

И.А. Сухина, В.Ю. Никитин, С.Н. Колюбаева,
В.Н. Семелев, Д.А. Горностаев, В.Н. Цыган,
А.М. Иванов, Ю.В. Никитин

Взаимосвязь генетических аномалий и иммунофенотипических особенностей бластных клеток при острых миелоидных лейкозах

Военно-медицинская академия им. М.С. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Дается характеристика иммунофенотипов острых миелоидных лейкозов с наиболее часто встречающимися генетическими аберрациями согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (2008). Представлены случаи острых миелоидных лейкозов, иммунофенотипические особенности которых указывали на присутствие конкретных рекуррентных аномалий. Так, обнаружение в костном мозге больного популяции бластных миелоидных клеток с иммунофенотипом $CD117^{+++}$, $CD34^{+++}$, $HLA-DR^{+++}$, $CD38^{+++}$, $суМРО^{+++}$, $CD13^{dim}$, $CD33^{dim}$, $CD56^{+}$, $CD19^{dim}$, $CD7^{dim}$ позволило предположить наличие транслокации $t(8;21)$. У другого пациента были обнаружены 2 популяции лейкозных бластов: 1) незрелые клетки с высокой экспрессией антигенов $CD34$, $CD117$, с признаками дифференцировки в направлении моноцитопоза и гранулоцитопоза с коэкспрессией антигена $CD2$, что указывало на повреждение в 16 хромосоме ($inv(16)$ или $t(16;16)$). В третьем случае присутствие бластной популяции с ярко выраженной гомогенной экспрессией пан-миелоидного антигена $CD33$, более слабой экспрессией пан-миелоидного антигена $CD13$ и раннего стадийспецифического миелоидного маркера $CD117$, позитивной экспрессией антигенов $CD9$, $CD64$, $суМРО$ и негативной по экспрессии $HLA-DR$, дало возможность прогнозировать аномалию $t(15;17)$. У всех пациентов предполагаемые хромосомные нарушения подтвердились цитогенетическим анализом.

Ключевые слова: повторяющиеся генетические аномалии, аберрантный иммунофенотип, острые миелоидные лейкозы, проточная цитометрия, иммунофенотипический анализ.

Введение. При острых лейкозах бластные клетки рассматриваются как злокачественные аналоги нормальных клеток на ранних стадиях лимфо- и миелопоэза [15]. По набору мембранных и цитоплазматических антигенов можно установить линейную принадлежность, стадию дифференцировки и функциональное состояние клетки. Как правило, определенный иммунофенотип лейкозных клеток является следствием структурных перестроек хромосом. Повторяющиеся хромосомные нарушения, обнаруживаемые в лейкозных клетках миелоидного происхождения, отражены в названиях нозологических форм острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), которые в классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2008 г. составляют подгруппу «ОМЛ с повторяющимися (рекуррентными) генетическими аномалиями» [10]:

ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22)$; *AML1/ETO* (тоже, что и *RUNX1-RUNX1T1* в 4-м издании ВОЗ);

ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; *CBFB-MYH11*;

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) с $t(15;17)(q22;q12)$; *PML-RARA*;

ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23)$; *MLLT3-ML*;

ОМЛ с $t(6;9)(p23;q34)$; *DEK-NUP214*;

ОМЛ с $inv(3)(q21;q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$; *RPN1-EVI1*;

ОМЛ (мегакариобластный) с $t(1;22)(p13;q13)$; *RBM15-MKL1*.

ОМЛ с мутацией гена нуклеофосмина *NPM1* (условная форма);

ОМЛ с мутацией гена *CEBPA* (условная форма).

Каждая из указанных структурных перестроек хромосом приводит к образованию слитного гена, кодирующего химерный белок. Эти хромосомные нарушения ассоциированы с аберрантным иммунофенотипом лейкозных клеток, поэтому иммунофенотипический анализ дает возможность заранее предполагать наличие определенной генетической аномалии при соответствующем иммунофенотипе бластов и предварительно дифференцировать различные варианты ОМЛ [7, 12, 13]. В таких случаях на первый план выходит проточная цитометрия как самый быстрый метод анализа.

К наиболее частым хромосомным аберрациям, сопровождающимся характерными иммунофенотипическими особенностями, относятся **$t(8;21)$** , при которой наблюдается слабая степень (*dim*) экспрессии антигенов $CD13/CD33$ и наличие коэкспрессии $CD19/CD56$; $inv(16)$ или $t(16;16)$, при которых выявляются две

популяции опухолевых клеток с миелоцитарной и монобластной дифференцировкой и наличие экспрессии антигена CD2; t(15;17), при которой обнаруживается экспрессия маркеров гранулоцитарной дифференцировки в сочетании с отсутствием экспрессии HLA-DR. Транслокация t(9;11) также является достаточно частой, позволяющей выделить конкретную нозологическую форму ОМЛ и, как правило, встречается при острых моноцитарных и миеломоноцитарных лейкозах по French-American-British (ФАБ)-классификации (ОМЛ-М5а или ОМЛ-М4).

В подгруппу ОМЛ с повторяющимися генетическими аномалиями в 4-й редакции ВОЗ также были введены две условные (временные) нозологические формы с наличием мутаций генов *NPM1* и *CEBPA*. Мутации гена *NPM1* относятся к числу наиболее часто повторяющихся генетических повреждений при ОМЛ. Для полной характеристики этих форм и выделения их в отдельные нозологические формы необходимы дополнительные исследования [14]. Эти варианты ОМЛ представляют особый интерес с учетом их благоприятной прогностической значимости для пациентов с нормальным кариотипом. У всех больных с нормальным кариотипом, включая тех, у кого обнаруживаются мутации *NPM1* и *CEBPA*, важным является обнаружение мутаций гена *FLT3*. Хотя ОМЛ с мутациями *FLT3* не рассматривается как отдельный вариант заболевания, данные мутации могут служить прогностическими критериями. Так, при выявлении ОМЛ-М1/М2 с сочетанным отсутствием экспрессии CD34 и HLA-DR, дополнительно к исследованию мутации гена *NPM1*, можно рекомендовать исследование на наличие мутации *FLT3-ITD*, которая связана с неблагоприятным прогнозом.

Острый миелоидный лейкоз с t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1. Этот вариант лейкоза составляет около 5% всех случаев ОМЛ и 10% ОМЛ-М2 по ФАБ-классификации и встречается преимущественно у молодых пациентов. Редко диагностируется у детей до 3 лет и у больных старше 60 лет. Предполагаемый нормальный аналог – миелоидная стволовая клетка с потенциальной дифференцировкой по нейтрофильному ряду. В транслокацию t(8;21)(q22;q22) вовлечен ген *RUNX1* (*AML1*), кодирующий α -субъединицу гетеродимерного белкового комплекса *CBF* (core binding factor) и ген *RUNX1T1* (*ETO*) [1].

