

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 15.01.2021
Принята к печати 02.02.2021

Контактная информация:

Михайлова Екатерина Валерьевна,
врач клинической лабораторной
диагностики лаборатории
иммунофенотипирования гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: katmikhailova1805@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-46-53

Иммунофенотипическая характеристика острого миелоидного лейкоза с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ-MYH11* у детей

Е.В. Михайлова, С.А. Кашпор, Е.А. Зеркаленкова, А.А. Семченкова, М.Э. Дубровина,
Ю.В. Олшанская, С.А. Плясунова, И.И. Калинина, М.А. Масчан, А.А. Масчан,
Г.А. Новичкова, А.М. Попов

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

Целью данной работы было изучение иммунофенотипа клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с *inv(16)(p13.1q22)/CBFβ-MYH11* и *t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ-MYH11* у детей. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Проанализированы образцы костного мозга 36 детей с впервые выявленным ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ-MYH11*. Была выявлена крайняя гетерогенность иммунофенотипа опухолевых клеток: экспрессировались как антигены ранних стадий дифференцировки (CD34, CD117, CD123), так и маркеры зрелых моноцитов (CD11c, CD14, CD64) и нейтрофилов (CD65, CD15). При этом в 55,6% случаев была отмечена коэкспрессия маркеров других линий дифференцировки, наиболее частым из которых был лимфоидный антиген CD2. В 83,3% исследуемых образцов отмечалось разделение популяции на 2 части: более «незрелую» – миелобластную, экспрессирующую ранние маркеры дифференцировки (CD34, CD117), и более «дифференцированную» – несущую на своей поверхности маркеры зрелых моноцитов (CD11b, CD14, CD33). При этом четкой границы между данными частями провести невозможно. Несмотря на то, что моноцитарная часть опухолевой популяции иммунофенотипически схожа с нормальными моноцитами, в 87,5% случаев ОМЛ с *CBFβ-MYH11* отмечалось наличие коэкспрессии тех же маркеров лимфоидной дифференцировки, что и на опухолевых миелобластах. Кроме того, было показано, что в лейкоэмических моноцитах детектируется химерный транскрипт *CBFβ-MYH11* на уровне, сопоставимом с таковым в лейкоэмических бластах. Наличие данных особенностей у моноцитов позволяет считать их частью опухолевой популяции и учитывать их иммунофенотип при описании суммарного иммунофенотипа опухоли при ОМЛ.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, дети, ген *CBFβ-MYH11*, иммунофенотипирование

Михайлова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (1): 46–53. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-46-53

Immunophenotypic characterization of pediatric acute myeloid leukemia with *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ-MYH11*

E.V. Mikhailova, S.A. Kashpor, E.A. Zerkalnikova, A.A. Semchenkova, M.E. Dubrovina, S.A. Plyasunova,
Yu.V. Olshanskaya, I.I. Kalinina, M.A. Maschan, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, A.M. Popov

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

The aim of this study was to describe the immunophenotype of leukemic cells in acute myeloid leukemia (AML) with *inv(16)(p13.1q22)/CBFβ-MYH11* and *t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ-MYH11* in children. This study is supported by the Independent Ethics Committee and approved by the Academic Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. We investigated bone marrow samples from 36 pediatric patients with initially diagnosed AML with *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ-MYH11*. Immunophenotypic profile of leukemic cells was very heterogeneous: cells expressed antigens of early stages of differentiation (CD34, CD117, CD123) as well as markers of mature monocytes (CD11c, CD14, CD64) and neutrophils (CD65, CD15). Moreover, in 55.6% of cases lymphoid coexpressions were noticed (CD2 – the most frequent one). Furthermore, in 83.3% of cases we detected the separation of leukemic cells population into two parts: more "immature" – myeloblastic, which expressed early markers of differentiation (CD34, CD117), and more "mature" part, expressing monocytic antigens (CD11b, CD14, CD33). There was no clear separation between these parts of population. Despite the immunophenotypic similarity between monocytic part of leukemic population and normal monocytes, in 87.5% of studied cases there were same lymphoid coexpressions on these cells as on leukemic myeloblasts. Moreover, we showed that levels of *CBFβ-MYH11* expression in leukemic monocytes and myeloblasts were comparable. Presence of these characteristics in monocytes allows to consider them as part of leukemic cells population and take into consideration during the total immunophenotype reporting.

Key words: acute myeloid leukemia, children, *CBFβ-MYH11* gene, immunophenotyping

Mikhailova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (1): 46–53.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-46-53

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPOH»

Received 15.01.2021
Accepted 02.02.2021

Correspondence:

Ekaterina V. Mikhailova,
MD, Leukemia Immunophenotyping
laboratory of Dmitry Rogachev National
Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: katmikhailova1805@gmail.com

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является гетерогенной группой онкогематологических заболеваний с разными морфологическими, иммунофенотипическими и генетическими особенностями [1]. В классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2016 г. основным критерием выделения специфических подгрупп ОМЛ являются цитогенетические и молекулярно-генетические характеристики опухолевых клеток [2]. Одной из таких подгрупп является ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* или *t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*. Данные хромосомные аномалии приводят к слиянию N-конца и большей части гена β -субъединицы белка CBF (core binding factor) с C-концевой частью гена тяжелой цепи гладкомышечного миозина [3]. Этот тип ОМЛ чаще всего морфологически характеризуется как миеломоноцитарный с эозинофилией [4]. Наличие химерного гена *CBFB-MYH11* выявляется у 5–8% пациентов с ОМЛ [5] и при проведении интенсивной химиотерапии, ключевым компонентом которой является включение нескольких курсов терапии высокими дозами цитарабина (HD AraC), сопряжено с относительно благоприятным прогнозом исхода заболевания [6].

