

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., В.А. Надгорная, к.б.н.,
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Современная диагностика острых миелоидных лейкозов

Продолжение. Начало в №2

Приведем характеристику еще одной формы ОМЛ со сбалансированными транслокациями/инверсиями

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

Данная форма ОМЛ, составляющая 5-8% всех острых миелоидных лейкозов, характеризуется признаками моноцитарной и гранулоцитарной дифференцировки бластов, наличием аномальных клеток эозинофильного ряда в костном мозге. Встречается во всех возрастных группах, но диагностируется преимущественно у молодых больных.

Предполагаемый нормальный аналог – гемопоэтическая стволовая клетка с потенциалом дифференцировки в клетки гранулоцитарного и моноцитарного ряда.

В момент первоначального установления диагноза и особенно при рецидиве может быть представлен миелосаркомой.

Морфология и цитохимия

Помимо обычных морфологических признаков миеломонобластного лейкоза, в костном мозге определяется варьирующий уровень эозинофилов, находящихся на разных стадиях созревания (обычно высокий, но иногда не превышающий 5%). К признакам заболевания может быть отнесено наличие крупных незрелых эозинофильных гранул пурпурно-фиолетового цвета в клетках этого ряда, особенно на стадии промиелоцита и миелоцита. Эти аномалии обычно не выявляются на более поздних стадиях созревания эозинофилов. В зрелых эозинофилах иногда обнаруживается гипосегментация ядер. При цитохимической реакции на ХАЭ, обычно отрицательной в эозинофилах в норме и при ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22)$, в цитоплазме аномальных клеток этого ряда обнаруживается диффузное окрашивание. В миелобластах могут выявляться палочки Ауэра. Как минимум в 3% бластных клеток обнаруживается положительная реакция при определении активности МПО. В монобластах и промиелоцитах, как правило, наблюдается выраженная положительная реакция на НЭ и особенно КНЭ. Лишь в некоторых случаях в бластных клетках активность указанных ферментов может быть слабой или отсутствовать. Помимо преобладающего моноцитарного и эозинофильного компонента, в костном мозге могут определяться и равномерно распределенные в мазке нейтрофилы, но количество зрелых нейтрофилов резко снижено. Картина периферической крови, как правило, не отличается от наблюдающейся у больных с другими формами острых миеломонобластных лейкозов. Очень редко наблюдаются аномалии эозинофилов или увеличение количества эозинофилов в периферической крови (рис. 1).

При ОМЛ с указанными генетическими аномалиями в редких случаях практически отсутствует эозинофилия, обнаруживаются только признаки миелоидного

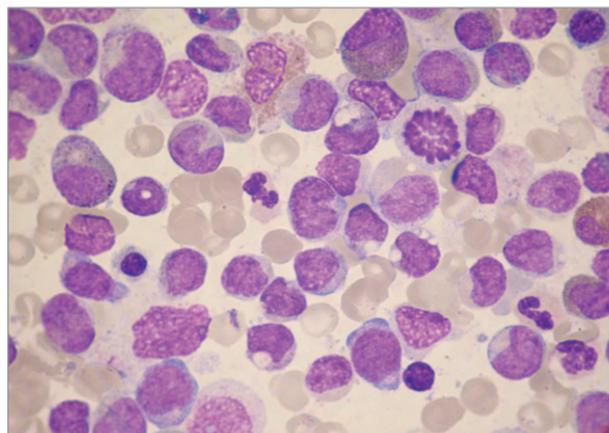


Рис. 1. Острый миеломоноцитарный лейкоз с атипичными эозинофилами $inv(16)(p13.1;q22)$. Картина костного мозга

созревания без моноцитарного компонента или только моноцитарная направленность дифференцировки. Только в отдельных случаях содержание бластов в крови или костном мозге ниже пороговых 20%.

При гистологическом изучении трепанобиоптатов костный мозг представляется гиперклеточным, иногда может быть нормоклеточным.

