

Иммунофенотипическая характеристика острого мегакариобластного лейкоза у детей

М.Ю. Алексенко¹, О.И. Илларионова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Е.А. Зеркаленкова¹,
И.А. Новикова⁴, А.В. Панферова¹, Л.Г. Фечина^{2,3}, Г.А. Цаур^{2,3},
Ю.В. Ольшанская¹, А.М. Попов¹

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

² ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

⁴ ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМКЛ) – разновидность острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), в основе которого лежит избыточная пролиферация мегакариобластов в костном мозге. ОМКЛ – редкий вариант ОМЛ как среди детей, так и среди взрослых, но характеризуется высокой частотой среди пациентов с синдромом Дауна. Морфологическая диагностика ОМКЛ сопряжена с рядом трудностей, поэтому ключевую роль в диагностике играет иммунофенотипирование. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Цель исследования – комплексная оценка иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ОМКЛ. Исследуемую группу составили 103 образца костного мозга детей с ОМКЛ. Иммунофенотипирование проводили методом проточной цитометрии. По результатам исследования выявлено три группы пациентов с разным уровнем экспрессии CD45, при этом большинство пациентов (74%) имело высокую экспрессию данного маркера. При комплексной оценке фенотипа выявлен ряд других достоверных отличий между этими группами. У 56% больных ОМКЛ была обнаружена трисомия 21 хромосомы в костном мозге, при этом именно дети с трисомией составили большинство в группе пациентов с высокой экспрессией CD45 (64% в группе и 86% всех пациентов с трисомией). Кроме того, выявлен ряд достоверных фенотипических отличий у пациентов с трисомией и без нее в рамках группы с высокой экспрессией CD45. Данное исследование продемонстрировало существенную иммунофенотипическую гетерогенность ОМКЛ. В целом выявленное разнообразие, очевидно, отражает биологическую неоднородность данной группы пациентов с ОМЛ.

Ключевые слова: острый мегакариобластный лейкоз, ОМКЛ, ОМЛ, трисомия 21, CD45, дети, иммунофенотипирование, проточная цитометрия

Алексенко М.Ю. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 35–40.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-35-40

Immunophenotypic characterization of acute megakaryoblastic leukaemia in children

M.Yu. Alexenko¹, O.I. Illarionova¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, E.A. Zerkalnikova¹, I.A. Novikova⁴, A.V. Panferova¹,
L.G. Fechina^{2,3}, G.A. Tsaur^{2,3}, Yu.V. Olshanskaya¹, A.M. Popov¹

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

² Regional Children Clinical Hospital № 1, Ekaterinburg

³ Research Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg

⁴ Rostov Institute of Oncology, Rostov-on-Don

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a rare subtype of acute myeloid leukemia, in which the bone marrow produce increased numbers of immature abnormal megakaryoblasts. AMKL is rare both in children and adults, but is the most frequent subtype of acute myeloid leukemia (AML) in children with Down syndrome. Morphological diagnosis of this disease could be complicated, thus flow cytometry plays a crucial role in the diagnostics of AMKL. The aim of the present study was to investigate the immunophenotypic characteristics of AMKL in children. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The study group included 103 patients with AMKL. Antigen expression profile was assessed by multicolor flow cytometry. We identified three groups of patients according to different levels of CD45 expression, and in majority of patients (74%) high level of CD45 expression was detected. Significant immunophenotypic differences between these groups were found. In 56% of patients trisomy of 21 chromosome was detected. Among these patients, 86% belonged to group of high CD45 expression. Moreover, children with trisomy 21 represented the majority in the group with high level of CD45 expression (64%). Also, there were found several significant differences between patients with and without trisomy 21 within the group of high CD45 expression. This study demonstrated the wide immunophenotypic heterogeneity of AMKL. In general, the revealed diversity obviously reflects the biological heterogeneity of this AML subtype.