Учитывая доминирующее значение цитогенетических и молекулярно-генетических методов в диагностике и прогнозировании исхода ОМЛ, иммунофенотипирование опухолевой популяции клеток с помощью многоцветной проточной цитометрии расценивается в целом как вспомогательный метод в диагностической «панели» ОМЛ. В то же время характер экспрессии тех или иных цитоплазматических и поверхностных маркеров в клетках является отражением молекулярно-генетических процессов внутри них. В связи с чем поиск возможной взаимосвязи иммунофенотипа опухолевых клеток с их цитогенетическими и молекулярно-генетическими особенностями и соответственно с прогнозом является одной из важных диагностических задач.

Цель настоящего исследования: изучить особенности иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Были исследованы образцы костного мозга (КМ) 36 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с впервые выявленным ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*, проходивших инициальное диагностическое исследование при острых лейкозах в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ

им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России с марта 2012 г. по май 2020 г.

Иммунофенотипирование

Иммунофенотипирование опухолевой популяции производили на цитометрах FACS Canto II (3 лазера, 8 цветов; Becton Dickinson, США) и Navios (3 лазера, 10 цветов; Beckman Coulter, США). Панель для определения иммунофенотипа опухолевой популяции содержала меченные флуорохромами антитела, указанные в таблице 1. В качестве количественной характеристики экспрессии маркеров был выбран процент позитивных по отдельным маркерам опухолевых клеток, а также средняя интенсивность флуоресценции (MFI), которую рассчитывали в образцах, окрашенных с использованием стандартных готовых панелей меченных антител DURAClone Tube (Beckman Coulter, США) (таблица 2). Данные комбинации антител разработаны для определения минимальной остаточной болезни в процессе терапии ОМЛ [7].

Результаты иммунофенотипирования оценивали с использованием программного обеспечения Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США). В анализ включали не менее 10 000 ядросодержащих клеток. Выделение опухолевых клеток на точечных графиках производили по экспрессии маркера CD45 и значениям параметра бокового светорассеяния (SSC). Опухолевую популяцию считали позитивной, если 20% и более опухолевых клеток экспрессировали мембранный маркер или 10% – внутриклеточный [8].

Клеточная сортировка

У 2 пациентов было произведено выделение отдельных популяций клеток с использованием проточного клеточного сортера (FACS Aria III, BD, США): выделены миелоидные бласты

Таблица 1
Перечень антител, использованных в исследовании

Table 1
List of used antibodies

Флуорохромы Fluorochromes	Моноклональные антитела Monoclonal antibodies
FITC	CD56, CD66b, Lys, CD4, CD61, CD38, CD15, CD34, CD4
PE	CD117, NG2, MPO, CD11a, CD99, CD371, CD2, CD7, CD19, CD13, HLA-DR, CD123, CD65
PerCP/ PerCP-Cy5.5	CD7, CD14, CD3, HLA-DR, CD123, CD22, CD14, CD117, CD45
PE-Cy7	CD19, CD11b, CD22, CD64, CD41a, CD33, CD3, CD11b, CD5
APC	CD34, CD2, CD303, CD99, CD371, CD13, CD79a, CD11c, CD5, CD7, CD19, CD56
APC-Cy7/APC-Alexa 750	CD45, CD45RA, CD11b, CD3
Pacific Blue/BV421	CD33, CD13, CD79a, CD5, HLA-DR, CD10, CD235a, CD2, CD7, CD13
Krome Orange/BV510	CD3, CD11c, CD15, CD203c, CD45, CD3, CD4, CD11b
ECD	CD34, CD56
APC-Alexa 700	CD123, CD14, CD4

Таблица 2

Состав стандартных готовых панелей меченных моноклональных антител DURAClone Tube (Beckman Coulter, США)

Table 2

Composition of standardized DURAClone Tubes (Beckman Coulter, USA)

Pacific Blue	Krome Orange	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-AF700	APC-AF750
Пробирка 1 Tube 1									
HLA-DR (Immu-357)	CD45 (J33)	CD15 (80H5)	–	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3HL60.251)	–	CD14 (RM052)	CD11b (Bear1)
Пробирка 2 Tube 2									
HLA-DR (Immu-357)	CD45 (J33)	CD38 (T16)	–	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D2HL60.251)	–	CD123 (SSDCLY107D2)	CD45RA (2H4LDH11LDB9 (2H4))

(CD45⁺CD117⁺CD33⁺CD14⁺) и моноцитарные клетки (CD45⁺CD33⁺CD117⁺CD14⁺). Нефиксированные окрашенные антителами клетки сортировали в режиме “Purity” в фосфатно-солевой буфер (Cell Wash, BD, США). Полученные клеточные осадки использовались для дальнейшего определения экспрессии химерного транскрипта *CBFB-MYH11* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследования

Всем пациентам было выполнено стандартное кариотипирование методом G-banding [9]. Описание кариотипа осуществляли в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой [10]. Для подтверждения наличия *inv(16)(p13;q22)* либо *t(16;16)(p13;q22)* проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* с зондом на разрыв гена *CBFB* (Kreatech *CBFB Break Apart probe*, Leica Microsystems B.V., Нидерланды) согласно инструкции производителя.