Иммунофенотип

Лейкемические клетки у большинства больных характеризуются сложным иммунофенотипом. Определяются множественные популяции бластов: незрелые клетки с высокой экспрессией антигенов CD34 и CD117; клоны клеток с признаками дифференцировки в направлении гранулоцитопоэза (CD13, CD33, CD15, CD65, МПО) и моноцитопоэза (CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36). Часто наблюдается асинхронность созревания субстратных клеток. Часто выявляемая коэкспрессия миелоидных антигенов и антигена CD2 не является специфической при установлении диагноза.

Данные цитогенетического и молекулярно-генетического анализа

В лейкемических клетках у большинства больных с данным подтипом ОМЛ определяется $inv(16)(p13.1q22)$, менее часто $t(16;16)(p13.1;q22)$. И в том, и в другом случае происходит слияние гена CBFB на длинном плече 16 хромосомы (q22) с MYH11 на коротком плече той же хромосомы (p13.1) с образованием химерного гена. Известно, что ген MYH11 кодирует тяжелую цепь миозина гладких мышц. Ген CBFB кодирует β -субъединицу гетеромерного фактора транскрипции CBFB, который связывается с T-клеточным рецептором (TCR), генами цитокинов и другими генами. Иногда цитологические признаки ОМЛ с аномальными эозинофилами могут наблюдаться при отсутствии доказательств аномалии хромосомы 16. Но при молекулярно-генетическом исследовании с использованием FISH-метода или ОТ-ПЦР обнаруживается слитный ген CBFB-MYH11.

Почти у 40% больных определяются вторичные цитогенетические аномалии, такие как трисомия по 22 и 8 хромосоме (в 10-15% случаев каждая), $del(7q)$ (5%). Трисомия по 22 хромосоме, редко выявляющаяся при наличии других первичных aberrаций, является достаточной специфической для ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$. В то же время трисомия по 8 хромосоме часто обнаруживается у больных ОМЛ с другими первичными

генетическими аномалиями. Описаны редкие случаи ОМЛ и хронического миелолейкоза (ХМЛ), при которых одновременно выявляются $inv(16)(p13.1q22)$ и $t(9;22)(q34;q11.2)$. При ХМЛ они обычно ассоциируются с переходом в фазу акселерации или бластного криза. Мутации гена KIT обнаруживаются почти у 30% больных.

Прогноз

Результаты клинических исследований свидетельствуют о возможности достижения длительной полной ремиссии у больных ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$ при лечении цитарабином в высоких дозах в фазе консолидации, однако сроки выживаемости у пожилых пациентов ниже. При наличии мутаций гена KIT отмечается тяжелое течение заболевания и высокий риск развития рецидивов. Более благоприятный прогноз отмечается у больных при наличии трисомии по 22 хромосоме в качестве вторичной аномалии.

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

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПМЛ), или ОМЛ с $t(15;17)(q22;q12)$, характеризуется преобладанием в периферической крови и костном мозге аномальных промиелоцитов. Выделяют гипергранулярный (типичный) и микрогранулярный (гипогранулярный) вариант ОПМЛ (рис. 2, 3).

На долю ОПМЛ приходится 5-8% всех острых миелоидных лейкозов. Заболевание диагностируется преимущественно у людей пожилого и среднего возраста.

Предполагаемый нормальный аналог – миелоидная стволовая клетка с потенциалом к дифференцировке в клетки гранулоцитарной линии.

Типичный и микрогранулярный варианты ОПМЛ клинически часто сопровождаются синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдромом). При микрогранулярном варианте ОПМЛ, в отличие от типичного ОПМЛ, в периферической крови определяется повышенное количество лейкоцитов.

Морфология и цитохимия

При гипергранулярном варианте ОПМЛ морфологические признаки преобладающих в костном мозге промиелоцитов включают обильную зернистость (темные крупные гранулы, зачастую покрывающие ядро), крупные палочки Ауэра, изолированные или собранные в пучки. Могут обнаруживаться также миелобласты с палочками Ауэра, содержание которых в костном мозге обычно не превышает 8-10%. В периферической крови отмечается лейкопения, содержание промиелоцитов низкое. Ядра клеток разнообразны по форме и величине. Они могут быть почкообразными, складчатыми,



Д.Ф. Глузман

напоминающими по структуре ядра незрелых моноцитарных клеток, что особенно заметно при более редко встречающемся гипогранулярном варианте ОПМЛ. Промиеоциты при гипогранулярном варианте ОПМЛ имеют меньшее количество азурофильных гранул в более светлой цитоплазме, часто содержат палочки Ауэра (рис. 2, 3).

