

ПАЛЛАДИНА АЛЕКСАНДРА ДМИТРИЕВНА

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, академик РАН **Стилиди Иван Сократович**)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Тупицын Николай Николаевич

доктор медицинских наук

Попа Александр Валентинович

Официальные оппоненты:

Ковригина Алла Михайловна, доктор биологических наук, заведующая патологоанатомическим отделением федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Масчан Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора - директор Института молекулярной и экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «2» июня 2022 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522, г. Москва, Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....» 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) детского возраста – это одна из наиболее сложных групп заболеваний, до сих пор не имеющая надежных способов излечения. Это чрезвычайно гетерогенная группа заболеваний, включающая 8 морфоцитохимических и иммунофенотипических вариантов. Некоторые из этих вариантов являются редкими, другие встречаются более часто, но в целом ОМЛ у детей встречается значительно реже, чем острые лимфобластные лейкозы (примерно 15-20% от острых лейкозов), и это в сочетании с гетерогенностью болезни делает поиск диагностических и лечебных средств более сложным. Важно отметить, что в лечении ОМЛ у детей достигнуты значительные успехи, которые обусловлены, в том числе, индивидуализацией терапии в зависимости от варианта ОМЛ и групп риска. Одним из главных прогностических факторов при данном заболевании является достижение ремиссии у больного после первого курса индукционного лечения. Ранее факт достижения костномозговой ремиссии документировался на основании наличия менее 5% бластных клеток в костном мозге. В настоящее время существуют методы, позволяющие существенно повысить порог обнаружения злокачественных миелобластов в костном мозге. Это, в первую очередь, проточная цитометрия, позволяющая обнаруживать одну злокачественную клетку на 100000 и более миелокариоцитов. Более того, метод проточной цитометрии позволяет точно следить за динамикой опухолевого процесса в костном мозге, проводить мониторинг наличия остаточной лейкоэмической популяции. Это дает возможность судить о наличии минимальной остаточной болезни (МОБ) на всем протяжении заболевания, а также диагностировать возобновление процесса даже при появлении малого количества злокачественных миелобластов (0,1% и менее среди миелокариоцитов). Подобные углубленные исследования абсолютно необходимы, так как доказано, что наличие минимальной остаточной болезни является мощным предиктором рецидива, а своевременная модификация лечения, в том числе его интенсификация с использованием высокодозной химиотерапии,

таргетных препаратов и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток позволяет остановить болезнь и продлить жизнь пациента или даже добиться его излечения. В связи с этим поиск иммунологических методов слежения за злокачественными клетками ОМЛ представляет одну из наиболее актуальных задач детской онкогематологии.

Цель исследования

Оценка возможностей проточно-цитометрической диагностики минимальной остаточной болезни при ОМЛ у детей.

Задачи исследования

1. Провести изучение бластных клеток при диагностике ОМЛ с использованием многопараметровой проточной цитометрии.
2. Оценить возможность использования данных первичного (при диагностике) иммунофенотипа в мониторинге достижения ремиссии и диагностике минимальной остаточной болезни.
3. Дать описание алгоритма диагностики ОМЛ с помощью моноклональных антител при различных морфоцитохимических вариантах заболевания.
4. Установить наиболее частые маркерные комбинации, позволяющие диагностировать МОБ при различных морфоцитохимических вариантах ОМЛ.
5. Установить соотношение МОБ - статуса с диагностикой групп риска при ОМЛ у детей.
6. Оценить роль иммунологических маркеров бластных клеток в достижении ремиссии у больных ОМЛ.

Методология и методы и исследования

В исследование включены 137 детей, больных острым миелоидным лейкозом, и ребенок, у которого была диагностирована опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (ОБПДК) с поражением кожи, костного мозга и селезёнки. Лечение больных осуществлялось по протоколам AML BFM

87, AML BFM 2004, НИИ ДОГ ОМЛ 2002, НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012. Всем больным проводилось диагностическое иммунофенотипическое исследование. Минимальная остаточная болезнь проанализирована у 28 пациентов, получавших лечение по поводу впервые выявленного острого миелоидного лейкоза в период с 2014 г. по 2021 г. по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012, а также у ребенка, у которого была диагностирована опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток. У всех детей на момент определения минимальной остаточной болезни была достигнута костномозговая ремиссия (бластные клетки костного мозга менее 5%). Большинству пациентов группы уровень МОБ оценивался перед началом 2 курса химиотерапии с эпигенетическими препаратами, у 5 пациентов МОБ оценивалась в более поздние сроки.

Для статистической обработки результатов применяли программу «IBM SPSS Statistics 21». Оценка функции выживаемости пациентов проводилась с помощью метода Каплана-Мейера. Статистическая значимость различий кривых выживаемости проводилось методами лог-ранк, бреслоу, тарон-уоре. Сравнение данных двух независимых групп проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона.

Научная новизна

На основании исследования первичного иммунофенотипа у 135 детей с ОМЛ установлены наиболее часто встречающиеся антигены бластных клеток и их комбинации.