Опухолевые клетки этой нозологической формы ОМЛ часто экспрессируют не только миелоидные маркеры, но и маркеры лимфоидных клеток. Бласты обычно слабопозитивны по панмиелоидным маркерам CD13 и CD33 [6]. Эта особенность ассоциирована только с транслокацией t(8;21) и не встречается при других вариантах ОМЛ. Характерным свойством является также коэкспрессия антигенов CD19⁺CD56⁺, относящихся к В-клеточным и НК-клеточным маркерам, соответственно [4]. Экспрессия CD56 имеет неблагоприятное прогностическое значение. Наряду с CD19 могут экспрессироваться и другие В-клеточные антигены – PAX5 и цитоплазматический CD79a или

Т-клеточный антиген CD7. При данном варианте ОМЛ практически все бласты экспрессируют CD34, CD117 и MPO. Иногда в опухолевых клетках определяются признаки асинхронного созревания, проявляющиеся в коэкспрессии CD34 и CD15. В некоторых случаях обнаруживается слабая экспрессия TdT. Таким образом, главной иммунофенотипической особенностью ОМЛ t(8;21)(q22;q22) является то, что на опухолевых клетках снижена экспрессия панмиелоидных маркеров CD13/CD33 и часто наблюдается экспрессия лимфоидных антигенов. Данная форма острого лейкоза обычно характеризуется хорошей реакцией на терапию, высокой частотой наступления полной ремиссии и длительным периодом выживаемости без проявления признаков заболевания в случае лечения высокими дозами цитарабина в фазе консолидации [1].

На рисунке 1 представлен случай ОМЛ, иммунофенотипические особенности которого позволили прогнозировать наличие t(8;21), что в дальнейшем подтвердилось цитогенетическим анализом. В отличие от других вариантов ОМЛ в данном случае на бластных клетках, располагающихся в области бластов (CD45^{dim}), отмечается снижение интенсивности экспрессии панмиелоидных антигенов CD13 и CD33, наличие экспрессии лимфоидных антигенов: В-клеточного CD19, НК-клеточного CD56 и Т-клеточного CD7.

ОМЛ с inv(16)(p13.1;q22) или t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11. Острый миелоидный лейкоз с аномалиями 16 хромосомы составляет 5–8% всех ОМЛ. По ФАБ-классификации соответствует ОМЛ-М4. Встречается преимущественно у лиц молодого возраста, но может диагностироваться во всех возрастных группах. Предполагаемый нормальный аналог – гемопоэтическая стволовая клетка с потенциалом дифференцировки в клетки гранулоцитарного и моноцитарного ряда. В лейкозных клетках у большинства больных с данным вариантом ОМЛ определяется inv(16)(p13.1;q22), менее часто t(p16;16)(p13.1;q22). И в том, и в другом случае происходит слияние гена *CBFB* на длинном плече 16 хромосомы (q22) с *MYH11* на коротком плече той же хромосомы (p13.1) с образованием химерного гена. Описаны редкие случаи ОМЛ и хронического миелолейкоза (ХМЛ), при которых одновременно выявляются inv(16)(p13.1;q22) и t(9;22)(q34;q11.2). При ХМЛ они обычно ассоциируются с переходом в фазу акселерации или бластного криза [2].

Лейкозные клетки у большинства больных с данной формой ОМЛ характеризуются сложным иммунофенотипом. Определяются разные популяции бластов: клоны миелобластов (ОМЛ-М1/М2 по ФАБ-классификации) которые экспрессируют антигены гранулоцитарного ряда CD13, CD33, CD117, CD15, CD65 и монобластов (ОМЛ-М5а/б по ФАБ-классификации), экспрессирующих антигены моноцитарного ряда CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36 [1, 2, 5]. Экспрессия моноцитарного антигена CD4 отмечается приблизительно в 20% случаев. В цитоплазме всех типов бластов при данной форме

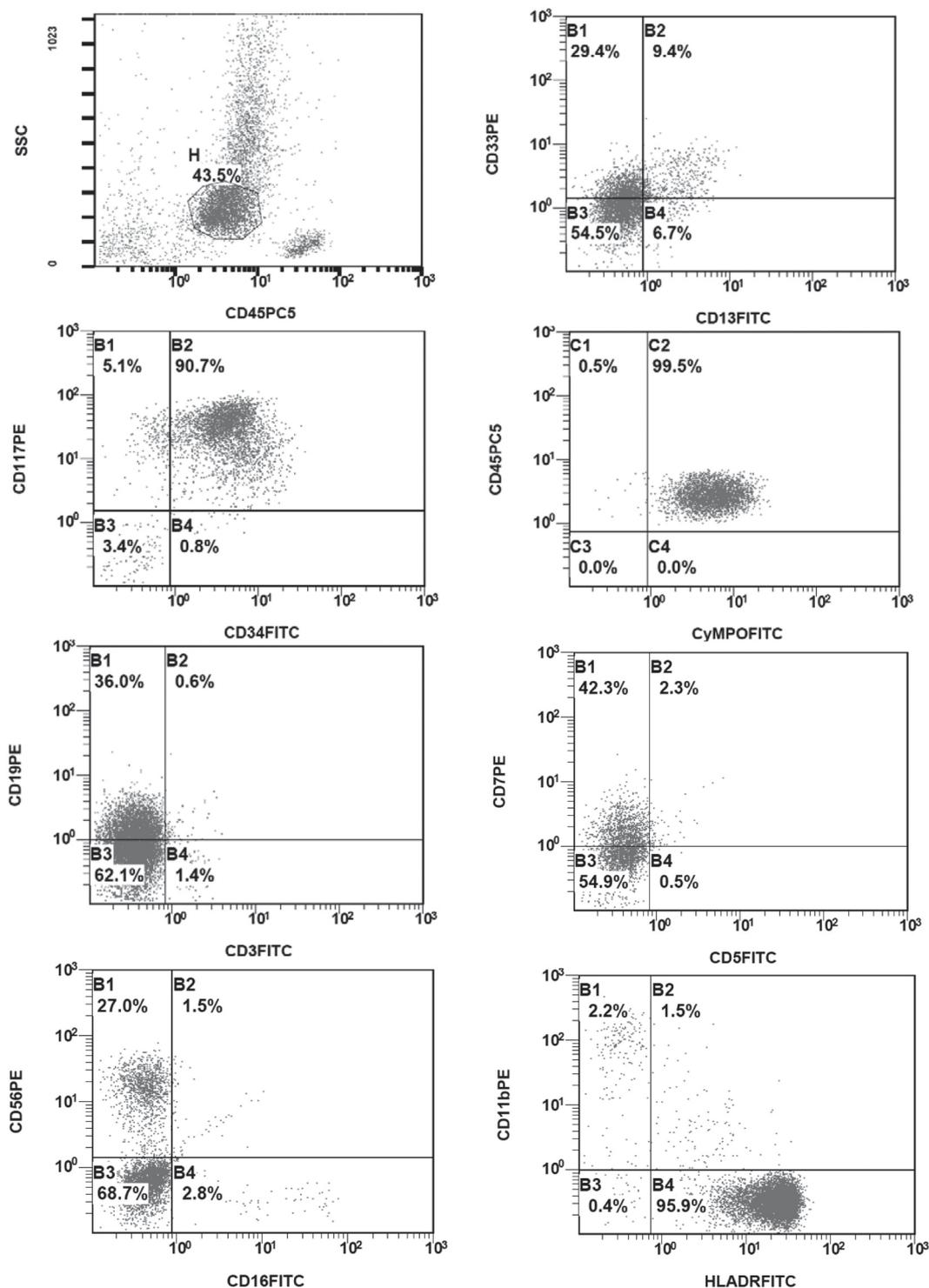


Рис. 1. Проточно-цитометрический анализ клеток лизированного цельного костного мозга больного ОМЛ с t(8;21) (q22; q22). Возраст 37 лет. На графике зависимости уровня экспрессии антигена CD45 от сигналов бокового светорассеяния SSC можно выделить зону бластных клеток (гейт H). В данном случае все бласты позитивны по антигенам CD117, CD34, MPO, HLADR, CD38; частично позитивны по CD56 (27%); слабо позитивны по CD33, CD19, CD7; CD4, CD64 и негативны по CD11b, CD13, CD15, CD16, CD36, CD65, TdT