При цитохимическом исследовании в промиелоцитах как при гипер-, так и гипогранулярном варианте ОПМЛ определяется высокая активность МПО и ХАЭ. Активность КФ в субстратных клетках низкая. Реакция при определении активности α -НЭ слабая, ингибируется фторидом натрия. Напротив, при определении активности КНЭ отмечается интенсивное диффузное окрашивание цитоплазмы клеток. При PAS-реакции в цитоплазме клеток обнаруживается выраженная диффузная окраска. При использовании толудинового синего отмечается специфическое для данной формы ОМЛ метакроматическое окрашивание цитоплазмы клеток. Палочки Ауэра, содержащиеся в цитоплазме клеток, дают положительную реакцию при цитохимическом выявлении активности МПО, ХАЭ, КНЭ и окраске суданом черным.

Иммунофенотип

Гипергранулярный вариант ОПМЛ характеризуется низкой экспрессией или отсутствием на поверхностных мембранах лейкемических клеток антигенов HLA-DR, CD34, CD11a, CD11b и CD18, выраженной экспрессией CD33 и варибельной –

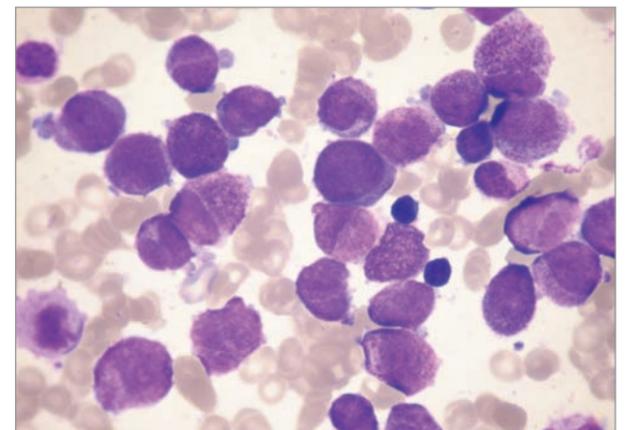


Рис. 2. Острый промиелоцитарный лейкоз, $t(15;17)(q22;q12)$, гипергранулярный вариант

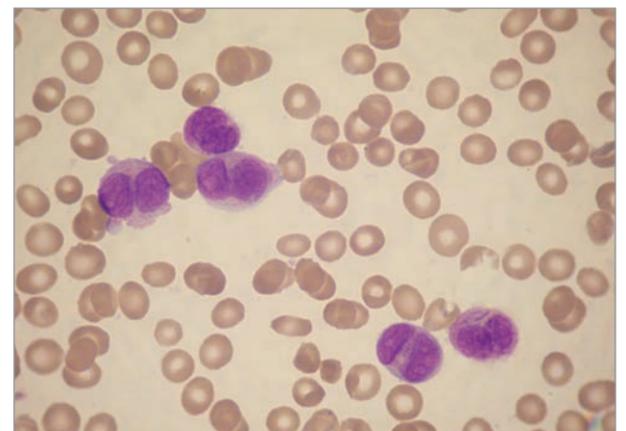


Рис. 3. Острый промиелоцитарный лейкоз, $t(15;17)(q22;q12)$, гипогранулярный вариант

Продолжение на стр. 38.

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., В.А. Надгорная, к.б.н.,
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Современная диагностика острых миелоидных лейкозов

Продолжение. Начало на стр. 37.

антигена CD13. Во многих случаях обнаруживается экспрессия антигена CD117, которая иногда бывает слабо выраженной. Реакция при выявлении гранулоцитарных дифференцировочных маркеров CD15 и CD65 отрицательная или слабая. Как правило, обнаруживается экспрессия антигена CD64. При микрогранулярном варианте ОПМЛ или наличии bcr3 транскрипта слитного гена PML-RARA частой является экспрессия антигенов CD34 и CD2 как минимум в одной из фракций патологических клеток. Приблизительно в 20% случаев ОПМЛ отмечается связанная с неблагоприятным прогнозом экспрессия антигена CD56. При использовании иммуноцитохимических методов и антител к продукту гена PML выявляется характерная мелкогранулярная окраска ядер промиелоцитов (ядрышки остаются неокрашенными) в отличие от пятноподобной, наблюдающейся в нормальных промиелоцитах или в бластах при других формах ОМЛ.