Тотальную ДНК и РНК одновременно выделяли из сортированных клеточных популяций или 5 млн мононуклеаров нативного КМ с помощью набора InnuPrep DNA/RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, ФРГ). Далее осуществляли синтез комплементарной ДНК из РНК обратной транскриптазой Mint (ЗАО Евроген, Россия) и проводили ПЦР в режиме реального времени с применением мультиплексной системы праймеров и TaqMan-пробы для 3 наиболее распространенных вариантов химерного транскрипта *CBFB-MYH11* [11]. Качество РНК определяли по экспрессии контрольного транскрипта *ABL* [11].

Количество химерного транскрипта *CBFB-MYH11* и контрольного транскрипта *ABL* определяли как число копий в реакции по калибровочным графикам, построенным с помощью стандартов Ipsogen (Qiagen, ФРГ). Экспрессию химерного транскрипта *CBFB-MYH11* представляли в виде нормализованного числа копий, т. е. отношения числа копий исследуемого транскрипта к числу копий контрольного транскрипта в реакции.

Статистический анализ

Сравнение величины MFI проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Результаты статистической обработки данных считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

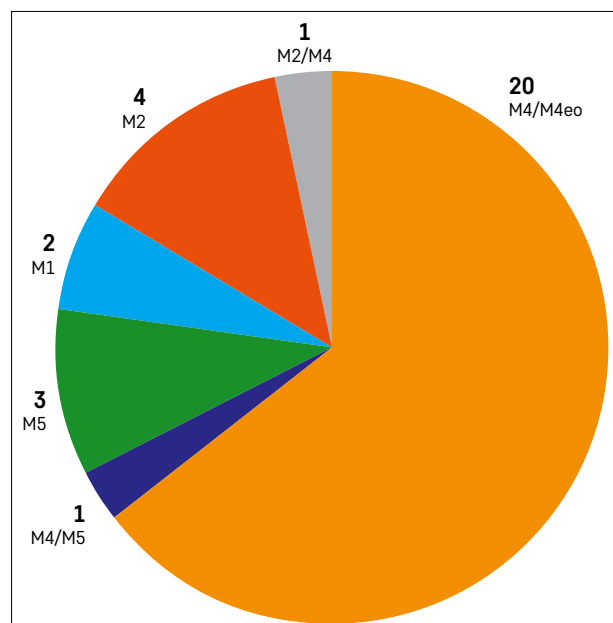
На основании данных кариотипирования, FISH и ОТ-ПЦР за указанный период времени нами были выявлены 36 пациентов с *CBFB-MYH11*. Перестройка гена *CBFB* была подтверждена ОТ-ПЦР во всех случаях.

Результаты цитоморфологического исследования КМ были доступны у 31 (86,1%) из 36 пациентов (рисунки 1). Наиболее частым цитологическим вариантом ОМЛ (по FAB-классификации) у пациентов с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* был М4 – у 20 (64,5%) из 31 пациента, при этом у 7 из них была отмечена

Рисунок 1

Распределение цитоморфологических вариантов ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* согласно FAB-классификации

Figure 1
Distribution of cytomorphological types in AML with *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* according to FAB-classification.



эозинофилия (M4eo). Кроме того, были выявлены 4 (12,9%) случая M2, 3 (9,7%) – M5 и 2 (6,5%) – M1. Еще в 2 (6,5%) случаях однозначно установить морфологический вариант ОМЛ по FAB-классификации не удалось – результаты исследований были интерпретированы как M2/M4 и M4/M5.

Имунофенотипические особенности ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* отображены на рисунке 2. В большинстве случаев клетки опухолевой популяции при данном типе ОМЛ тотально экспрессируют CD45, CD11a, CD13, CD33. При этом процент клеток, экспрессирующих остальные исследуемые маркеры, при ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* гетерогенен и меняется от пациента к пациенту в широком диапазоне значений: клетки могут экспрессировать как антигены ранних стадий дифференцировки (CD34, CD117, CD123), так и маркеры зрелых моноцитов (CD11c, CD14, CD64) и нейтрофилов (CD65, CD15). Во всех исследуемых образцах клетки данного типа лейкоза не экспрессировали маркеры мегакариоцитарной линии дифференцировки (CD41a, CD61), эритроидный маркер CD235a. Лишь у 2 из 7 пациентов с морфологическим вариантом ОМЛ M4eo удалось и при помощи метода проточной цитометрии детектировать повышение относительного количества эозинофилов более 6%.

Маркеры других линий дифференцировки на опухолевых клетках выявлялись в 20 (55,6%) из 36 случаев. Чаще всего встречалась коэкспрессия лимфоидного антигена CD2 – из 30 пациентов, у которых экспрессия данного маркера определялась, у 15 (50,0%) он был выявлен на опухолевых клетках (рисунк 3). Помимо ОМЛ с CD2 были выявлены случаи ОМЛ с коэкспрессией CD7 (3/36; 8,3%), CD19 (2/36; 5,6%), а также NG2 (2/34; 5,9%). Также у 2 пациентов было отмечено наличие коэкспрессии одновременно 2 маркеров – CD2/CD7 и CD2/NG2.