Key words: acute megakaryoblastic leukaemia, AMKL, AML, trisomy 21, CD45, children, flow cytometry

Alexenko M.Yu., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 35–40.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-35-40

© 2019 by NMRC PHOI

Received 07.05.2019

Accepted 10.06.2019

Correspondence:

Alexander M. Popov, MD, PhD,
Head of Hemoblastosis
immunophenotyping laboratory
of the Department of pediatric
oncological surgery Dmitry
Rogachev National Medical Research
Center of Pediatric Hematology,
Oncology, Immunology Ministry
of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow,
Samory Mashela st., 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМКЛ) – вид острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), для которого характерна избыточная пролиферация мегакариобластов в костном мозге. Это один из самых редких видов ОМЛ, на его долю приходится около 4–15% всех детских ОМЛ и около 1% всех ОМЛ у взрослых [1].

В соответствии с классификацией ВОЗ данное заболевание принято разделять на три группы: ОМКЛ с транслокацией t(1;22)(p13;q13); ОМКЛ, ассоциированный с синдромом Дауна (СД-ОМКЛ), и ОМКЛ без детальной спецификации, к которому относятся все остальные случаи данного заболевания [2].

Пациенты с синдромом Дауна в целом имеют более высокий риск развития острых лейкозов, однако чаще всего у них развивается именно ОМКЛ [3]. У 20–30% пациентов с синдромом Дауна развитию ОМКЛ предшествует такое состояние, как транзиторный аномальный миелопоэз (ТАМ) [4]. Данное заболевание характеризуется присутствием в периферической крови клональной популяции мегакариобластов, протекает бессимптомно и в большинстве случаев разрешается без какого-либо лечения. Примерно в 20% случаев ТАМ трансформируется в ОМКЛ [1]. В классификации ВОЗ ТАМ и СД-ОМКЛ объединены в единую группу миелоидных пролифераций, связанных с синдромом Дауна [2].

Морфологическая диагностика ОМКЛ – как правило, непростая задача, поэтому для постановки диагноза особенно важно проведение иммунофенотипирования. В соответствии с данными ВОЗ главный признак мегакариоцитарной природы опухолевых клеток – экспрессия одного или нескольких тромбоцитарных гликопротеинов: CD41, CD61, CD42b. Кроме того, для большинства случаев ОМКЛ характерна экспрессия миелоидных маркеров CD13, CD33 и маркера CD36. Маркеры HLA-DR и CD34, как правило, отрицательны. Гранулоцитарные и лимфоидные маркеры также отрицательны, однако достаточно часто встречается aberrантная экспрессия CD7 [2].

Отдельного внимания заслуживает маркер CD45, который, по данным различных исследовательских групп, обычно не экспрессируется при ОМКЛ, ассоциированном с t(1;22), и ОМКЛ без детальной спецификации [2, 5]. Информация касательно экспрессии данного маркера при ТАМ и СД-ОМКЛ в классификации ВОЗ 2017 года не отражена, однако есть публикации, в соответствии с которыми бластные клетки при ТАМ и СД-ОМКЛ CD45-положительны. Так, по данным N.J. Karandikar и соавт. (2001), CD45 выявляют в подавляющем большинстве случаев ТАМ и СД-ОМКЛ [6].

Цель исследования: комплексная оценка иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ОМКЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунофенотипирование проведено в Лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России и в Лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ОДКБ № 1 г. Екатеринбурга в период с 2006 по 2018 год. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ.

Исследование первичного иммунофенотипа провели у 103 пациентов (62 мальчиков и 41 девочки); медиана возраста составила 1 год 4 мес. (от 2 мес. до 13 лет). Диагноз ОМКЛ был поставлен на основании данных морфологического, цитохимического исследований и иммунофенотипирования костного мозга. Иммунофенотипирование производили методом 4–8-цветной проточной цитометрии на приборах *FACS Canto* и *FACS Canto II* (Becton & Dickinson, США). Для определения экспрессии исследуемых маркеров использовали моноклональные антитела, меченные различными флуорохромами (таблица 1). Окрашивание антителами производили согласно инструкции производителя.