Данные цитогенетического и молекулярно-генетического анализа

При ОПМЛ установлено, что ген α -рецептора ретиноевой кислоты (RARA) на 17q12 соединяется с геном ядерного регуляторного фактора на 15q22 (геном промиелоцитарного лейкоза – PML), что приводит к образованию слитного гена PML-RARA. Описаны редкие случаи ОПМЛ без классической t(15;17)(q22;q12), выявляемой при рутинном цитогенетическом исследовании, но со сложными вариантами транслокаций между хромосомами 15 и 17 с дополнительной хромосомой или с субмикроскопическим включением RARA в PML, ведущей к экспрессии транскрипта PML-RARA. Эти случаи рассматриваются как имеющие маскированные t(15;17)(q22;q12). При морфологическом анализе не установлены различия между t(15;17)(q22;q12)-позитивной группой больных и PML-RARA-положительными пациентами без t(15;17)(q22;q12).

Почти у 40% больных ОПМЛ выявляются вторичные цитогенетические аномалии: трисомия по 8 хромосоме (10–15%), мутации FLT3 (34–45%), включая тандемную дупликацию гена (FLT3-ITD) и поражение второго домена тирозинкиназы (FLT3-TKD). Наиболее частыми являются мутации FLT3-ITD, сочетающиеся с высоким уровнем лейкоцитов в периферической крови, микрогранулярными морфологическими признаками субстратных клеток и точкой разрыва bcr3 гена PML.

Прогноз

Прогноз более благоприятный, чем при ОМЛ с другими рекуррентными цитогенетическими аномалиями. Экспрессия антигена CD56 на поверхностных мембранах лейкоэмических клеток ассоциируется с менее благоприятным прогнозом. Прогностическое значение мутаций FLT3-ITD при ОПМЛ остается невыясненным.

Вариант транслокации RARA при остром лейкозе

В части случаев острого лейкоза, напоминающего по цитоморфологическим признакам ОПМЛ, обнаруживается вариант транслокаций с участием гена RARA. При этом партнерами

при образовании слитного гена могут быть ZBTB16 (ранее был известен как ген PLZF) на 11q23; ген NUMA1 у 11q13; ген нуклеофосмина (NPM1) на 5q35 и ген STAT5B на 17q11.2. Ранее некоторые из указанных острых лейкозов с вариантами транслокаций описывались как имеющие морфологию ОПМЛ. Однако подгруппа с t(11;17)(q23;q12); ZBTB16-RARA имеет некоторые морфологические отличия, в частности преобладают клетки с правильной формой ядра, большим количеством гранул, отсутствием палочек Ауэра, увеличенным числом лейкоцитов, схожих с таковыми при аномалии Пельгера, и интенсивной окраской при выявлении активности МПО. Изначально при ОПМЛ, ассоциированном с t(15;17)(q22;q12), отмечается преобладание популяции гипергранулярных промиелоцитов и незначительное количество гипогранулярных промиелоцитов, не выявляются палочки Ауэра. Некоторые варианты ОПМЛ, включая t(11;17)(q23;q12) с ZBTB16-RARA и случаи со слитным геном STAT5B-RARA, резистентны к лечению ATRA, тогда как большие ОПМЛ с t(15;17)(q22;q12) реагируют на подобную терапию.

При обнаружении подобных транслокаций у больных должен устанавливаться диагноз ОМЛ с указанием варианта транслокации RARA.

ОМЛ с t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL

Синоним заболевания – ОМЛ с аномалиями 11q23.

ОМЛ с t(9;11)(p22;q23) встречается в любом возрасте, чаще у детей. Эта форма заболевания составляет 9–12% ОМЛ у детей и 2% всех острых лейкозов миелоидного происхождения у взрослых.