Показано, что ОМЛ детского возраста является чрезвычайно гетерогенным по морфологическим, цитохимическим и иммунофенотипическим признакам заболеванием. Показано, что диагностика МОБ может базироваться только на данных первичного многопараметрового иммунофенотипирования. В нашей работе в качестве стандарта использованы рекомендации Европейского консорциума Еврофлоу, основанные на 8-цветных панелях моноклональных антител к различным линиям гемопоэза, стадиям зрелости лейкозных клеток, aberrантной экспрессии маркеров.

Показано, что наиболее частым лимфоидным маркером на клетках ОМЛ является Т-клеточно-ассоциированный антиген CD7. Мониторинг МОБ у больных ОМЛ по данному маркеру представляет большую ценность.

Другим лимфоидно-ассоциированным маркером клеток ОМЛ явился В-клеточный антиген CD19. Установлена достоверная связь экспрессии CD19 с вариантом М2 ОМЛ и t(8;21).

Установлено, что В-линейный антиген CD19 ассоциирован с благоприятным прогнозом на основании достоверной связи с частотой достижения ремиссий.

Нами показано, что в случае мегакариобластного варианта ОМЛ определение МОБ должно базироваться на определении линейной принадлежности бластных клеток с учетом установленных при диагностике особенностей иммунофенотипа.

Предложен алгоритм оценки опухолевой нагрузки при опухоли из бластных плазмочитоидных дендритных клеток на основе соотношения CD56-позитивных и CD56-негативных плазмочитоидных дендритных клеток.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные могут использоваться на практике в диагностике и лечении ОМЛ у детей. Это в первую очередь относится к первичной иммунологической диагностике лейкоза, которая должна быть многопараметровой, базироваться на оценке экспрессии маркеров всех клеточных линий миелопоэза и дополнительных маркеров несвойственных линий.

Доказано, что уровень МОБ является важным клиническим критерием, взаимосвязанным с безрецидивной выживаемостью у больных ОМЛ. Это позволяет внести данный критерий в признаки, на основании которых осуществляется стратификация больных на группы риска. Использование критерия МОБ позволит своевременно корректировать терапию и улучшить результаты лечения.

В случаях выявления МОБ-позитивного статуса необходимо тщательное

отслеживание динамики клиренса популяции аберрантных клеток.

Личный вклад

Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной изучаемой в представленной работе проблеме. Автор лично принимал участие в диагностике острых лейкозов и оценке минимальной остаточной болезни. Автором выполнен анализ динамики клиренса опухолевых клеток у пациента с опухолью из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток. Автором произведен сбор данных на основе медицинской документации, определены факторы для создания базы данных, сформированы электронные таблицы для проведения статистического анализа. Автором проведена статистическая обработка и интерпретация данных, полученных в результате исследования. Автором оформлена диссертационная работа и сформулированы выводы.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Медицинские науки»).

Положения, выносимые на защиту

Оценка минимальной остаточной болезни при ОМЛ у детей, учитывая выраженную иммунологическую гетерогенность заболевания, должна основываться на особенностях иммунофенотипа бластных клеток, установленного при диагностике заболевания. Диагностическая панель оценки МОБ при миелоидных вариантах ОМЛ (M0-M2) у детей должна базироваться на экспрессии маркеров CD45 (гейтирование клеток-предшественников), CD117 (миелоидные предшественники), CD34 (стволовые гемопоэтические клетки), CD33 (пан-миелоидный антиген) в пределах ядросодержащих клеток костного мозга также с учетом аберрантной экспрессии антигенов, установленной при диагностике ОМЛ.

В случаях острых мегакариобластных лейкозов мониторинг МОБ может осуществляться на основании линейной принадлежности бластных клеток –

мегакариобластной (CD61, CD41, CD42), в сочетании с маркерами aberrантности, выявленными при диагностике. Наиболее частым признаком aberrантности ОМЛ у детей, позволяющим проводить определение МОБ, является экспрессия лимфоидно-ассоциированных антигенов (CD7, CD19), а также экспрессия CD56.

Достижение костномозговой ремиссии у больных ОМЛ не взаимосвязано с возрастом, полом больных и морфоцитохимическим вариантом заболевания. При уровне МОБ выше 0,1% отмечается снижение безрецидивной выживаемости (различия близки к достоверным, $p=0,09$). По этой причине обнаружение МОБ может являться критерием рестратификации больных в группу более высокого риска в сочетании с другими факторами неблагоприятного прогноза.

Диагностика минимальной остаточной болезни при опухоли из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток должна основываться не только на определении количества CD56-позитивных плазмцитоподобных дендритных клеток, но и на соотношении $CD123^+CD4^+CD56^+/CD123^+CD4^+CD56^-$ клеток.

Наличие на бластных клетках коэкспрессии CD19 ассоциировано с более высокой частотой достижения ремиссии ($p=0,024$).