Следует отметить, что у 6 пациентов из исследуемой когорты в КМ выявлялась 1 гомогенная по иммунофенотипу опухолевая популяция, представленная лейкоэмическими миелобластами, ярко экспрессирующими ранние маркеры дифференцировки (CD117, CD34) и имеющими сниженный уровень экспрессии CD45. При этом в 30 из 36 случаев иммунофенотипически отмечалось относительное разделение опухолевой популяции на 2 части (рисунк 4). Первая из них была представлена миелобластами с тем же иммунофенотипом, что и у 6 пациентов с единственной опухолевой популяцией. Данная часть клеток составляла от 14 до 84% всей опухолевой популяции у пациентов с 2 опухолевыми популяциями. Вторая часть представлена клетками с более зрелым иммунофенотипом: они не имеют маркеров ранних стадий дифференцировки, демонстрируют более высокий в сравнении с миелобластной частью

уровень экспрессии CD45, при этом несут на своей поверхности моноцитарные маркеры (CD11b, CD14, CD33). Кроме того, данные клетки имеют то же расположение на графике CD45/SSC (рисунк 4), что и нормальные моноциты в КМ [12]. Миелобластная и моноцитарная части опухолевой популяции при ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* имеют существенные иммунофенотипические различия: при сравнении величины MFI по 11 антигенам значимые различия были выявлены для 9 из них за исключением HLA-DR и CD38, экспрессия которых была крайне гетеро-

Рисунок 2

Экспрессия антигенов опухолевыми клетками при ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*

Figure 2

Antigen expression by leukemic cells in AML with *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*

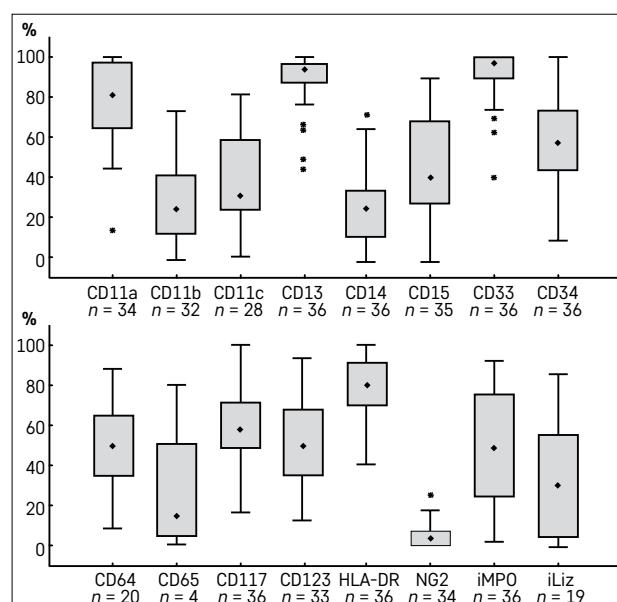
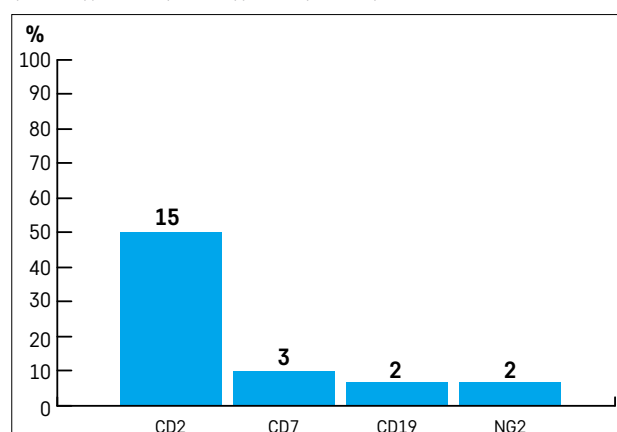


Рисунок 3

Процентное соотношение случаев ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* с коэкспрессией маркеров других линий дифференцировки: CD2 (n = 30), CD7 (n = 36), CD19 (n = 36), NG2 (n = 34)

Figure 3

Percentage of cases with AML with *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* with coexpression of other lineages markers: CD2 (n = 30), CD7 (n = 36), CD19 (n = 36), NG2 (n = 34)



генна на клетках обеих популяций (рисунок 5). При этом чаще всего между 2 данными популяциями на точечных графиках нет четкой границы (рисунок 4).

Рисунок 4

Пример иммунофенотипической гетерогенности опухолевой популяции при ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*; красным цветом отображены опухолевые миелобласты, черным – опухолевые моноцитарные клетки, серым – остальные ядросодержащие клетки

Figure 4

Example of leukemic cells immunophenotypic heterogeneity in AML with *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*; red – leukemic myeloblasts, black – leukemic monocytes, grey – other nucleated cells