Предполагаемый нормальный аналог лейкоэмических клеток – гемопоэтическая стволовая клетка с мультилинейным потенциалом (рис. 4).

Клиническими проявлениями могут быть синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, наличие экстрамедуллярных опухолей (миелоидных/моноцитодных), сарком, инфльтрация десен, кожи и других тканей.

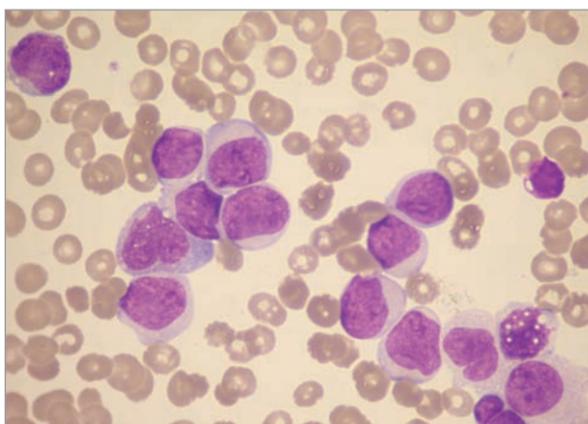


Рис. 4. Острый монобластный лейкоз с t(9;11)(p22;q23). Картина крови

Морфология и цитохимия

Существует тесная связь острых моноцитарных и миеломоноцитарных лейкозов и t(9;11)(p22;q23), хотя иногда t(9;11) определяется в бластных клетках при ОМЛ с и без признаков созревания. В периферической крови и костном мозге, как правило, преобладают монобласты и промиелоциты. Монобласты представлены крупными клетками с обширной умеренно или интенсивно базофильной цитоплазмой, в которой могут выявляться редкие азурофильные гранулы или вакуоли. Ядра клеток округлой формы с нежной структурой хроматина содержат

одно или два четко выявляемых ядрышка. Ядра промиелоцитов не столь правильной формы. Цитоплазма их менее базофильна, иногда вакуолизована, содержит наряду с мелкими и более крупные азурофильные гранулы. При цитохимическом выявлении активности МПО реакция в монобластах может быть отрицательной или слабо положительной. Маркерным цитохимическим признаком монобластов и промиелоцитов является высокая активность α -НЭ и КНЭ. Активность ХАЭ и щелочной фосфатазы в клетках моноцитарно-макрофагального ряда не выявляется. При PAS-реакции в цитоплазме монобластов и промиелоцитов отмечается слабая диффузная окраска или отложение конечных продуктов в виде мелких гранул (рис. 4).

Иммунофенотип

Лейкемические клетки при ОМЛ с t(9;11)(p22;q23) у детей характеризуются выраженной экспрессией антигенов CD33, CD65, CD4 и HLA-DR и слабой реакцией при иммуноцитохимическом выявлении антигенов CD13, CD34 и CD14. У взрослых больных ОМЛ в большинстве случаев при наличии аномалии 11q23 на поверхностных мембранах экспрессируются дифференцировочные антигены клеток моноцитарного ряда – CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36, а в цитоплазме клеток выявляется лизоцим. В то же время экспрессия таких антигенов, как CD34, CD117 и CD56, является вариабельной.

Данные цитогенетического и молекулярно-генетического анализа

MLL (HRX), являющийся человеческим гомологом гена Drosophila trithorax, участвует в образовании слитного гена при транслокациях с вовлечением 11q23. Продукт гена MLL – гистоновая метилтрансфераза, входящая в сложный ансамбль белков, регулирующих транскрипцию генов при ремоделировании хроматина. Транслокация t(9;11)(p22;q23) с вовлечением MLLT3 (AF9) является достаточно частой, позволяющей выделить конкретную нозологическую форму ОМЛ. К числу наиболее частых вторичных цитогенетических аномалий при ОМЛ с t(9;11)(p22;q23) относится трисомия по 8 хромосоме.

Прогноз

Прогноз при ОМЛ с t(9;11)(p22;q23) благоприятнее, чем у больных с ОМЛ с другими транслокациями 11q23.