Внедрение результатов исследования

Разработанные принципы определения минимальной остаточной болезни используются при иммунологической оценке эффекта проведенного лечения в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клинико-лабораторной диагностики НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Диссертация апробирована 18 июня 2021 года на совместной научной конференции лаборатории иммунологии гемопоэза, клинико-диагностической лаборатории, лаборатории клинической иммунологии отдела клинико-лабораторной диагностики, отделения химиотерапии гемобластозов и отделения трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток отдела гематологии и трансплантации НИИ клинической онкологии им. академика РАН

и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и отделения химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Материалы диссертационного исследования опубликованы в 4 печатных работах в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит введение, 5 глав, обсуждение и заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Работа иллюстрирована 34 таблицами и 25 рисунками. Перечень используемой литературы включает 176 источников, из которых 13 отечественных и 163 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включены 137 детей, больных острым миелоидным лейкозом (60 девочек и 77 мальчиков) в возрасте от 3 месяцев до 17 лет (медиана 7,0 лет), и ребенок 16 лет, у которого была диагностирована опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток с поражением кожи, костного мозга и селезенки. Все пациенты проходили обследование в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и получали лечение в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии (ДОГ) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по протоколам AML BFM 87, AML BFM 2004, НИИ ДОГ ОМЛ 2002, НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012, а также в ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы» по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012 (4 пациента) в период с 1991 г. по 2021 г.

Пациенты с промиелоцитарным лейкозом в настоящее исследование не были включены.

Диагноз устанавливали на основании клинико-гематологических показателей, морфологического, цитохимического и иммунофенотипического исследований костного мозга, большинству больных (74,1%) выполнялись цитогенетическое и молекулярное исследования.

Морфологическое и цитохимическое исследования аспиратов костного мозга больных отделения химиотерапии гемобластозов НИИ ДОГ проводились в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Препараты костного мозга были окрашены по методике Романовского-Гимза. Сухие мазки фиксировались в растворе фиксатора Май-Грюнвальда, промывались дистиллированной водой, затем погружались в рабочий раствор готового красителя Романовского-Гимза. Далее препараты снова промывались дистиллированной водой и высушивались. Подсчёт миелограммы производился двумя врачами, по 250 клеток каждым (в каждом случае подсчитывалось от 200 до 500 миелокариоцитов). Количественные показатели миелограммы оценивались в соответствии с нормативными. Цитохимические исследования, выполнявшиеся каждому пациенту при диагностике, включали определение в опухолевых клетках миелопероксидазы, липидов, PAS-положительного вещества и альфа-нафтилацетатэстеразы (α -НАЭ) с ингибированием фторидом натрия.

Иммунофенотипирование опухолевых клеток костного мозга производилось методом 3-8 цветной проточной цитометрии на приборах BD FACS Canto II и FACScan (Becton Dickinson) в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

При проведении диагностики всем больным осуществляли подробное иммунофенотипирование бластных клеток. В последние годы диагностические подходы базировались на 8-цветной концепции Еврофлоу, которая включает в себя оценку линейности лейкоза по ориентационной пробе ALOT с последующим

анализом бластных клеток согласно их линейной принадлежности (Таблица 1).

Таблица 1 – Панель моноклональных антител для диагностики острых миелоидных лейкозов

Флуорохром № пробы	V450	V500	FITC	PE	PE- cy5	PE- cy7	APC	APCH7
1	HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
2	HLA-DR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
3	HLA-DR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
4	HLA-DR	CD45	nuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
5	HLA-DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD42a/ CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
7	HLA-DR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

Клетки костного мозга инкубировали с мечеными флуорохромами антителами, затем отмывали фосфатно-солевым буфером. Результаты реакции оценивались при помощи программы FCS Express V3.

При проведении диагностического иммунофенотипирования гейт бластных клеток формировался на основании сочетания параметров бокового светорассеяния и низкой/промежуточной экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45. Далее производилась оценка экспрессии мембранных и цитоплазматических антигенов на бластных клетках: популяция считалась позитивной по тому или иному маркеру, если 20% и более клеток экспрессировали исследуемый антиген.

Минимальная остаточная болезнь проанализирована у 28 пациентов с ОМЛ. В группу вошли 12 мальчиков и 16 девочек в возрасте от 5 месяцев до 17 лет

(медиана возраста 5 лет), получавших лечение по поводу впервые выявленного острого миелоидного лейкоза в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (26 пациентов) и Морозовской ДГКБ (2 пациента) в период с 2014 г. по 2021 г. по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012. У 2 пациентов был синдром Дауна. У 2 пациенток острый миелоидный лейкоз был связан с предшествующей химиотерапией по поводу других злокачественных новообразований: первый диагноз пациентки 10 лет – нефробластома T2N0M0, первый диагноз пациентки 6 лет - мелкокруглоклеточная саркома с поражением задних отрезков X, XI ребер и плевры справа, задних отделов левой орбиты. 6 детей анализируемой группы перенесли аллогенную трансплантацию. У всех пациентов группы на момент определения минимальной остаточной болезни была достигнута костномозговая ремиссия (бластные клетки менее 5% при подсчёте не менее 200 миелокариоцитов); в то же время у части больных наблюдалось неполное восстановление показателей крови (нейтропения $<1 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитопения $<100 \times 10^9/\text{л}$). Большинству пациентов группы уровень МОБ оценивался перед началом 2 курса химиотерапии с эпигенетическими препаратами, у 5 пациентов МОБ оценивалась в более поздние сроки.

