Pre- pre- B (pro-B)	CD19+, CD22+, CD79a+, CD10±, cI $\mu$ -, sI $\mu$ □-, Sig□-	55 - 60%
Pre- B	CD19+, CD22+, CD79a+, CD10±, cI $\mu$ +, sI $\mu$ -, sI $\mu$ □-, sI $\mu$ □-	20 - 25%
Átmeneti (tranzitios) Pre- B	CD19+, CD22+, CD79a+, CD10±, cI $\mu$ +, sI $\mu$ +, sI $\mu$ □+, sI $\mu$ □-	3 - 5%
Érett B	CD19+, CD22+, CD79a+, CD10±, cI $\mu$ +, sI $\mu$ +, sI $\mu$ □+, sI $\mu$ □+	2 - 3%
T	cCD3+ si CD7+, plus CD5+ sau CD2+	13 - 15%

**4. táblázat.** Az ALL kliniko-biológiai jellemzői immunofenotípusok szerint

Jellemzők	T-sejtes ALL	Pro-B CALLA pozitív ALL
Életkor	>10 év	3-5 év
Kezdeti fehérvérsejtszám	magas	normál vagy alacsony
Citogenetika	pseudodiploidia	hyperdiploidia
KIR érintettség	gyakori	ritka
Prognózis	kedvezőtlen	kedvező

alatt a csontvelő morfológiai, immunológiai, citogenetikai és molekuláris biológiai vizsgálatának szinkron elvégzése értendő. Például a csontvelő immunológiai vizsgálatát már 1960-as évektől végzik az Amerikai Egyesült Államokban, Marosvásárhelyen 2001-től sporadikusan végezzük, a 2001-2007-es időszakban a betegek 69%-nál volt elvégezhető a vizsgálat. Citogenetikai vizsgálatot a csontvelőből néhány éve kezdtek végezni nálunk, az eredmények még nem meghatározóak, habár ennek a vizsgálatnak meghatározó szerepet kellene betölteni a rizikó csoportok megállapításában. Molekuláris biológiai vizsgálatokat az USA-ban 1988-tól végeznek ALL-es gyermekeknél, egyetemünkön ezt a kivizsgálási módszert 2009-ben alkalmaztuk először BCR/ABL génátrendeződés kimutatására leukémiás betegben. A diagnózis teljessége mellett a túlélési eredményeket természetesen más körülmények is befolyásolják, mint egyes citosztatikumok hiánya, a szupportív terápia és gyermek intenzív ellátás hiányosságai, hiányos hygienés körülmények, nemrég beinduló és csak kevés beteg számára elérhető családi donoros csontvelő-átültetés lehetősége és nem utolsósorban a gyermek hemato-onkológus szakember képzés hiánya, ugyanis az a kevés gyermekgyógyász, aki ezt a specialitást választotta, saját erejére, autodidakta képzésre volt és van utalva.

## Következtetések

Az ALL diagnózisához napjainkban már nem elegendő a lymphoblast morfológiai és citokémiai jellemzése, hanem szükség van citogenetikai, immunológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokra.

2001-től van lehetőségünk az áramlásos citometria vizsgálat elvégzésére, amelyet azonban a 2001-2007-es periódusban csak a betegek 69%-nál sikerült elvégezni.

A lymphoblastok immunofenotípezálásának fontos szerepe van az ALL diagnózisában és differenciáldiagnózisában,

a rizikó csoportokba való pontosabb beosztásban, a legalkalmasabb kezelési mód megválasztásában és a prognózis előrejelzésében.

A 29 betegnél, akiknél sikerült elvégezni a csontvelő áramlásos citometria vizsgálatát, 22 esetben (76%) volt precursor-B sejtes az ALL, 5 esetben (17,2%) indult ki T-sejtből az ALL és 2 betegben (6,8%) diagnosztizáltunk érett B-sejtes ALL-t.

Szignifikáns korrelációt lehetett kimutatni a lymphoblastok immunofenotípusa és a kumulatív túlélés között a 2001-2007-es periódusban, amely 57% volt a precursor-B ALL esetében, 40% a T-sejtes ALL-ben és 0% az érett B-sejtes ALL esetében.

## Irodalom

1. Aricò M., Valsecchi MG., Rizzari C. et al. – *Long-term results of the AIEOP-ALL-95 Trial for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster based chemotherapy*, J Clin Oncol 2008, 26 (2): 283-289.
2. Harris M.B., Shuster J.J., Carroll A. et al. – *Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study*, Blood 1992, 79 (12): 3316-3324.
3. Pui C-H., Boyett J.M., Relling M. et al. – *Sex Differences in Prognosis for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia*, Journal of Clinical Oncology, 1999, Vol 17, Issue 3 (March), 818.
4. Pui C-H., Evans W.E. – *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*, N Engl J Med, 2006, 354:166-178.
5. Pui C-H., Evans W.E. – *Acute lymphoblastic leukemia*, N Engl J Med 1998, 339 (9): 605-615.
6. Reaman G.H., Spoto R., Sensel M.G. et al. – *Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group*, J Clin Oncol 1999, 17(2): 445-455.
7. Rubnitz J.E., Pui C-H. – *Childhood acute lymphoblastic leukemia*, The Oncologist, 1997; 2:374-380.
8. Satake N., Sakamoto K. – *Acute lymphoblastic leukemia*, eMedicine Journal, July 11, 2006, Volume 7, Number 7. [emedicine.medscape.com/article/990113-overview](http://emedicine.medscape.com/article/990113-overview).
9. Sutcliffe M.J., Shuster J.J., Sather H.N. et al. – *High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative*, Leukemia 2005, 19 (5):734-740.
10. Trueworthy R., Shuster J., Look T. et al. – *Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group Study*, J Clin Oncol 1992, 10 (4): 606-613.