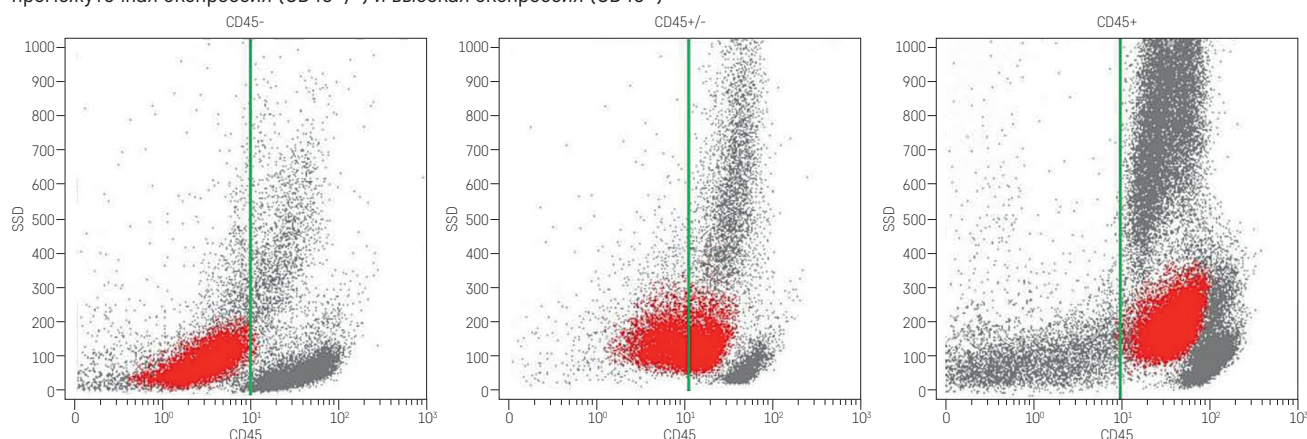
Таблица 1
Моноклональные антитела и флуорохромы

Флуорохром	Моноклональные антитела
PE	CD10, CD7, CD34, CD1a, CD45, CD22, CD133, CD13, CD8, CD58, CD20, CD79a, TdT, CD38, CD11a, CD11b, CD11c, CD2, CD235a, CD99, MPO
FITC	CD61, CD58, CD45, CD99, CD7, CD7, CD65, CD15, CD10, CD19, CD4, CD3, MPO, CD64, CD66b, CD5, CD71
PerCP	CD19, CD20, CD8, CD45, CD34
PerCP-Cy5.5	CD20, CD38, CD19, CD79a, CD5
PE-Cy7	CD34, CD3, CD56, CD10, CD38, CD22, CD33
APC-Cy7	CD45, CD20, CD14, CD3, CD4
APC	CD41, CD19, CD117, CD3, CD133, CD56, CD79a, CD79a, CD10, CD11c, CD38, CD41a, TdT, IgM, CD33
BV421	CD2, CD13, CD33
BV510	CD15, CD11c, CD3, CD15, CD38, CD10

Результаты иммунофенотипирования оценивали при помощи программного обеспечения *FACS Diva 4.0-6.1* (Becton & Dickinson, США) и *Kaluza v2.1* (Beckman Coulter, США). Популяцию бластных клеток выделяли на точечных графиках исходя из экспрессии CD45 и значений параметров бокового светорассеяния (SSC).

Рисунок 1

Различные типы экспрессии маркера CD45 при ОМКЛ у детей: экспрессия CD45 отсутствует (CD45-); промежуточная экспрессия (CD45+/-) и высокая экспрессия (CD45+)



Экспрессию антигенов оценивали по критериям Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias – EGIL*), в соответствии с которыми бластная популяция рассматривается как положительная, если процент позитивных клеток для внутриклеточных и мембранных маркеров выше 20 и 10% соответственно [7].

Стандартное кариотипирование выполнено методом G-дифференциального окрашивания и проведено у 93 из 103 пациентов. Запись кариотипа осуществлялась в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature – ISCN, 2009*) [8]. Среди этих 93 пациентов у 40 (43,0%) была выявлена конституциональная трисомия 21 (синдром Дауна). Еще в 12 случаях данная аберрация была соматической (выявлялась только в опухолевых клетках).