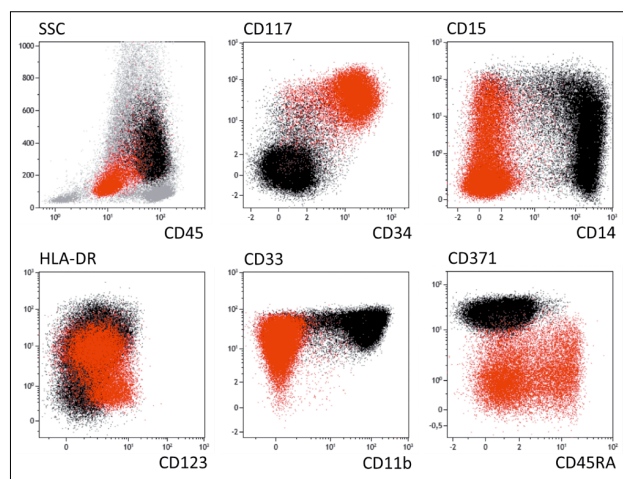
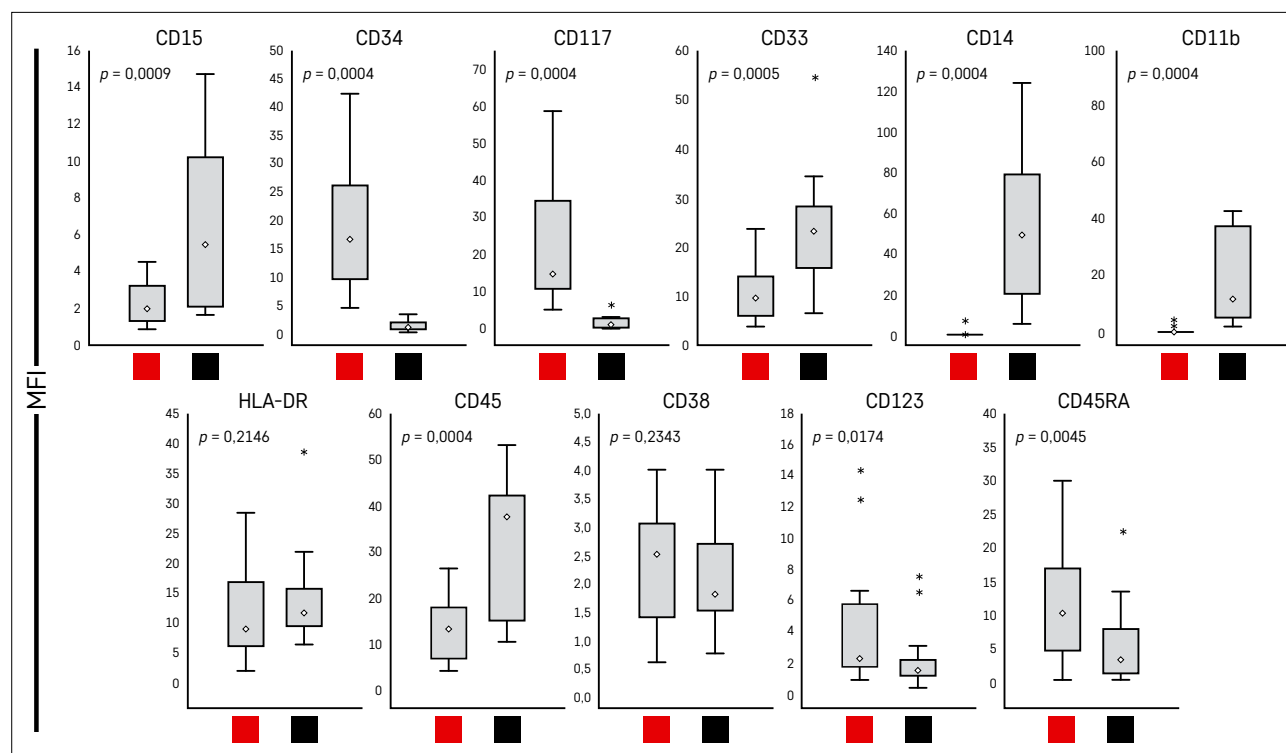


Рисунок 5

Сравнение экспрессии антигенов между миелобластной (красный цвет) и моноцитарной (черный цвет) популяциями опухолевых клеток при ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*
 ◇ – медиана; □ – межквартильный интервал; I – интервал максимум-минимум без учета выбросов; * – выбросы

Figure 5

Comparison of diagnostic markers expression between myeloblastic (red) and monocytic (black) parts of leukemic population in AML with *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*
 ◇ – median, □ – interquartile range, I – maximum-minimum range without outliers; * – outliers



Несмотря на иммунофенотипическую схожесть с нормальными моноцитами, «зрелая» популяция опухолевых клеток при ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* в 14 из 16 случаев коэкспрессировала те же маркеры других линий дифференцировки, что и опухолевые миелобласты. Кроме того, при исследовании сортированных популяций клеток 2 пациентов было установлено, что в моноцитарной части опухолевой популяции ($CD45^+CD33^+CD117^-CD14^+$) уровень экспрессии химерного транскрипта *inv(16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* совпадал по величине с тем, что наблюдался в лейкоэмических бластах ($CD45^+CD117^+CD33^+CD14^-$) (рисунок 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашем исследовании преобладающим цитоморфологическим вариантом при ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* являлся острый миеломоноцитарный лейкоз (М4) (64,5%), в 35% случаев – с эозинофилией. В более ранних работах по изучению клеток ОМЛ также показано, что М4-вариант наиболее часто встречается при ОМЛ данной цитогенетической подгруппы [4, 13, 14].