При определении минимальной остаточной болезни панель антител составлялась индивидуально для каждого случая сообразно первичному иммунофенотипу бластных клеток пациента. Анализировались 2 миллиона событий. Путем последовательного гейтирования выделялась популяция клеток с иммунологической aberrантностью, соответствующей таковой при первичном исследовании. Оценка МОБ-статуса в работе производилась относительно величины 0,1% от миелокариоцитов (при количестве aberrантных миелоидных клеток более 0,1% от миелокариоцитов – МОБ-позитивный статус), что соответствует стратегии большинства исследовательских групп.

Результаты исследования

Использован комплексный подход к иммуноморфологической диагностике ОМЛ, который включает использование иммунологических маркеров

диагностики всех вариантов лейкоза (включая мегакариобластные, эритробластные), а также опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток. Используются маркеры незрелых клеток, общемиелоидные маркеры, маркеры различных линий миелопоэза и антигены, несвойственные миелоидным клеткам, которые могут считаться aberrantными и использоваться в дальнейшем при диагностике МОБ.

Минимальная остаточная болезнь при острых миелоидных лейкозах детского возраста

Острые миелоидные лейкозы - это чрезвычайно гетерогенная группа заболеваний. В соответствии с морфоцитохимической классификацией ФАБ выделяется 8 вариантов ОМЛ. Дальнейшую гетерогенность документируют по наличию иммунофенотипических особенностей и хромосомных aberrаций.

Минимальная остаточная болезнь проанализирована у 28 пациентов детского возраста. В каждом случае отмечалась aberrантность или особенности иммунофенотипа, позволившие разграничить нормальные миелоидные предшественники от опухолевых. В таблице 2 суммированы особенности иммунофенотипа бластных клеток больных в этой группе.

Таблица 2 – Особенности иммунофенотипа клеток ОМЛ при оценке минимальной остаточной болезни

№	Пациент	Вариант по ФАБ	Особенности иммунофенотипа
1	Ю.А.С.	M1	Коэкспрессия CD7, CD64, отсутствие CD34
2	А.Н.	M2	Коэкспрессия CD56 почти на всех бластах
3	Б.Н.А. синдром Дауна	M2	Сниженная экспрессия CD13, отсутствие CD34
4	Б.	M4	Коэкспрессия CD71, CD15
5	Б.К.	M2	Коэкспрессия CD19
6	Д.Д.А	M4	Коэкспрессия CD7, CD64, отсутствие CD34
7	Д.Е.	M0	Коэкспрессия суCD79 α , отсутствие CD13

Продолжение таблицы 2

8	Д.Я.	M4	Коэкспрессия CD71, CD15, CD123, отсутствие на бластах CD33
9	Е.В.	M0	Коэкспрессия CD64
10	И.Т.А. синдром Дауна	M7	Коэкспрессия CD7, CD35, CD71
11	И.Д.	M7	Коэкспрессия CD7, отсутствие CD13 и CD34
12	К.С.П.	M7	Отсутствие CD13 и CD34
13	К.И.	M2	Коэкспрессия CD11b, CD64, отсутствие CD117
14	К.Г.А.	M7	Коэкспрессия CD7, отсутствие CD117, CD34
15	К.	M1	Отсутствие HLA-DR
16	К.А.Г.	M7	Коэкспрессия CD7, CD300, CD11b, CD123, отсутствие CD13 и CD33
17	К.В. вторичный ОМЛ	M1	Отсутствие CD33
18	Л.Д.	M2	Коэкспрессия CD123, отсутствие CD34
19	М.Т.Е. вторичный ОМЛ	M0	Коэкспрессия CD7
20	М.Т.Т.	M2	Коэкспрессия CD7, отсутствие CD13
21	О.А.А.	M0	Коэкспрессия CD64
22	С.В.	M1	Коэкспрессия суCD79 α , CD64, CD56, CD15
23	С.Д.Я.	M7	Отсутствие CD117, CD34
24	С. Н.	M6	Коэкспрессия CD7
25	Ф.А.	M4	Коэкспрессия CD64, слабая экспрессия CD34
26	Ф.Д.А.	M0	Коэкспрессия CD71
27	Ш.Ю.	M1	Отсутствие HLA-DR, CD34, CD13
28	Э.	M7	Отсутствие CD34

Т-клеточно-ассоциированный антиген CD7 был экспрессирован практически при всех морфоцитохимических вариантах ОМЛ. Частота

экспрессии данного антигена в анализируемой группе составила 9/28 случаев (32,1%).

Как видно из таблицы, большая группа больных ОМЛ характеризовалась экспрессией антигена CD7. Экспрессия CD56 отмечена у 2 больных, причем у одного из них она была практически мономорфной (больная А.Н., №2 в таблице 2, вариант М2 по ФАБ-классификации). Антиген CD64 был экспрессирован у 7 больных, лишь в 2 случаях при варианте М4.