Достоверность отличий по количеству позитивных пациентов определяли с помощью критерия χ^2 . Количественные отличия с учетом процента экспрессирующих клеток оценивали с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Оценку отличий по частоте трисомии 21 хромосомы в различных группах пациентов также проводили с применением критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с данными ВОЗ в большинстве подтипов ОМКЛ, как правило, отсутствует экспрессия антигена CD45 [2]. Однако, по данным проведенного нами исследования, высокая экспрессия данного маркера была отмечена у подавляющего большинства пациентов. В зависимости от степени экспрессии этого антигена [9] мы выделили три группы (рисунок 1):

- CD45-отрицательные пациенты (группа CD45-);

- пациенты с промежуточной экспрессией CD45 (группа CD45+/-);
- пациенты с высокой экспрессией CD45 (группа CD45+).

Большинство пациентов – 76 (74%) человек – имело высокую экспрессию CD45; низкая экспрессия CD45 отмечена у 19 (18%); промежуточная (частичная) – у 8 (8%) пациентов. В качестве порогового значения для определения на точечных графиках уровня экспрессии CD45 использовали левую границу популяции нейтрофилов (рисунок 1) [9]. На следующем этапе проведено сравнение фенотипа в группах с низкой и высокой экспрессией CD45 (группы CD45- и CD45+ соответственно). При сравнении экспрессии различных маркеров в этих группах обнаружено, что процент пациентов, положительных по антигенам CD56, CD7, CD61 и CD2, в этих группах достоверно отличается (таблица 2). Так, например, экспрессия CD56 была положительной у 71% пациентов в группе CD45- и лишь у 22% в группе CD45+.

Таблица 2

Доля позитивных пациентов в группах CD45- и CD45+

Маркер	Доля позитивных пациентов, %		p
	группа CD45-	группа CD45+	
CD56	71	22	< 0,001
CD7	42	81	< 0,001
CD61	100	78	0,023
CD2	7	36	0,035
CD13	33	49	0,240
CD117	89	80	0,381
CD11a	0	5	0,437
CD34	53	61	0,490
CD41a	88	81	0,549
CD33	89	89	0,986

При количественном анализе процентного содержания клеток, экспрессирующих каждый конкретный антиген, в этих же группах были выявлены достоверные отличия в экспрессии маркеров CD41, CD61, CD56, CD2, CD7 и CD13 (рисунк 2). Отдельно стоит отметить маркеры CD41 и CD13, так как доля пациентов, позитивных по данным маркерам в группах CD45- и CD45+, не имела существенных отличий (таблица 2). Тем не менее при количественном анализе было выявлено, что экспрессия маркера CD41 в группе CD45+ достоверно ниже, а маркера CD13 – достоверно выше по сравнению с группой CD45- (рисунк 2). Группа пациентов с промежуточной (частичной) экспрессией CD45 в целом сочетала в себе черты как группы CD45-, так и группы CD45+, отличаясь от них лишь экспрессией маркеров CD61 и CD7 (рисунк 3).

Данные цитогенетического исследования были доступны для 93 из 103 пациентов. У 52 (56%) пациентов выявлена трисомия 21 хромосомы (изолированно либо в составе комплексного кариотипа). Среди пациентов с трисомией 21 большинство ($n = 45$; 86%) имели высокую экспрессию CD45; промежуточная экспрессия CD45 отмечена у 2 (4%), а отсутствие экспрессии CD45 – у 5 (10%) пациентов с данной аномалией. Кроме того, доля пациентов с трисомией 21 хромосомы в группе CD45+ составила 64%, а в группах CD45+/- и CD45- – 29 и 31% соответственно (рисунк 4). Достоверные отличия по частоте трисомии 21 были выявлены только между группами CD45+ и CD45- ($p = 0,016$).

Доля пациентов с конституциональной трисомией 21 в группах CD45-, CD45+/- и CD45+ составила 6; 14 и 57% от общего количества пациентов соответственно.