ОМЛ обычно присутствует МРО. Для бластов также характерна выраженная экспрессия линейнонеограниченных маркеров – HLA-DR, CD34 (обычно на миелобластах), CD38. При проведении иммунофенотипирования особенно полезны следующие комбинации МКА: CD11b/HLA-DR/CD45 и CD11c/HLA-DR/CD45. Обычно клетки моноцитарного ряда должны быть HLA-DR⁺CD11b⁺⁺/HLA-DR⁺CD11c⁺⁺, а зрелые гранулоциты HLA-DR-CD11b⁺⁺/HLA-DR-CD11c⁺⁺ [11]. Часто наблюдается асинхронность созревания бластных клеток и выявляется коэкспрессия миелоидных антигенов и антигена CD2 (обусловлена эозинофилами), которая не считается специфической при установлении диагноза [8]. Результаты клинических исследований свидетельствуют о возможности достижения длительной полной ремиссии у больных при лечении цитарабином в высоких дозах в фазе консолидации, однако сроки выживаемости у пожилых пациентов ниже. При наличии мутаций гена *KIT* отмечается тяжелое течение заболевания и высокий риск развития рецидивов. Более благоприятный прогноз отмечается у больных при наличии трисомии по 22 хромосоме в качестве вторичной аномалии [2].

На рисунке 2 представлен случай ОМЛ, иммунофенотипические особенности которого позволили прогнозировать наличие повреждений в 16 хромосоме (*inv(16)* или ОМЛ с *t(16;16)*). В результате проточнocyтoметрического анализа у больного выявлены 2 популяции бластов: 1) незрелые клетки, расположенные в области бластов, с высокой экспрессией антигенов CD34, CD117, с признаками гранулоцитарной дифференцировки; 2) более зрелые клетки, расположенные в моноцитарной области, не экспрессирующие CD34, CD117, с признаками дифференцировки в направлении моноцитопоза и гранулоцитопоза с коэкспрессией антигена CD2. В дальнейшем цитогенетические исследования обнаружили *t(16;16)*.

Острый промиелоцитарный лейкоз с *t(15;17)* (*q22;q12*); *PML-RARA*. Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) с *t(15;17)(q22;q12)* характеризуется преобладанием в ПК и КМ аномальных промиелоцитов. По ФАБ-классификации соответствует варианту ОМЛ-М3. Выделяют гипергранулярный (типичный) и микрогранулярный (гипогранулярный) варианты ОПЛ. ОПЛ составляет 5–8% всех ОМЛ. Заболевание встречается преимущественно у лиц пожилого и среднего возраста, но может диагностироваться и у молодых людей. Оба варианта часто сопровождаются синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). Предполагаемый нормальный аналог – миелоидная стволовая клетка с потенциалом к дифференцировке в клетки гранулоцитарной линии [2]. При данной форме острого лейкоза ген α -рецептора ретиноевой кислоты (*RARA*) на 17q12 соединяется с геном ядерного регуляторного фактора (*PML*, ген промиелоцитарного лейкоза) на 15q22, что приводит к образованию слитного гена *PML-RARA*.

Имунофенотип ОПЛ является высокоспецифичным. Лейкозные клетки типичного (гиперграну-

лярного) варианта ОПЛ характеризуются высокими сигналами бокового светорассеяния (SSC^{high}) (рис. 3), а гипогранулярного – низкими сигналами бокового светорассеяния (SSC^{low}) (рис. 4) на гистограммах, полученных с помощью проточной цитометрии. И гиперклеточный и гипоклеточный ОПЛ негативны по экспрессии HLA-DR (в единичных случаях низкая экспрессия), что отличает данную форму лейкоза от других ОМЛ. Оба варианта характеризуются гомогенной экспрессией CD33, гетерогенной экспрессией CD13, выраженной экспрессией суМРО. Как правило, обнаруживается экспрессия CD64. Антиген CD9 также довольно часто позитивен при ОПЛ, хотя его экспрессия не является абсолютно специфичной для данной формы лейкоза. Поэтому его можно использовать в неясных случаях как дополнительный маркер при проведении дифференциального диагноза. Во многих случаях обнаруживается экспрессия антигена CD117, которая иногда бывает слабовыраженной. На опухолевых клетках обычно отсутствуют или слабо экспрессируются антигены CD34, CD11b, CD15, CD65. Атипичная экспрессия CD2 описана в 40–45% наблюдений. Экспрессия CD34, CD13, CD2 характерна для гипогранулярного варианта (рис. 4). Возможна коэкспрессия CD4^{dim} [9]. Отсутствие линейнонеограниченных антигенов при наличии высокой экспрессии миелоидных антигенов указывает на более выраженную гранулоцитарную дифференцировку бластов при остром промиелоцитарном лейкозе с *t(15;17)(q22;q12)*. Прогноз при данной форме острого лейкоза более благоприятный, чем при ОМЛ с другими рекуррентными цитогенетическими аномалиями. Экспрессия антигена CD56 на поверхности мембраны лейкозных клеток ассоциируется с менее благоприятным прогнозом [2].

На рисунках 3 и 4 представлены случаи ОМЛ, иммунофенотипические особенности которых позволили прогнозировать наличие *t(15;17)*. Лейкозные клетки, расположенные в гранулоцитарной области, в обоих случаях негативны по экспрессии HLA-DR, гранулоцитарным антигенам CD65, CD15 и позитивны по CD9. Гипогранулярный вариант отличался от гипергранулярного варианта позитивной экспрессией CD2 и CD34. В дальнейшем цитогенетические исследования в обоих случаях обнаружили *t(15;17)*.