В качестве примера диагностической ценности экспрессии антигена CD7 рассмотрим результаты первичного исследования и оценки МОБ у больной С.Н., 15 лет. При диагностике пунктат костного мозга клеточный. Бластные клетки составляли 62,6%, часть с отростчатой цитоплазмой в виде "ушек", в основном макроформы, с умеренным ядерно/цитоплазматическим соотношением, округлыми ядрами, выраженной базофилией цитоплазмы, в единичных - вакуолизация. Единичные бластные клетки содержали зернистость и палочки Ауэра. Бластные клетки относились к миелобластам. Эритроидный росток составлял 32,8% (много молодых форм). Цитохимическое исследование: миелопероксидаза содержалась в 62,0% бластных клеток; липиды - в 43,0% бластных клеток; гликоген в большинстве бластов в диффузном и диффузно-гранулярном виде; неспецифическая эстераза - в части бластных клеток на (+), не гасится NaF. По морфоцитохимическим данным картина костного мозга более всего соответствовала острому нелимфобластному лейкозу, в первую очередь – эритроидному варианту ОМЛ (ОМЛ М6а вариант).

При диагностике лейкоза использовали следующую панель моноклональных антител (Таблица 3).

Первая проба указывала на наличие у пациентки острого миелоидного лейкоза - отсутствовали лимфоидные антигены (CD19, суCD3, CD10), имела место положительная реакция на миелопероксидазу, антигены CD34 и CD117. Дальнейший анализ подтвердил наличие у больной ОМЛ. Установлена экспрессия общемиелоидных маркеров CD13, CD33. Отсутствовали признаки мегакариоцитарной направленности дифференцировки – CD61, CD41, CD42b.

Таблица 3 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике варианта ОМЛ у больной С.Н.

№ пробы	Флуорохромы, антитела (CD,%)							
	V450	V500	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	HLA-DR 57,9	CD45 слабо	MPO 34,5	CD19 0,3	CD34 58,1	cy-CD3 0,1	CD117 88,6	CD10 0,1
2	CD45 слабо		CD61 0	CD13 37,8	CD34 58,1		CD123 0	CD71 0
3	CD45 слабо		CD41 0,05	CD33 91,0	CD34 58,1		CD42b 0,3	CD9 91,0
4	CD45 слабо		CD16 0,4	CD7 84,9		CD56 0		
5	CD45 слабо		CD36 51,2	CD105 35,0				

В соответствии с критериями Еврофлоу у больной можно было заподозрить эритробластный вариант – экспрессия CD36 и CD105. У больной был исключен лейкоз из предшественников плазмоцитоидных дендритных клеток на основании отсутствия CD123 и CD56. Особенностью случая явилась выраженная экспрессия на бластных клетках лимфоидно-ассоциированного антигена CD7 (84,9%). Принадлежность клеток к монобластам или миеломонобластам была исключена на основании отрицательной цитохимической реакции на неспецифическую эстеразу.

На рисунке 1 представлена иммунофенотипическая характеристика данного варианта лейкоза.

На основании данных морфоцитохимии и иммунофенотипирования установлен эритроидный вариант ОМЛ – вариант М6а. Особенностью случая явилась экспрессия лимфоидно-ассоциированного антигена CD7.

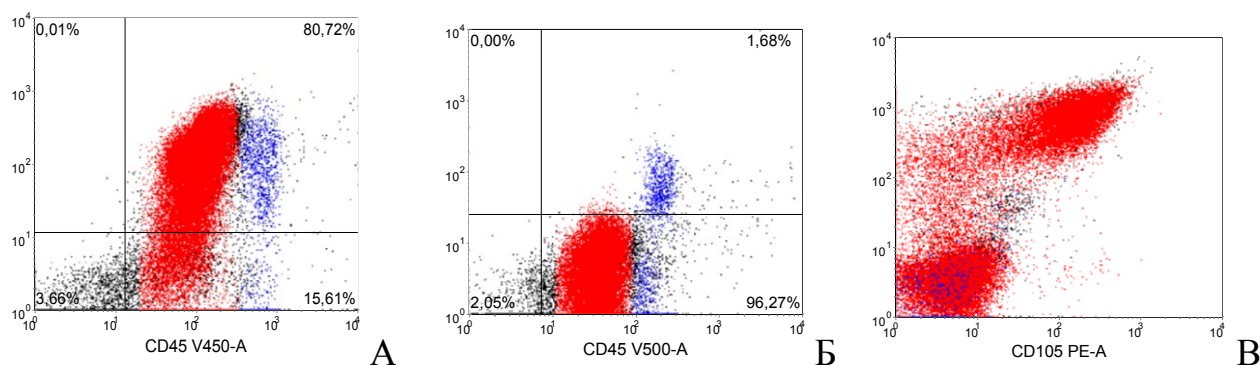


Рисунок 1 - Иммунофенотипическая характеристика бластных клеток больной С.Н. при диагностике. Красным цветом обозначены бластные клетки, выделены на основании слабой экспрессии CD45 и светорассеяния; синим цветом обозначены лимфоциты, уровень CD45 высокий. **2А** – Экспрессия антигена CD7 на бластных клетках и лимфоцитах; **2Б** – Отсутствие цитоплазматического CD3 в бластных клетках, экспрессия в лимфоцитах; **2В** – Коэкспрессия антигенов CD105 и CD36 на большинстве бластных клеток.