В 46,7% случаев клетки ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* коэкспрессировали маркер Т-лим-

фоцитов CD2. Данную особенность этого цитогенетического варианта лейкоза отмечали в других исследованиях [4, 15, 16], причем наличие на мембране опухолевых клеток CD2 в сочетании с *inv(16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11* является фактором хорошего прогноза лечения [16, 17], в то время как

экспрессия CD2 при других ОМЛ имеет неблагоприятное прогностическое значение [17]. Помимо CD2 в нескольких случаях выявлялись другие коэкспрессируемые антигены: CD19, CD7 и даже NG2, который является высокоспецифичным маркером для острого лейкоза с перестройками в гене *KMT2A* [18, 19]. При

Рисунок 6

Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления химерного транскрипта *CBFB-MYH11* (синий цвет) и контрольного транскрипта *ABL* (зеленый цвет) в отсортированных моноцитарной ($CD45^+CD33^+CD117^-CD14^+$) и бластной ($CD45^+CD117^+CD33^+CD14^-$) частях опухолевой популяции. Величина нормализованного числа копий *CBFB-MYH11* составила 218,69% и 112,86% соответственно

Figure 6

Real time qPCR results of chimeric transcript *CBFB-MYH11* detection (blue) and control transcript *ABL* (green) in sorted monocytic ($CD45^+CD33^+CD117^-CD14^+$) and myeloblastic ($CD45^+CD117^+CD33^+CD14^-$) leukemic subpopulations. The value of normalized number of copies was 218.69% and 112.86% respectively

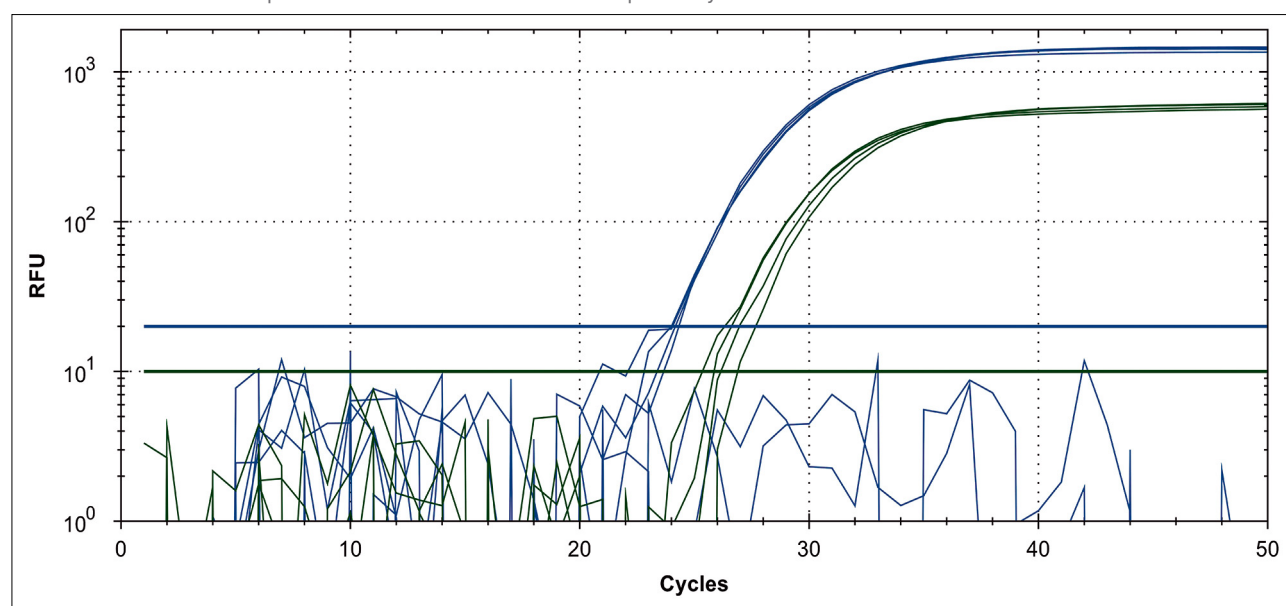


Рисунок 7

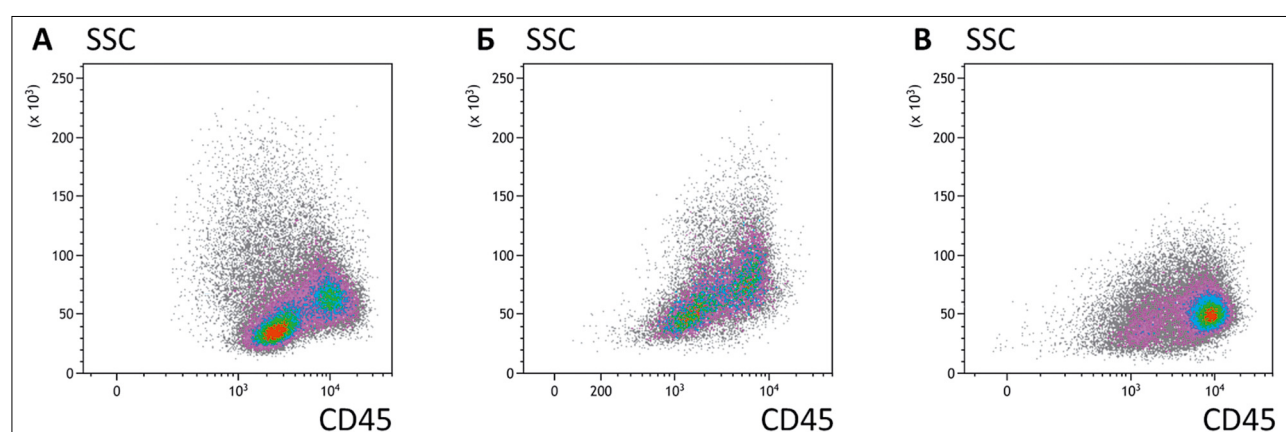
Примеры распределения клеток, демонстрирующие различные варианты соотношения величины миелобластной и моноцитарной частей опухолевой популяции у пациентов при ОМЛ с *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*