ОМЛ с *t(9;11)(p22;q23)*; *MLLT3-MLL*. В классификации ВОЗ 2001 г. (3-е издание) эта нозологическая форма лейкоза имела название – ОМЛ с аномалией 11q23 (*MLL*). На рисунке 5 представлен случай ОМЛ с аномалией 11q23 соответствующий ФАБ-подтипу ОМЛ-М5b. В издании ВОЗ 2008 г. эта категория была пересмотрена, чтобы сосредоточиться на ОМЛ с *t(9;11)(p22;q23)*; *MLLT3-MLL*. Другая транслокация *MLL*, кроме той, что вовлекает *MLLT3*, должна быть указана в диагнозе. Другие аномалии *MLL*, такие как частичная тандемная дубликация *MLL*, не должны относиться к этой категории. *MLL (HRX)* участвует в образовании слитного гена при транслокациях с вовлечением 11q23 [2]. Данная форма ОМЛ встречается

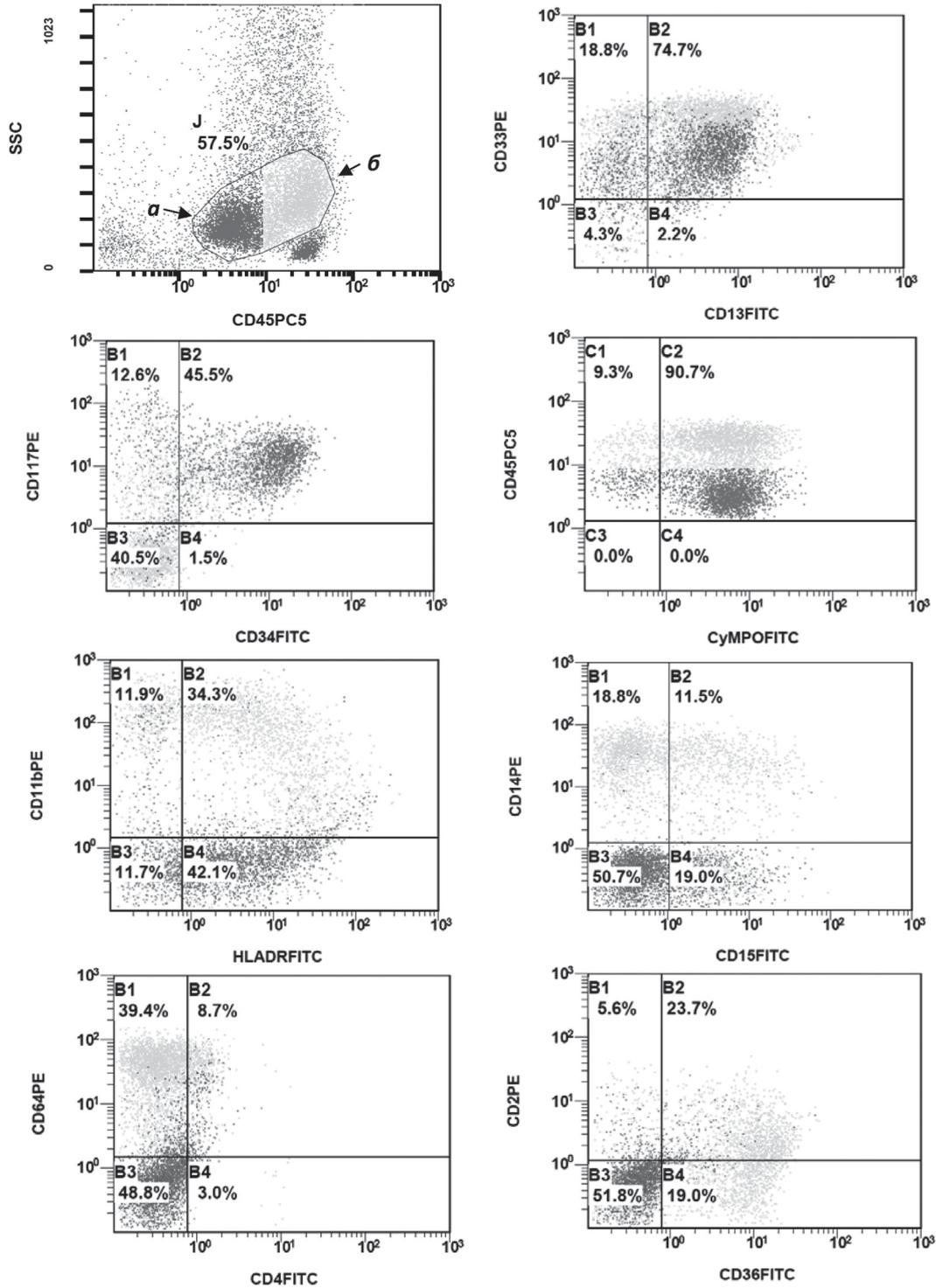


Рис. 2. Проточно-цитометрический анализ клеток лизированного цельного костного мозга больного ОМЛ с t(16;16) (p13.1; q22). Возраст 27 лет. На графике зависимости уровня экспрессии антигена CD45 от сигналов бокового светорассеяния SSC можно выделить зону бластных клеток (гейт J), разделенную условно на 2 популяции – а (миелобласты, красный цвет) и б (монобласты, зеленый цвет). В данном случае обе популяции позитивны по антигенам CD13, CD33, CD117, суMPO, HLADR; миелобласты (красный цвет) экспрессируют CD34, CD15, частично CD65; монобласты (зеленый цвет) экспрессируют CD14, CD11b, CD 11c, CD64, CD36, CD2