При сравнении фенотипа у пациентов с трисомией 21 и без нее внутри группы CD45+ было выявлено, что экспрессия маркеров CD41, CD61 и CD2 у пациентов с трисомией 21 достоверно ниже, а маркеров CD7, CD13 и CD33 – достоверно выше, чем у пациентов без данного генетического нарушения (рисунк 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Систематизированных данных по иммунофенотипу опухолевых клеток при ОМКЛ нет. Ключевыми отличиями данного варианта от других типов ОМЛ, по результатам большинства исследований, считается экспрессия (мембранная и внутриклеточная) тромбоцитарных гликопротеинов CD41 и CD61 [5, 7], отсутствие CD11a [10] и CD45 [2, 5]. В соответствии с классификацией ВОЗ экспрессия CD45, как правило, не характерна для таких типов ОМКЛ, как ОМКЛ с $t(1;22)$ и ОМКЛ без детальной спецификации. Применительно к ТАМ и СД-ОМКЛ экспрессия CD45 в классификации ВОЗ не охарактеризована, однако

Рисунок 2

Сравнение фенотипа в группах CD45- и CD45+

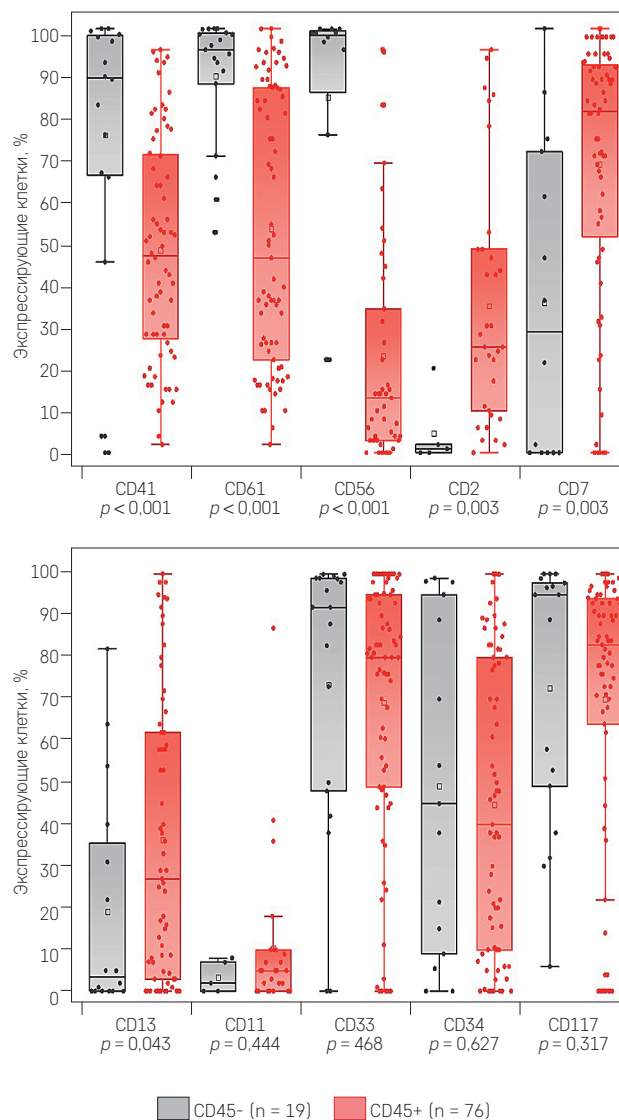


Рисунок 3

Отличия экспрессии CD61 и CD7 в группе CD45+/- (зеленый цвет) по сравнению с группами CD45- (слева) и CD45+ (справа)