Диагностика МОБ у больной была проведена многократно, первый раз – на 46-й день от начала блока НАМ с дакогеном. Костный мозг был гипоклеточным, бластные клетки не определялись (0%), лимфоциты - 31,2%, гранулоцитарный росток снижен (45,2%), представлен, в основном, зрелыми формами (44,8%), умеренно выражена моноцитарная реакция (14,4%), эритроидный росток снижен (9,2%), мегакариоциты единичные.

При иммунологической оценке МОБ использовали маркеры, которые были выявлены на бластных клетках при диагностике – CD117, CD36, CD7, CD33. Ядродержащие клетки идентифицировали с помощью нуклеотропного красителя Syto41. Миелоидные CD117+ клетки с коэкспрессией CD7 составили 0,63% среди миелокариоцитов, 59,6% из них слабо экспрессировали CD45 (бластные клетки). Это позволило установить уровень 0,375% клеток, которые по иммунофенотипу соответствуют таковым при диагностике лейкоза, то есть уровень МОБ составил 0,375%, что соответствует МОБ-положительному статусу.

Примененный диагностический подход, основанный на комплексной оценке иммунофенотипа бластных клеток, позволил уже на этапе диагностики ОМЛ

определился с тем, какой набор маркеров может быть использован в каждом конкретном случае для диагностики МОБ.

У 3 больных отмечена коэкспрессия В-линейных антигенов бластными клетками ОМЛ: в 2 случаях – CD79 α и в 1 – CD19. Мониторинг МОБ у этих больных осуществлялся с учетом экспрессии этих В-клеточных антигенов и особенностей иммунофенотипа, установленного при диагностике лейкоза.

Особую группу составили случаи острого мегакариобластного лейкоза (7 пациентов): диагностика МОБ состояла в выделении мегакариобластов с aberrантным иммунофенотипом, соответствующим таковому при диагностике.

Мегакариоцитарные антигены были экспрессированы у всех больных. Лишь в 1 случае отсутствовала экспрессия антигена CD42b. Частой явилась коэкспрессия на лейкозных мегакариобластах лимфоидно-ассоциированного антигена CD7 (4 из 6). В таблице 4 представлена характеристика иммунофенотипа мегакариобластов у больных М7 ОМЛ. Так, в большинстве случаев присутствовала экспрессия антигенов CD9 (5 из 6 случаев) и CD33 (5 из 7). Ряд маркеров (MPO, CD64, CD4, HLA-DR, CD22, cyCD79a, CD19, TdT) отсутствовали во всех изученных случаях. Таким образом, помимо линейной принадлежности к мегакариоцитарному ряду проведенный анализ давал возможность оценить также иммунологические особенности злокачественных бластных клеток при определении минимальной остаточной болезни.

Таблица 4 – Иммунофенотипы пациентов с мегакариобластным вариантом ОМЛ

Маркер	И.Т.А.	С.Д.Я.	К.А.Г.	Э.	И.Д.	К.Г.А.	К.С.П.	Сводное количество (+/всего)
MPO			-		-	-	-	0/4
CD34	+	-	+	-	-	-	-	2/7
CD117	+	-	+	-	-	-	-	2/7
CD13	+	-	-	+	-	-	-	2/7
CD33	+	-	-	+	+	+	+	5/7

Продолжение таблицы 4

CD64	-		-		-	-	-	0/5
CD4			-		-	-		0/3
CD7	+	-	+		+	+	-	4/6
HLA-DR	-	-	-	-	-	-		0/6
CD9	-	+	+	+	+	+		5/6
CD56	+	-	-		-	-		1/5
CD38	+		-	-	-	-		1/5
GPA							-	0/1
CD36	+		-		-	+		2/4
CD105			-		-	-		0/3
CD(61+42a)/ CD61	+	+	+	+	+	+	+	7/7
CD41		+	+		+	+		4/4
CD42b	+	+	+		-	+		4/5
CD71	+				+	-		2/3
CD22	-	-				-		0/3
TdT	-		-	-	-	-		0/5
CD11b			+		-	-		1/3
CD123		-	+	-	-	-		1/5
CD19	-	-	-	-	-	-	-	0/7
CD79a			-			-	-	0/3

Для оценки влияния МОБ-негативного статуса на **показатели выживаемости** применен пороговый уровень в 0,1%. Это наиболее широко используемый пороговый уровень в подобных исследованиях. Пациенты с МОБ-позитивным статусом (более 0,1%), оцененным в первой ремиссии, не отличались по прогнозу (ОВ, БРВ) от МОБ-негативной группы.

В анализируемой группе больных такие факторы прогноза как пол и возраст пациентов не имели взаимосвязи с результатами лечения (показателями выживаемости). В то же время при гиперлейкоцитозе уровень БРВ был ниже ($p=0,1$), чем у детей с уровнем лейкоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$.