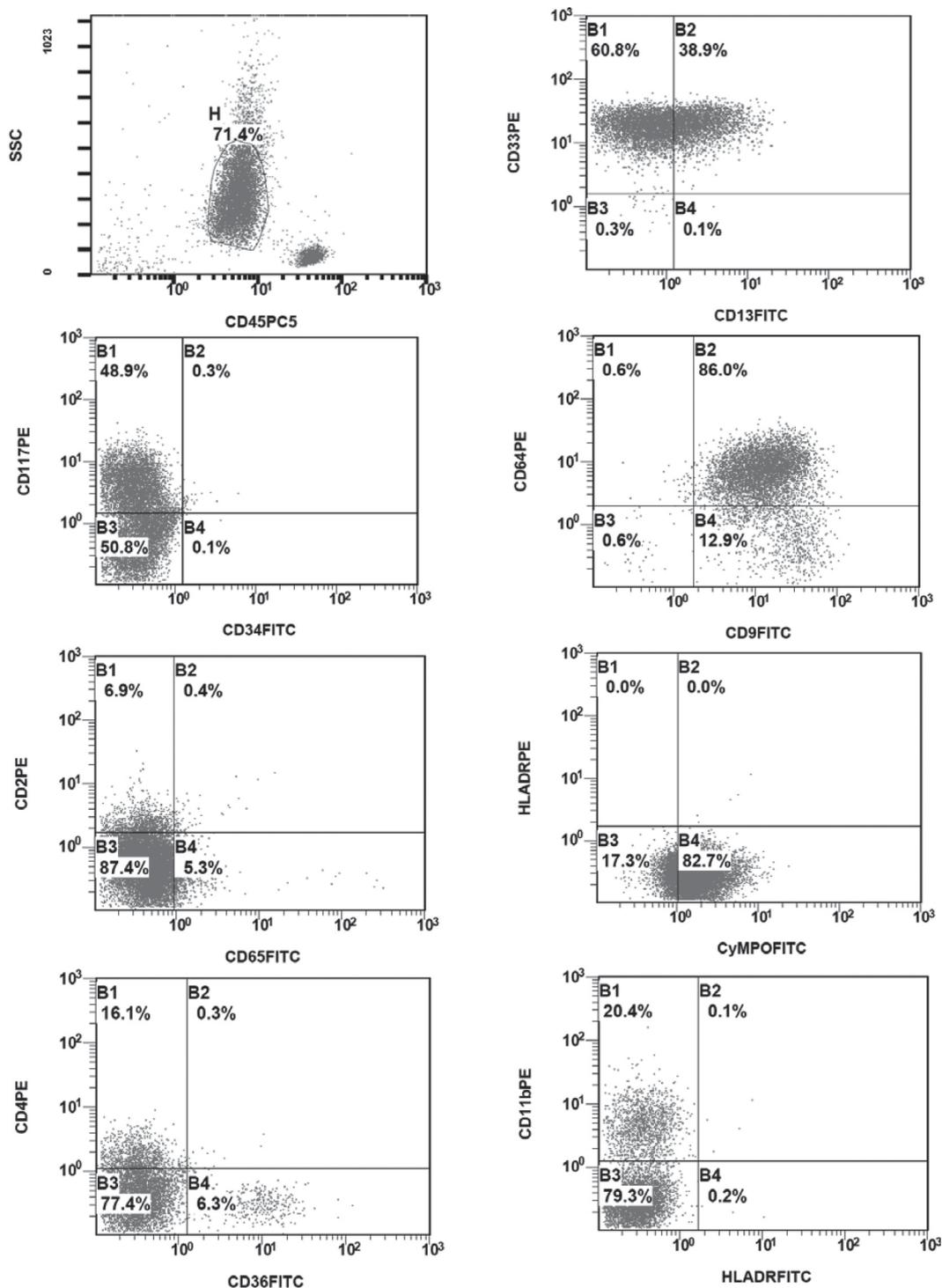


Рис. 3. Проточно-цитометрический анализ клеток лизированного цельного костного мозга больного ОПЛ с t(15;17) (q22;q12). Возраст 20 лет. Гипергранулярный вариант. На графике зависимости уровня экспрессии антигена CD45 от сигналов бокового светорассеяния SSC можно выделить зону бластных клеток (гейт H), лежащих в гранулоцитарной области (SSC^{high}). В данном случае бласты позитивны по антигенам CD33, CD13^{dim}, CD117^{dim}, суMPO, CD9, CD64. Частично позитивны по CD11b (21,2%) и негативны по антигенам HLA-DR, CD34, CD65, CD36, CD14, CD15, CD16, CD56, CD2, CD4

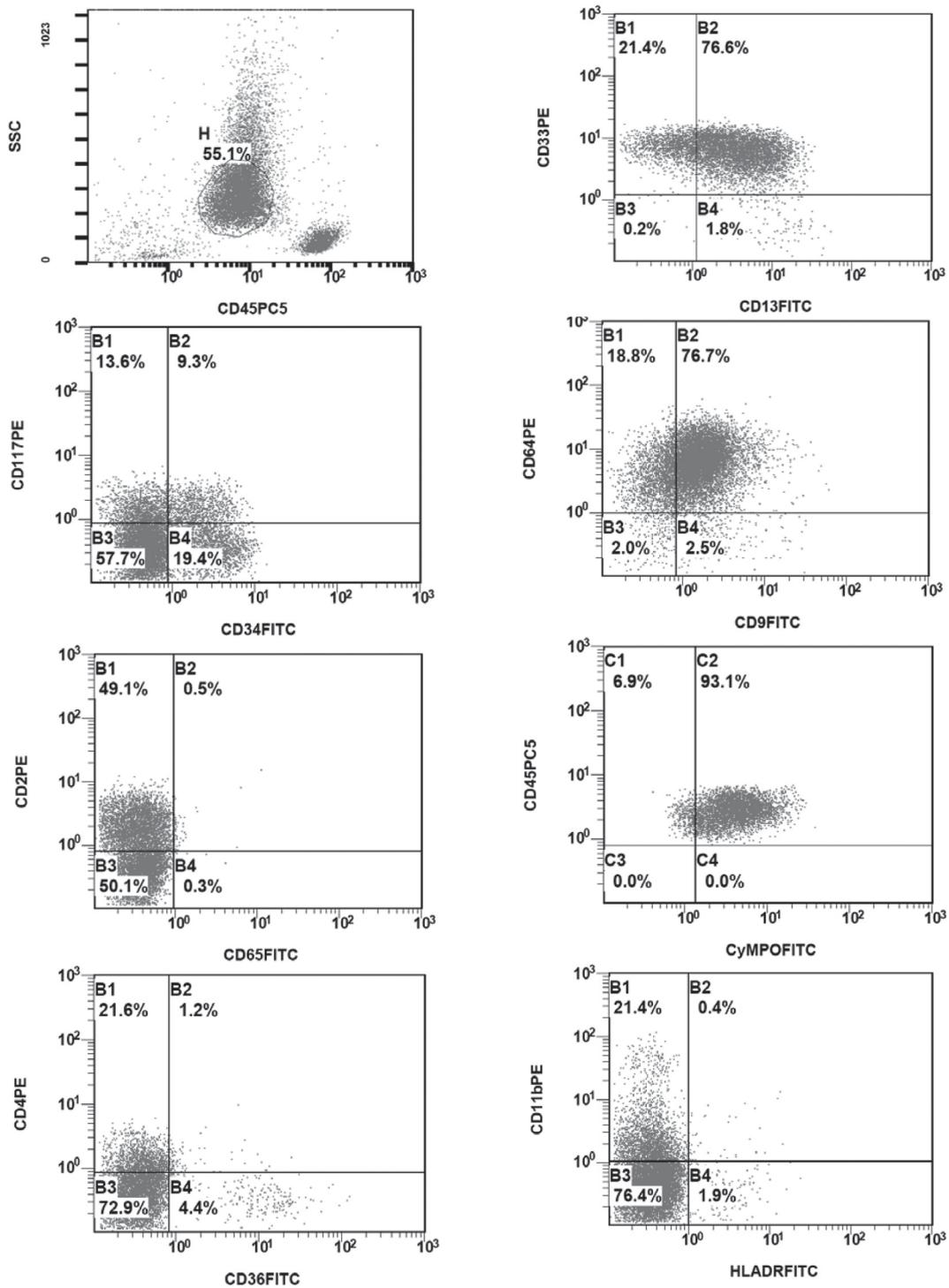


Рис. 4. Проточно-цитометрический анализ клеток лизированного цельного костного мозга больной ОПЛ с t(15;17) (q22; q12). Возраст 20 лет. Гипогранулярный вариант. На графике зависимости уровня экспрессии антигена CD45 от сигналов бокового светорассеяния SSC можно выделить зону бластных клеток (гейт H), расположенных в нижней части гранулоцитарной области (SSC^{low}). В данном случае бласты позитивны по антигенам CD33, CD13, сyMPO, CD9, CD64, CD2^{dim}. Частично позитивны по CD34^{dim} (28,9%), CD117^{dim} (22,9%), CD11b (21,4%), CD4^{dim} (21,4%) и негативны по антигенам HLA-DR, CD65, CD36, CD14, CD15, CD16, CD56

в любом возрасте (у взрослых 2% от всех ОМЛ), чаще у детей (9–12% ОМЛ). Предполагаемый нормальный аналог лейкозных клеток – гемопоэтическая стволовая клетка с мультилинейным потенциалом. Транслокация $t(9;11)(p22;q23)$, как правило встречается при острых моноцитарных и миеломоноцитарных лейкозах (соответствует ОМЛ-М5а или ОМЛ-М4 по ФАБ-классификации), иногда – при ОМЛ с/без признаков созревания (ОМЛ-М1/М2 по ФАБ-классификации).