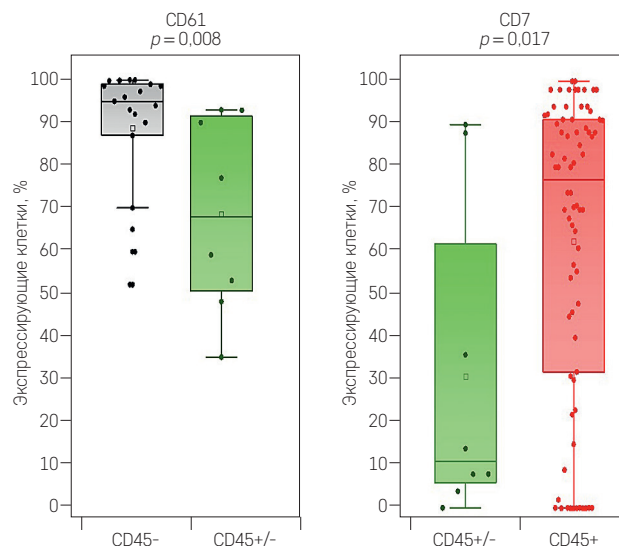
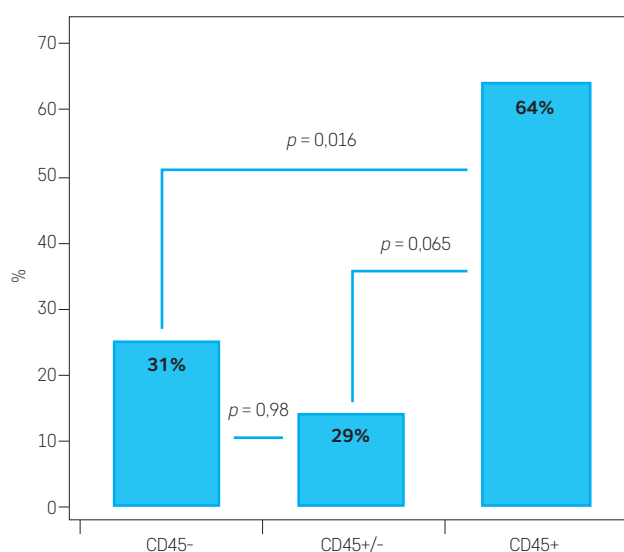
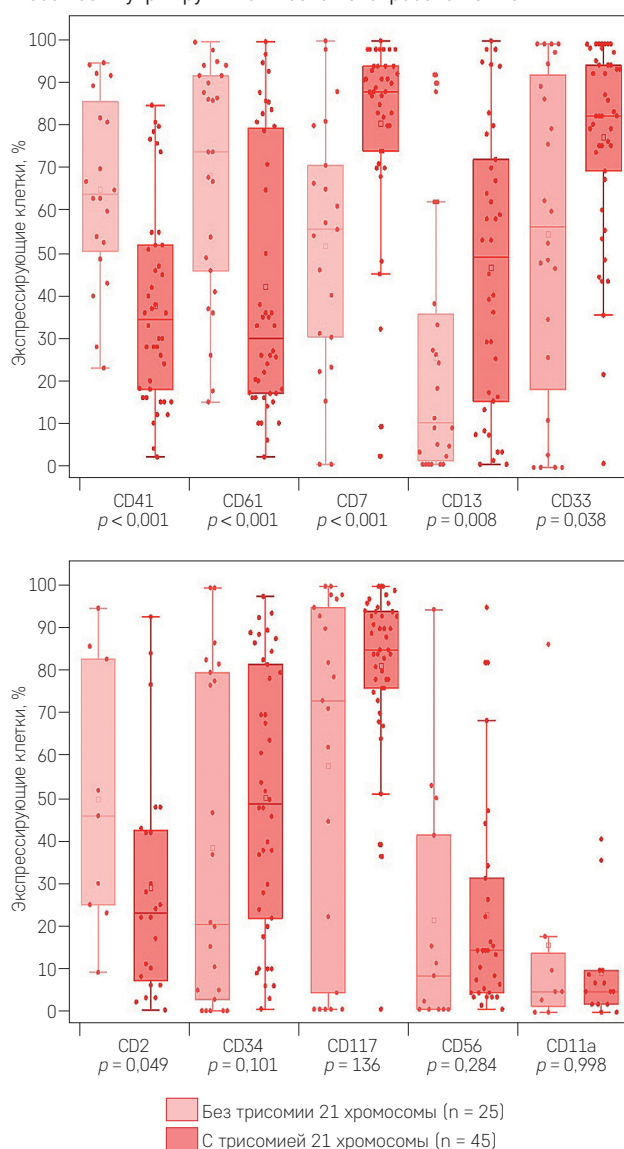


Рисунок 4

Частота трисомии 21 хромосомы в группах с различной экспрессией CD45

**Рисунок 5**

Сравнение фенотипа пациентов с трисомией 21 хромосомы и без нее внутри группы с высокой экспрессией CD45+



есть литературные источники, в которых описана CD45-позитивность для данной группы ОМКЛ [6].