На начальных этапах работы были оценены 5 пациентов на наличие МОБ в более поздние после начала лечения сроки (8 месяцев, 2, 6, 4, 5 месяцев от достижения ремиссии). Оценка проводилась в период костномозговой ремиссии. У 2 из этих больных был МОБ-положительный статус. Совершенно очевидно, что и после окончания терапии индукции у этих пациентов статус МОБ был положительным. Оценка выживаемости по всей группе больных показала интересные результаты. Больные с наличием МОБ имели значительно более плохие показатели безрецидивной выживаемости (лог-ранк $p=0,09$, бреслоу $p=0,09$, тарон-уоре $p=0,09$). Таким образом, МОБ в сочетании с другими факторами неблагоприятного прогноза может являться критерием рестратификации больных в группу более высокого риска.

Определение минимальной остаточной болезни при опухоли из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток

Опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (ОБПДК) является крайне редким заболеванием с агрессивным течением. Впервые заболевание было описано в 1994 году под названием «агранулярная CD4-положительная НК-клеточная лейкемия». В названии были отражены морфологические (бластоидность) и иммунологические (экспрессия CD4, CD56) характеристики опухолевого субстрата. В классификации ВОЗ 2008 года заболевание было отнесено к группе острых миелоидных лейкозов, в классификации 2017г. ОБПДК вынесена отдельной рубрикой.

Приводим описание случая ОБПДК с поражением кожи, костного мозга, селезёнки у 16-летнего ребёнка. Диагноз и распространённость были установлены с помощью иммуногистохимического исследования биоптата кожи, морфологического, проточно-цитометрического, цитогенетического

исследований костного мозга, а также КТ грудной клетки и брюшной полости.

Методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что на опухолевых клетках присутствуют CD56 – 85,7%, CD4 – 70%, CD123 – 72,7%, CD43 – 93,8%. Экспрессия CD45 была низкой. Часть бластных клеток (26%) несла на своей поверхности CD7. Маркеры клеток-предшественников (CD34, TdT), зрелых В-клеток (CD19, CD20, CD22, суCD79а); миелоидные антигены (CD33, CD13, MPO, CD61) отсутствовали; опухоль не экспрессировала CD8, CD2, CD10, CD30, CD1a, суCD3, гликофорин А. По окончании этапов лечения проводилось иммунологическое исследование костного мозга: на основании первичного иммунофенотипа опухолевых клеток определялась минимальная остаточная болезнь. Выделение опухолевых клеток осуществляли на основании параметров светорассеяния, нуклеотропного красителя SYTO41, общелейкоцитарного антигена CD45, коэкспрессии опухолеассоциированных антигенов CD4, CD56, CD123, CD43. Стратегия выявления клеток МОБ заключалась в последовательном многопараметровом гейтировании. Первый шаг включал выявление ядросодержащих клеток на основании экспрессии нуклеотропного красителя Syto41. Далее в пределах ядросодержащих клеток подсчитывалось количество клеток, ярко экспрессирующих CD123. Бластные CD123+клетки определялись на основании слабой экспрессии CD45. Затем в пределах бластных элементов выявляли клетки, коэкспрессирующие CD123, CD4 и CD56. В описываемом случае динамика соотношения между CD56-позитивными и CD56-негативными плазмоцитоидными дендритными клетками костного мозга демонстрировала нарастание опухолевого клона в рецидиве заболевания. Изменение этого соотношения стало заметно при анализе гипоклеточного костного мозга в отсутствие повышенного числа бластов при морфологическом исследовании из той же пробирки.

Показано, что измерение отношения CD56+CD123+CD4+ клеток к CD56-CD123+CD4+ клеткам является эффективной стратегией объективной оценки опухолевой нагрузки и вероятности возникновения костномозгового рецидива опухоли из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток.

Роль иммунологических маркеров в прогнозе ОМЛ у детей

Проведена оценка взаимосвязи иммунофенотипа бластных клеток и течения болезни. Ни один из изученных нами маркеров, за исключением CD19, не был взаимосвязан с частотой достижения ремиссии.

В группе пациентов, не достигших ремиссии, CD19 не был экспрессирован ни в одном случае, а в группе достигших ремиссии – в 23 случаях (100%), взаимосвязь достоверна, $p=0,024$, (Таблица 5).

Таблица 5 - Частота достижения ремиссии в зависимости от экспрессии лимфоидно-ассоциированного антигена CD19 ($p=0,024$)

Наличие ремиссии	Ремиссия не достигнута	Ремиссия достигнута	Всего
Случаи ОМЛ без экспрессии CD19	16 (18,8%)	69 (81,2%)	85
Случаи ОМЛ с коэкспрессией CD19	0	23 (100%)	23

Экспрессия антигена CD19 была достоверно ассоциирована с M2 вариантом ОМЛ по ФАБ-классификации ($p=0,003$), что соответствует данным литературы.

Коэкспрессия CD19 на бластных клетках при диагностике была достоверно ассоциирована с наличием $t(8;21)$, $p=0,004$.