При данной форме лейкоза в 80–100% случаев экспрессируются антигены CD33, CD4, CD64, HLA-DR, CD11b, CD15, CD38, реже CD34, CD13, CD14. Коэкспрессия лимфоидных маркеров CD2 и CD7 не является отличительной особенностью [4]. У детей лейкозные клетки характеризуются выраженной экспрессией антигенов CD33, CD4, CD65 и HLA-DR, слабо экспрессируются CD34, CD13 и CD14. У взрослых больных опухолевые клетки экспрессируют дифференцировочные антигены клеток моноцитарного ряда CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36, а в цитоплазме клеток выявляется лизоцим. Экспрессия CD34, CD117, CD56 является вариабельной. Прогноз при ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23)$ благоприятнее, чем у больных ОМЛ с другими аномалиями 11q23.

ОМЛ с мутациями гена *NPM1*. При этом типе ОМЛ, возникающем, как правило, de novo и включенном в качестве условной (provisional) нозологической формы в классификацию ВОЗ (2008), мутации подвергается экзон 12 гена нуклеофосмина *NPM1*. Маркером мутации данного гена может служить aberrантная экспрессия в цитоплазме опухолевых клеток нуклеофосмина (*NPM*). Мутации вызывают критические изменения структуры нативного белка *NPM*, локализованного в ядре и ведут к повышению его транспортировки из ядра и aberrантному накоплению в цитоплазме клеток. Диагноз заболевания основывается на идентификации генетического повреждения при использовании молекулярно-биологических методов и/или иммуногистохимическом определении в парафиновых срезах трепанобиоптатов КМ aberrантной цитоплазматической экспрессии *NPM*. Важным является обнаружение aberrантной экспрессии белка *NPM* в цитоплазме лейкозных клеток и может служить заменой молекулярно-генетических исследованиям. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к белку *NPM* позволяет выявить вовлечение в патологический процесс клеток двух или более линий миелопоэза, что определяет широкий спектр морфологических проявлений при этом типе ОМЛ. Мутации гена *NPM1* относятся к числу наиболее часто повторяющихся генетических повреждений при ОМЛ. С возрастом их частота увеличивается (у детей – 2–8%, а у взрослых – 27–35%). Мутации *NPM1* сочетаются с нормальным кариотипом. Примерно у 40% больных ОМЛ с мутациями *NPM1* в неопластических клетках в процессе развития заболевания обнаруживается слитный ген *FLT3-ITD*. Предполагаемый нормальный аналог лейкозных клеток при ОМЛ с мутациями гена *NPM1* – гемопоэтическая стволовая клетка [3]. При

клиническом обследовании у больных могут обнаруживаться экстрамедуллярные очаги поражения в деснах, лимфатических узлах, коже. Фенотипические особенности данной формы лейкоза могут соответствовать любому ФАБ-подтипу, за исключением ОМЛ-М3 [4]. Установлена тесная связь между острым миеломоноцитарным (ОМЛ-М4) и моноцитарным (ОМЛ-М5а и, особенно, М5b) лейкозами и наличием мутации гена *NPM1*. В последнем случае мутации *NPM1* обнаруживаются в лейкозных клетках 80–90% больных. Кроме того, мутации этого типа определяются при ОМЛ с/без признаков созревания (ОМЛ-М1/М2) и при остром эритролейкозе. (ОМЛ-М6). У ряда больных ОМЛ с мутациями гена *NPM1* выявляются признаки мультилинейной дисплазии, но при этом субстратные клетки имеют нормальный кариотип и являются CD34-отрицательными. Процентное содержание бластных клеток в КМ больных ОМЛ с мутациями гена *NPM1*, как правило, выше, чем при других формах ОМЛ с нормальным кариотипом. ОМЛ с мутацией гена *NPM1*, как правило, характеризуется хорошим ответом на индукционную терапию и при отсутствии сопутствующих мутаций гена *FLT3-ITD* – в целом благоприятным прогнозом [3].

В blastax при ОМЛ с мутациями гена *NPM1*, помимо миелоидных антигенов CD13, CD33 (яркая экспрессия) и MPO, часто обнаруживается экспрессия маркеров дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда, в том числе CD14, CD11b и CD64. Установлено, что независимо от степени зрелости, опухолевые клетки негативны по антигену CD34. В случае ОМЛ-М1/М2 наблюдается сочетанное отсутствие экспрессии HLA-DR и CD34.

На рисунке 6 представлен случай ОМЛ, соответствующий ОМЛ-М1 ФАБ-подтипу, иммунофенотипические особенности которого позволили прогнозировать наличие мутаций в гене *NPM1*. Лейкозные клетки, расположенные в области blastax, характеризуются яркой гомогенной экспрессией миелоидного антигена CD33 при отсутствии экспрессии CD13, сочетанным отсутствием экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR. В дальнейшем молекулярно-генетические исследования выявили мутацию гена *NPM1* и слитный ген *FLT3-ITD*. Обнаружение *FLT3-ITD* связывают с неблагоприятным прогнозом.

Заключение. Современная классификационная система ВОЗ опухолей кроветворных и лимфоидных тканей, созданная на основе объединенного анализа клинических, цитоморфологических, иммунофенотипических и цитогенетических данных, продолжает совершенствоваться. В этом аспекте острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу заболеваний с разнообразным антигенным профилем, где главным диагностическим и прогностическим признаком являются повторяющиеся хромосомные аномалии. Тем не менее, иммунофенотипирование с помощью мультипараметрической проточной цитометрии по-прежнему играет ведущую роль в диагностике этих