На точечных графиках отображена только опухолевая популяция; миелобластная часть имеет меньший уровень экспрессии CD45 и более низкий показатель SSC по сравнению с моноцитарной. А – опухолевые миелобласты количественно преобладают над моноцитами; Б – количество миелобластов и моноцитов приблизительно одинаковое; В – опухолевые моноциты преобладают над миелобластами. Точечные графики построены с учетом плотности распределения клеток, красный цвет отражает максимальное количество клеток, серый – минимальное

Figure 7

Examples of different ratio between myeloblastic and monocytic parts of leukemic population in AML with *inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*

Only leukemic cells population is displayed on the dot plots; myeloblastic part have lower CD45 expression and SSC level than monocytic one. A – size of myeloblastic population is bigger than size of monocytic population; Б – sizes of monocytic and myeloblastic populations are approximately equal; В – size of monocytic population is bigger than size of myeloblastic population. Dot plots are performed in "density" mode: the highest cells concentration is shown in red, while lowest – in grey



этом ранее было установлено, что именно ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* является второй по численности среди цитогенетических подгрупп после ОМЛ с перестройками гена *KMT2A* у пациентов с NG2-позитивными ОМЛ как в группе детей в возрасте до 1 года, так и в группе старше 1 года [20].

Антигенный профиль опухолевой популяции при ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* отличается крайней гетерогенностью: большинство исследуемых маркеров в каждом отдельном случае экспрессировалось на разном проценте опухолевых клеток. Было отмечено 4 маркера, которые чаще других экспрессировались на более чем половине лейкоэмических клеток – это CD45, CD11a, CD13 и CD33. При этом у 30 (83,3%) из 36 пациентов опухолевая популяция состояла из 2 частей: миелобластной и моноцитарной. Данные части популяции имели существенные различия в интенсивности экспрессии CD45, CD34, CD117, CD33, CD14, CD11b, CD123, CD15, CD45RA, что позволяло отдельно идентифицировать их на точечных графиках. При этом в миелобластной и моноцитарной субпопуляциях детектировался приблизительно одинаковый уровень экспрессии *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11*. Похожие данные получены Н. Adriaansen и соавт. [15]: в своей работе они делают акцент на наличии не только бластной, но и более зрелой моноцитарной популяции в составе опухоли, заметно отличающихся друг от друга по экспрессии ряда маркеров (CD34, CD14, CD33). Также высказывалось мнение, что эозинофилы могут являться частью опухолевой популяции, так как в них обнаруживается химерный ген или транскрипт [21]. Однако, по данным нашего исследования, наличие эозинофилии плохо детектируется при помощи проточной цитометрии (лишь в 1/7 случаев), в результате чего данный метод крайне ограничено применим для изучения и описания аномалий их иммунофенотипа.

В отличие от клеток ОЛЛ опухолевые бласты при ОМЛ сохраняют способность к созреванию [22], что приводит к сложностям при отделении опухолевой популяции на точечных графиках от остальных клеток в КМ и, как следствие, к трудностям в интерпретации результатов цитометрического исследования. Несмотря на то, что изучение иммунофенотипа опухолевых клеток при ОМЛ ведется уже не одно десятилетие, до сих пор не существует единой точки зрения относительно того, следует ли при описании антигенного профиля опухолевой популяции учитывать ее относительно зрелую часть или правильнее ограничиваться описанием лейкоэмических бластов. ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* является одним из типов лейкоза, при котором в КМ часто встречается низкое содержание опухолевых клеток-предшественников (< 20%) [23].