Однако, связь с прогнозом - достижением ремиссии - имела только экспрессия CD19, а не вариант лейкоза M2 или наличие $t(8;21)$. Таким образом, вне зависимости от варианта острого миелоидного лейкоза по ФАБ-классификации, обнаружение CD19 на бластных клетках свидетельствует о почти 100% вероятности достижения ремиссии. Разумеется, мониторинг МОБ у данной категории больных также необходим, и он может основываться на обнаружении экспрессии лимфоидно-ассоциированного антигена CD19.

ВЫВОДЫ

1. Проточно-цитометрическая оценка эффективности терапии острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) индивидуальна и основывается на особенностях иммунофенотипа опухолевых клеток. Необходима подробная оценка

иммунофенотипа бластных клеток пациента при диагностике острого миелоидного лейкоза для достоверного определения количества остаточных опухолевых клеток – минимальной остаточной болезни (МОБ).

2. Наиболее частым признаком aberrантности ОМЛ у детей является экспрессия лимфоидно-ассоциированных антигенов (CD7 – 24,2%, CD19 – 21,3%), а также экспрессия CD56 – 34,8%.

3. Особую группу ОМЛ у детей представляют редкие варианты лейкозов – мегакариобластные и опухоль из бластных предшественников плазмоцитоидных дендритных клеток, мониторинг МОБ при которых может осуществляться на основании линейной принадлежности бластных клеток – мегакариобластной (CD61, CD41, CD42), плазмоцитоидных дендритных клеток (CD123, CD4, CD56 при отсутствии маркеров других клеточных линий) в сочетании с маркерами aberrантности, выявленными при диагностике.

4. Экспрессия лимфоидно-ассоциированного антигена CD7 встречается на широком спектре вариантов ОМЛ у детей – эритробластных (M6), мегакариобластных (M7), миелобластных, миеломонобластных (M4). Персистенция CD7 на бластных клетках больного свидетельствует о наличии МОБ у больного.

5. Диагностическая панель при оценке МОБ при миелоидных вариантах ОМЛ (M0-M2) у детей должна базироваться на экспрессии маркеров CD45 (гейтирование клеток-предшественников), CD117 (миелоидные предшественники), CD34 (стволовые гемопоэтические клетки), CD33 (пан-миелоидный антиген) в пределах ядродержащих клеток костного мозга с учетом aberrантной экспрессии антигенов, установленной при диагностике ОМЛ.

6. Персистенция МОБ в сочетании с другими факторами неблагоприятного прогноза может являться критерием рестратификации больных в группу более высокого риска.

7. Диагностика минимальной остаточной болезни при опухоли из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток должна основываться не только на признаках aberrантности, но и на соотношении $CD123^+CD4^+CD56^+$ /

CD123⁺CD4⁺CD56⁻ клеток.

8. Достижение костномозговой ремиссии у больных ОМЛ не взаимосвязано с возрастом, полом больных и морфо-цитохимическим вариантом заболевания. При уровнях МОБ выше 0,1% отмечены более низкие показатели безрецидивной выживаемости (различия близки к достоверным, $p=0,09$).

9. Иммунофенотипические особенности бластных клеток острых миелоидных лейкозов у детей имеют прямую взаимосвязь с эффективностью терапии – достижением ремиссии: экспрессия CD19 на бластных клетках ОМЛ у детей характеризует группу благоприятного прогноза – частота ремиссий 100% (в CD19 - негативной группе – 81,2%), $p=0,024$.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Валиев, Т.Т. Опухоль из бластных плазмочитоидных дендритических клеток / Т.Т. Валиев, Г.З. Серегин, И.Н. Серебрякова, О.А. Чернышева, Н.А. Купрышина, **А.Д. Палладина**, Е.Н. Шолохова, Д.И. Чеботарев, Ж.В. Трацевская, С.Н. Михайлова, М.Б. Дорошенко, Н.Н. Тупицын, Б.В. Курдюков, А.В. Попа // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2019. – 18 (4). – С.79–89.

2. **Палладина, А. Д.** Взаимосвязь иммунофенотипических особенностей бластных клеток с достижением ремиссии при остром миелоидном лейкозе у детей / А. Д. Палладина, А.В. Попа, В.Г. Никитаев, К.Л. Кондратчик, Н.А. Купрышина, И.Н. Серебрякова, Т.В. Шведова, О.А. Чернышева, М.А. Шервашидзе, Н. Н. Тупицын // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – 19(4). – С.45–53.

3. **Палладина, А.Д.** Диагностика и мониторинг минимальной остаточной болезни при остром мегакариобластном лейкозе у детей / А.Д. Палладина, А.В. Попа, Т.Т. Валиев, В.Г. Никитаев, О.А. Чернышева, Н.А. Купрышина, И.Н. Серебрякова, Т.В. Шведова, К.Л. Кондратчик, Н.Н. Тупицын // Современная онкология. – 2021. – 23 (1). – С.148–155.

4. Тупицын, Н.Н. Применение лазерной проточной цитометрии и

световой микроскопии для оценки эффекта лечения острого мегакариобластного лейкоза / Н.Н. Тупицын, Т.В. Шведова, И.Н. Серебрякова, **А.Д. Палладина**, В.Г. Никитаев, А.Н. Проничев // Медицинская техника. – 2021. – 6. – С.10–12.