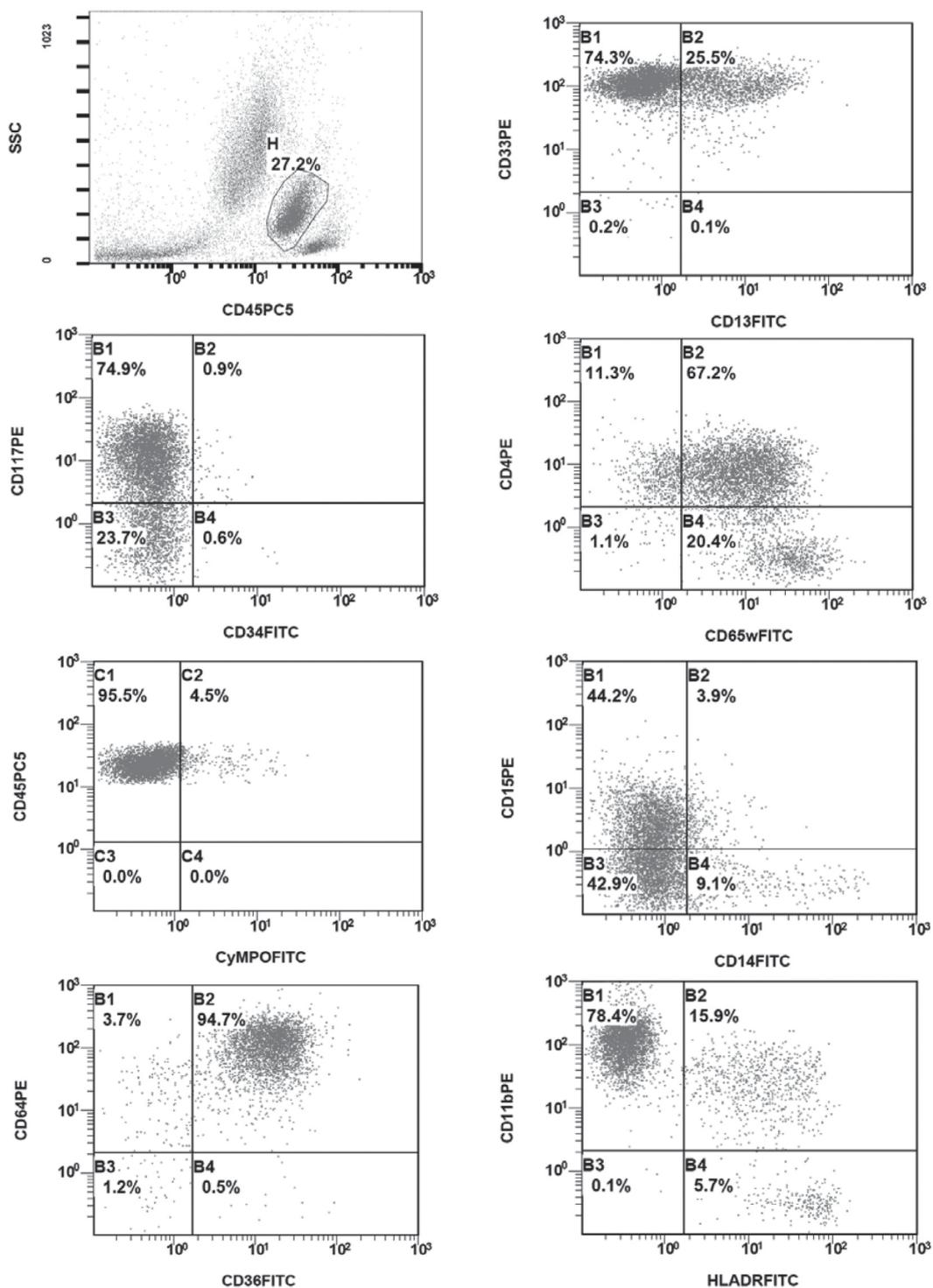


Рис. 5. Проточно-цитометрический анализ клеток лизированного цельного костного мозга больного острым моноцитарным лейкозом, NOS (ОМЛ-М5b). Возраст 76 лет. В кариотипе бластных клеток обнаружен клон с t(6;11) (q27; q23). На графике зависимости уровня экспрессии антигена CD45 от сигналов бокового светорассеяния SSC можно выделить зону бластных клеток, расположенных в расширенной моноцитарной области (CD45^{bright}). Бластные клетки экспрессируют антигены: характерные для монобластов CD4, CD64, CD11b, CD11c, CD36, миелоидных клеток CD13 (частично), CD33, CD117, CD15(dim), CD65, маркер NK-клеток CD56, HLA-DR (частично) и негативны по CD34, суМРО, CD14, CD2, nuTdT