Мы предприняли попытку комплексно оценить антигенный профиль бластов при ОМКЛ на достаточно большой выборке пациентов (n = 103). Результаты нашего исследования отличаются от опубликованных ранее данных. Основное отличие состоит в том, что большинство пациентов имело высокую экспрессию CD45 (74%). Частота обнаружения трисомии 21 была существенно выше у пациентов с высокой экспрессией CD45, по сравнению с группой CD45-. Полученные данные в целом соответствуют данным литературы об экспрессии CD45 при миелоидных пролиферациях, связанных с синдромом Дауна [6]. Тем не менее в группу CD45+ входили не только пациенты с трисомией 21, но и существенное количество детей (36%) без данной генетической аномалии. В то же время каждый 10-й пациент с трисомией 21 был CD45-негативным, а еще 4% детей имели гетерогенную экспрессию данного маркера.

При анализе данных пациентов с высокой экспрессией CD45 выявлены некоторые особенности их фенотипа. Наиболее достоверные отличия обнаружены в отношении мегакариоцитарных маркеров CD61, CD41 и маркера CD56, экспрессия которых в группе CD45+ оказалась достоверно ниже, чем в группе CD45-. В группе CD45+ отмечена также более высокая экспрессия CD7, CD2 и CD13.

При сравнении фенотипа пациентов с трисомией 21 и без нее внутри группы CD45+ у пациентов с трисомией 21 обнаружена более низкая экспрессия мегакариоцитарных маркеров CD61, CD41 и маркера CD2, а также более высокий процент экспрессии CD7, CD13 и CD33.

Отдельно стоит отметить небольшую группу пациентов (n = 8) с промежуточной экспрессией CD45, фенотип которой сочетал в себе черты групп CD45- и CD45+, отличаясь от них лишь экспрессией маркеров CD61 и CD7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованная группа пациентов с ОМКЛ продемонстрировала существенную иммунофенотипическую гетерогенность. Большинство обследованных больных имели высокую экспрессию CD45. Было выявлено, что пациенты с различным уровнем экспрессии CD45 имеют достоверные отличия по антигенному профилю опухолевых клеток. При этом, как и ожидалось, большинство в группе CD45+ составили дети с трисомией 21. Их иммунофенотип имел некоторые отличия даже по сравнению с другими CD45-позитивными случаями. В целом выявленное разнообразие антигенного профиля при ОМКЛ, очевидно, отражает биологическую неоднородность данной группы ОМЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Alexenko M.Yu.: <https://orcid.org/0000-0002-2521-5353>

Alexenko M.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2521-5353>

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

Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>

Zerkalenskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9634-5828>

Novikova I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6689-5861>

Panferova A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8580-3499>

Fechina L.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1885-3912>

Tsaur G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>

Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>

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

Литература

1. Gruber T.A., Downing J.R. The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Blood* 2016; 126 (8): 943–9.
2. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
3. Mejía-Arangur J. M. (ed.). Etiology of Acute Leukemias in Children. Springer International Publishing Switzerland; 2016.
4. Roy A., Roberts I., Norton A., Vyas P. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: a multi-step model of myeloid leukaemogenesis. *Br J Haematol* 2009; 147 (1): 3–12.
5. Илларионова О.И., Горчакова М.В., Русанова Е.Б., Прохорова Ю.А., Салогуб Г.Н., Осипова Е.Ю. и соавт. Конспект клинической цитометрии: острый мегакариобластный лейкоз. Клиническая лабораторная диагностика 2015; 60 (7): 42–9.
6. Karandikar N.J., Aquino D.B., McKenna R.W., Kroft S.H. Transient myeloproliferative disorder and acute myeloid leukemia in Down syndrome. An immunophenotypic analysis. *Am J Clin Pathol* 2001 Aug; 116 (2): 204–10.
7. Bene M., 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.
8. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 298 (7731): 971–2.
9. Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Цаур Г.А., Белевцев М.В., Попов А.М. Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. Онкогематология 2018; 13 (1): 73–82.
10. Boztug H., Schumich A., Pötschger U., Mühlegger N., Kolenova A., Reinhardt K., et al. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2013; 84B: 370–8.