При этом именно порог в 20% опухолевых клеток является границей между диагнозом миелодиспластического синдрома и ОМЛ [2]. В нашем исследовании наличие менее 20% лейкоэмических бластов в КМ наблюдалось у 6 (16,7%) из 36 пациентов. Добавление к этому количеству моноцитов, являющихся дериватами опухолевого клона, но морфологически мало отличающихся от нормальных, неопухолевых моноцитов, увеличивало размер лейкоэмической популяции до более чем 40%. Эта принадлежность «зрелых» терминальных клеток к лейкоэмическому клону подтверждает обоснованность «снятия» диагностического порога при патогномичных для ОМЛ генетических аномалиях, каковой является *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11*. Кроме того, на практике результаты иммунофенотипирования чаще всего доступны раньше, чем результаты цитогенетического и молекулярно-генетического исследований, поэтому правильное инициальное определение наличия ОМЛ даже при низком количестве бластов имеет существенное значение для проведения комплексной диагностики. На наш взгляд, в случае гетерогенных ОМЛ при описании иммунофенотипа лейкоэмических клеток следует учитывать моноцитарную популяцию в составе опухолевой. В пользу такого алгоритма анализа цитометрических данных свидетельствуют одинаковые коэкспрессии лимфоидных антигенов и одинаковая экспрессия химерного гена миелобластной и моноцитоидной популяций, а также отсутствие четкой границы между ними на точечных графиках («плавное перетекание» одной популяции в другую). При этом соотношение моноцитарной и миелобластной частей в составе опухолевой популяции может варьировать у пациентов с ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11* (рисунк 7). В то же время нормальные моноциты, расположенные на графиках отдельной группой клеток, не имеющие иммунофенотипических аберраций и никак не связанные по изменению экспрессии антигенов с миелобластной популяцией, к опухоли при итоговом описании иммунофенотипа ОМЛ отнесены быть не могут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование позволило детально охарактеризовать иммунофенотип опухолевых клеток при ОМЛ с *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11*. Показанное типичное распределение клеток на графиках позволяет предполагать наличие столь важной цитогенетической аберрации уже на стадии проведения иммунофенотипирования. Также рекомендовано при описании иммунофенотипа образования учитывать часто выявляемую гетерогенность опухолевой популяции.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Mikhailova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3450-0498>

Kashpor S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5220-7412>

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

Semchenkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7082-1694>

Dubrovina M.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8228-4876>

Plyasunova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4503-0735>

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

Kalinina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5626>

Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

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

Литература

- Norris D., Stone J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Geneva: WHO; 2008; 22–23.
- Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391–405.
- Liu P., Tarle S.A., Hajra A., Claxton D.F., Marlton P., Freedman M. et al. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993; 261 (5124): 1041–4.
- Bain B.J., Bene M.C. Morphological and immunophenotypic clues to the WHO categories of acute myeloid leukaemia. *Acta haematologica* 2019; 141 (4): 232–44.
- Bolouri H., Farrar J.E., Triche Jr.T., Ries R.E., Lim E.L., Alonzo T.A. et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nature medicine* 2018; 24 (1): 103–12.
- Delaunay J., Vey N., Leblanc T., Fenaux P., Rigal-Huguet F., Witz F. et al. Prognosis of inv(16)/t(16; 16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003; 102 (2): 462–9.
- Buldini B., Maurer-Granofszky M., Varotto E., Dworzak M.N. Flow-cytometric monitoring of minimal residual disease in pediatric patients with acute myeloid leukemia: recent advances and future strategies. *Front Pediatr* 2019; 7: 412. DOI: 10.3389/fped.2019.00412
- Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9 (10): 1783–6.
- Gonggrijp H.S., Augustinus E., Leeksa C.H. Hot bands: a simple G-banding method for leukemic metaphases. *Cancer genetics and cytogenetics* 1985; 15 (3–4): 373–4.
- McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. ISCN 2016: An international system for human cytogenomic nomenclature. Karger: Basel; 2016.
- Gabert J., Beillard E., Van der Velde V.H.J., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17 (12): 2318–57.
- Lambert C., Preijers F.W., Yanikkaya Demirel G., Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2017; 92 (3): 180–8.
- Von Neuhoff C., Reinhardt D., Sander A., Zimmermann M., Bradtke J., Betts D.R. et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol* 2010; 28 (16): 2682–9.
- Voigt A.P., Brodersen L.E., Alonzo T.A., Gerbing R.B., Menssen A.J., Wilson E.R. et al. Phenotype in combination with genotype improves outcome prediction in acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group protocol AAML0531. *Haematologica* 2017; 102 (12): 2058–68.
- Adriaansen H.J., Te Boekhorst P.A., Hagemeyer A.M., van der Schoot C.E., Delwel H.R., van Dongen J.J. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993; 81 (11): 3043–51.
- van Solinge T.S., Zeijlemaker W., Ossenkoppele G.J., Cloos J., Schuurhuis G.J. The interference of genetic associations in establishing the prognostic value of the immunophenotype in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (1): 151–8.
- Perea G., Domingo A., Villamor N., Palacios C., Junca J., Torres P. et al. Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients. *Leukemia research* 2005; 29 (10): 1109–16.
- Mauvieux L., Delabesse E., Bourquelot P., Radford-Weiss I., Bannaceur A., Flandrin G. et al. NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. *British journal of haematology* 1999; 107 (3): 674–6.
- Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю., Стрелева О.В., Шориков Е.В., Савельев Л.И. и др. Иммунофенотипическая характеристика острого миелоидного лейкоза у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2013; 1: 33–9.
- Zerkalenskova E., Mikhaylova E., Lebedeva S., Illarionova O., Baidun L., Kashpor S. et al. Quantification of NG2-positivity for the precise prediction of KMT2A gene rearrangements in childhood acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2021; 60 (2): 88–99. DOI: 10.1002/gcc.22915
- Haferlach T., Winkemann M., Löffler H., Schoch R., Gassmann W., Fonatsch C. et al. The abnormal eosinophils are part of the leukemic cell population in acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils (AML M4Eo) and carry the pericentric inversion 16: a combination of May-Grunwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996; 87 (6): 2459–63.
- Basso G., Buldini B., De Zen L., Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001; 86 (7): 675–92.
- Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B., Dworzak M.N., Adachi S., de Bont E. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2012; 120 (16): 3187–205.