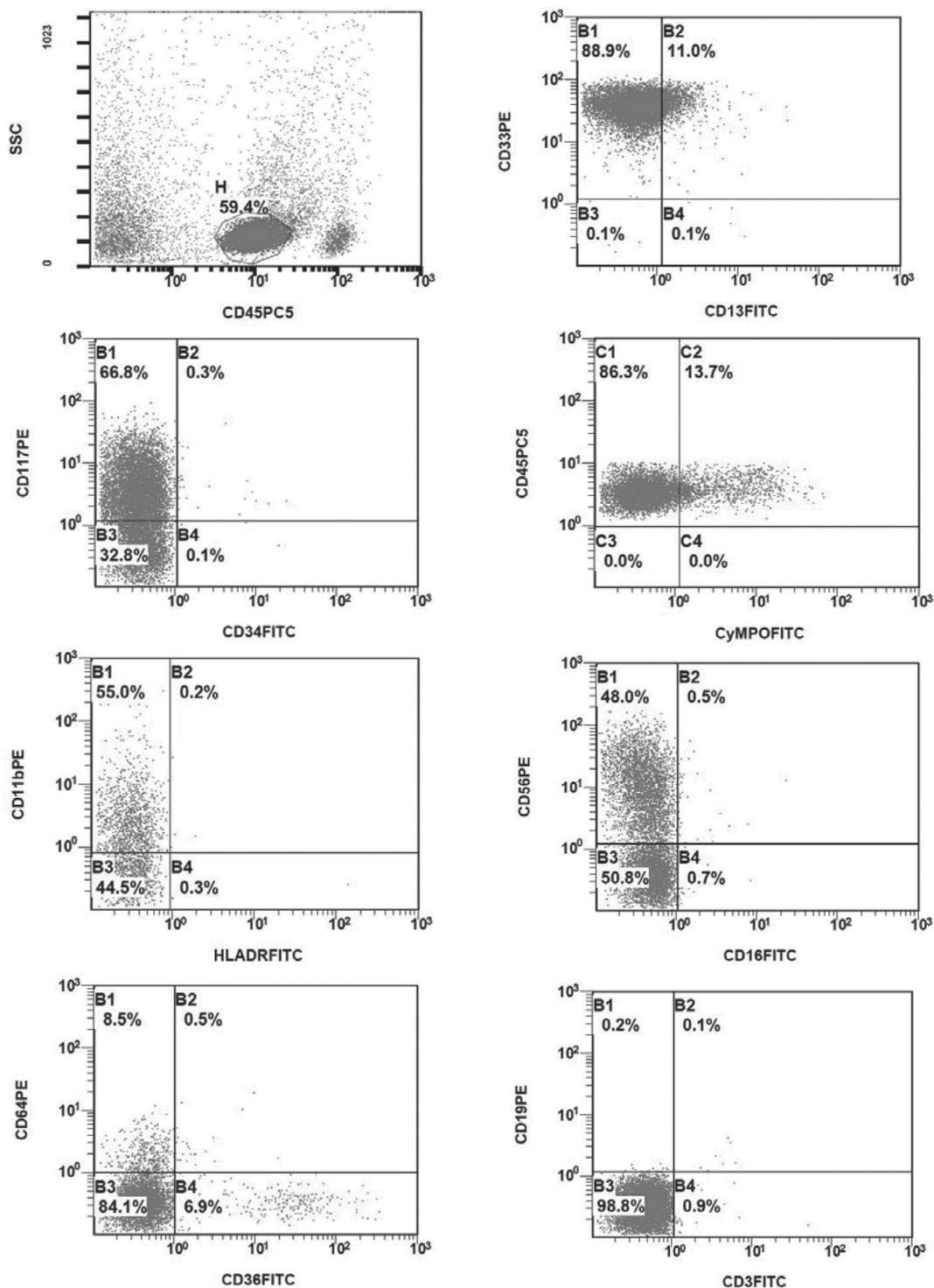


Рис. 6. Проточно-цитометрический анализ клеток лизированного цельного костного мозга больного ОМЛ с мутацией гена *NPM1* (ФАБ-подтип ОМЛ-М1). Возраст 40 лет. На графике зависимости уровня экспрессии антигена CD45 от сигналов бокового светорассеяния SSC можно выделить зону бластных клеток (гейт H), расположенных в области кластеров (CD45^{dim}). Опухолевые класты отличаются яркой гомогенной экспрессией антигена CD33, сочетанным отсутствием экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR. Лейкозные клетки также позитивны по CD117, CD11b, CD56 и частично позитивны по суМРО (13,7%). Экспрессия других миелоидных (CD13, CD36, CD64, CD65, CD4, CD14, CD15), а также лимфоидных (CD16, CD3, CD19, TdT, CD10, CD20, CD5, CD7) маркеров не обнаружена

заболеваний, так как позволяет быстро и точно установить линейную принадлежность трансформированных бластов и стадию, на которой произошел блок их дифференцировки, тогда как на получение результатов цитогенетического анализа и других исследований требуется гораздо больше времени. Современные техники иммунофенотипирования дают возможность для идентификации aberrантного иммунофенотипа, ассоциированного с соответствующими рекуррентными хромосомными aberrациями, что позволяет сделать предположение о наличии этих нарушений и имеет большое значение для дифференциальной диагностики и оценки прогноза заболевания.

Литература

1. Глузман, Д.Ф. Современная диагностика острых миелоидных лейкозов / Д.Ф. Глузман, Л.М. Складенко, В.А. Надгорная // Онкогематология. – 2010. – № 2. – С. 35–36.
2. Глузман, Д.Ф. Современная диагностика острых миелоидных лейкозов / Д.Ф. Глузман, Л.М. Складенко, В.А. Надгорная // Онкогематология. – 2010. – № 3. – С. 37–38.
3. Глузман, Д.Ф. Современная диагностика острых миелоидных лейкозов / Д.Ф. Глузман, Л.М. Складенко, В.А. Надгорная // Онкогематология. – 2010. – № 4. – С. 24–25.
4. Куртова, А.В. Диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. опухолей гемопоэтических и лимфоидных тканей (Часть I – острые миелобластные лейкозы) / А.В. Куртова, Е.Б. Русанова, К.Ю. Слободнюк [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2009. – Т. 2. – № 3. – С. 232–235.
5. Никитин, В.Ю. Иммунофенотипическая и цитогенетическая характеристика М4 и М5 вариантов острого миелоидного лейкоза / В.Ю. Никитин, И.А. Сухина, С.Н. Колюбаева [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2009. – № 4 (28). – С. 121–130.
6. Ferrara, F. Acute myeloid leukemia with t(8;21)/AML1/ETO: a distinct biological and clinical entity / F. Ferrara, L. Del Vecchio // Haematologica. – 2002. – № 87 (3). – P. 306–319.
7. Hrusak, O. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias / O. Hrusak, A. Porwit-MacDonald // Leukemia. – 2002. – Vol. 16. – № 7. – P. 1233–1258.
8. Loffler, H. AML M1 and M2 with eosinophilia and AML M4Eo: diagnostic and clinical aspects / H. Loffler, W. Gassman, T. Haferlach // Leuk. Lymph. – 1995. – 18 (3). – P. 61–63.
9. Paietta, E. Expression of cell surface antigens in acute promyelocytic leukemia / E. Paietta // Best pract. res. clin. haematol. – 2003. – 16 (3). – P. 369–385.
10. Swerdlow, S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th Edition / S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris [et al.] // IARC Press. Lyon. – 2008. – P. 359–376.
11. Szczepański, T. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes / T. Szczepański, V.H.J. Van der Velden, J.J.M. Van Dongen // Clin. chem. lab. med. – 2006. – Vol. 44. – P. 775–796.
12. Van den Ancker, W. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO2008 classification / W. Van den Ancker, M. Terwijn, T.M. Westers [et al.] // Leukemia. – 2010. – Vol. 24. – № 7. – P. 1392–1396.
13. Van Dongen, J.J.M. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes / J.J.M. Van Dongen, L. Lhermitte, S. Bottcher [et al.] // Leukemia. – 2012. – Vol. 26. – № 9. – P. 1908–1975.
14. Vardiman, J.W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / J.W. Vardiman, J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning // Blood. – 2009. – Vol. 114. – № 5. – P. 937–951.
15. Wood, B.L. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis / B.L. Wood // Methods cell biol. – 2004. – Vol. 75. – P. 559–576.

I.A. Sukhina, V.Yu. Nikitin, S.N. Kolyubaeva, V.N. Semelev, D.A. Gornostaev, V.N. Tsygan, A.M. Ivanov, Yu.V. Nikitin

Interrelation of genetic abnormalities and immunophenotypic features of blast cells in acute myeloid leukemia

Abstract. The characteristic immunophenotypes of acute myeloid leukemia with the most common genetic aberrations according to the classification of the World Health Organization (2008) are shown. Cases of acute myeloid leukemia are presented, which immunophenotypic features specified in presence of concrete recurrent abnormalities. So, detection in a bone marrow patient population blast myeloid cells with immunophenotype CD117⁺⁺⁺, CD34⁺⁺⁺, HLA-DR⁺⁺⁺, CD38⁺⁺⁺, cyMPO⁺⁺⁺, CD13^{dim}, CD33^{dim}, CD56⁺, CD19^{dim}, CD7^{dim} has allowed to assume availability translocation t(8;21). In other patient 2 populations of leukemia blasts were found out: 1) mature cells with high expression of antigens CD34, CD117, with features granulocytic differentiation; 2) more mature cells, not expressing CD34, CD117, with differentiation signs to direction monocytopenia and granulocytopenia with co expression antigen CD2, that indicated in damages to 16 chromosome (inv(16) or t(16;16)). In the third case population of blasts with bright homogeneous expression the pan-myeloid of antigen CD33, weak expression the pan-myeloid of antigen CD13 and early myeloid marker CD117, a positive expression of antigens CD9, CD64, cyMPO and negative on expression HLA-DR is found out, has given the possibility to predict presence t(15;17). In all cases, the supposition has been proved by cytogenetic analysis.

Key words: recurrent genetic abnormalities, aberrant immunophenotype, acute myeloid leukemia, flow cytometric, immunophenotypic analysis.

Контактный телефон 8 (812) 292-32-96; e-mail: kinya2000@mail.ru