Варианты транслокаций MLL при острых лейкозах

В настоящее время описано свыше 80 различных транслокаций с участием гена MLL при острых лейкозах у взрослых и детей. При этом охарактеризовано более 50 генов-партнеров.

Наиболее частыми являются транслокации с участием MLLT2 (AF4) при остром лимфобластном лейкозе и, как указывалось выше, MLLT3 (AF9) при ОМЛ. В других транслокациях, приводящих к развитию ОМЛ, участвуют гены MLLT1 (ENL), MLLT10 (AF10), MLLT4 (AF6). Почти треть транслокаций MLL при ОМЛ не выявляется при обычном кариотипическом анализе, для их идентификации требуется использование метода FISH или проведение других молекулярно-генетических исследований. Острые миелоидные лейкозы при наличии этих слитных генов представлены клетками, имеющими цитоморфологические и иммунофенотипические признаки миелобластов и монобластов.

ОМЛ с t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

ОМЛ с t(6;9)(p23;q34) составляет 0,7–1,8% всех случаев заболевания острыми миелоидными лейкозами. Диагностируется как у детей, так и у взрослых (средний возраст заболевших – 13 и 35 лет соответственно).

Предполагаемый нормальный аналог трансформированных клеток – гемопоэтическая стволовая клетка с мультилинейным потенциалом.

Первые клинические проявления – анемия и тромбоцитопения, иногда панцитопения. У взрослых пациентов в начальном периоде заболевания общее количество лейкоцитов в периферической крови ниже, чем при других формах ОМЛ.

Морфология и цитохимия

Содержание бластных клеток в костном мозге варьирует и в ряде случаев может быть ниже 20%. Бластные клетки, определяющиеся в периферической крови и костном мозге, могут иметь такие же цитоморфологические и цитохимические признаки, как и лейкоэмические клетки, определяемые при любой форме ОМЛ, выделяемой в соответствии с ФАБ-классификацией (за исключением ОПМЛ и острого мегакариобластного лейкоза). Однако наиболее часто они совпадают с клетками, выявляющимися при ОМЛ или остром миеломоноцитарном лейкозе. Почти в 30% случаев в кровяных клетках выявляются палочки Ауэра. В бластах определяется положительная реакция при выявлении активности МПО, также они окрашиваются суданом черным. Реакция на α -НЭ, а также КФ может быть положительной или отрицательной. Почти у 50% больных ОМЛ с t(6;9)(p23;q34) содержание базофилов в костном мозге и периферической крови превышает 2%, что является нехарактерным для других форм ОМЛ. В большинстве случаев обнаруживаются признаки дисплазии клеток гранулоцитарного и эритробластического ряда. У некоторых больных в крови и костном мозге выявляются кольцевые сидеробласты. Признаки нарушения процесса образования мегакариоцитов определяются значительно реже.

Иммунофенотип

В бластах отмечается экспрессия антигенов, выявляющихся на клетках миелоидного происхождения, – МПО, CD13, CD33, CD38 и HLA-DR. В большинстве случаев положительной является реакция при определении антигенов CD117, CD34 и CD15. В части случаев на бластах экспрессируется ассоциированный с клетками моноцитарного ряда антиген CD64. Примерно в 50% случаев в ядрах лейкоэмических клеток определяется TdT.

Данные цитогенетического и молекулярно-генетического анализа

Транслокация t(6;9)(p23;q34) приводит к слиянию гена DEK на 6 хромосоме с геном NUP214 (CAN) на 9 хромосоме. Продуктируемый слитным геном белок нуклеопорин действует как аберрантный фактор транскрипции и, связываясь с растворимыми транспортными факторами, влияет на транспорт молекул в ядре. В большинстве случаев t(6;9) является единственной клональной аномалией кариотипа. Однако у некоторых больных эта транслокация сочетается со сложными изменениями кариотипа. У детей, больных ОМЛ с t(6;9)(p23;q34), в 69% случаев, а у взрослых – в 78% дополнительно выявляются мутации FLT3-ITD.

Прогноз

Прогноз при ОМЛ с транслокацией t(6;9)(p23;q34) у взрослых и у детей неблагоприятный.