

## ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.155.392.9-036.11-076.5

Илларионова О.И.<sup>1</sup>, Горчакова М.В.<sup>2</sup>, Русанова Е.Б.<sup>2</sup>, Прохорова Ю.А.<sup>2</sup>, Салогуб Г.Н.<sup>5</sup>, Осипова Е.Ю.<sup>1</sup>, Плясунова С.А.<sup>1</sup>, Зуева Е.Е.<sup>3,4</sup>

## КОНСПЕКТ КЛИНИЧЕСКОЙ ЦИТОМЕТРИИ: ОСТРЫЙ МЕГАКАРИОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ

<sup>1</sup>ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, 117997, г. Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики ОЛД, 197022, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>3</sup>ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Научно-методический центр по молекулярной медицине МЗРФ, 197022, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>4</sup>Ariel University, Faculty of Natural Sciences, Molecular Biology Dep., 40700, Ariel, Israel; <sup>5</sup>ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, кафедра факультетской терапии, 197022, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

*Острый мегакариобластный лейкоз представляет собой достаточно редкую форму патологии даже в практике специализированных онкогематологических отделений. На основании анализа данных цитометрии 2363 больных, наблюдавшихся в ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева и ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с 2007 по 2014 г., диагноз острого мегакариобластного лейкоза установлен 24 пациентам различных возрастных категорий, включая 16 детей (11 мальчиков и 5 девочек) и 8 взрослых (соотношение М:Ж 1:1). Трисомия по хромосоме 21 выявлена только у 4 пациентов раннего возраста (из 13 детей младше 3 лет).*

*В статье описаны особенности пробоподготовки и интерпретации данных многоцветной проточной цитометрии с учетом опыта отечественных и зарубежных коллег.*

**Ключевые слова:** проточная цитометрия; иммунофенотипирование; острый лейкоз; мегакариобластный лейкоз; мегакариобласты; лабораторная диагностика.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (7): 42–49.

Illarionova O.I.<sup>1</sup>, Gorchakova M.V.<sup>2</sup>, Rusanova E.B.<sup>2</sup>, Prokhorova Yu.A.<sup>2</sup>, Salogub G.N.<sup>5</sup>, Osipova E.Yu.<sup>1</sup>, Plyasunova S.A.<sup>1</sup>, Zueva E.E.<sup>3,4</sup>

THE SYNOPSIS OF CLINICAL CYTOMETRY: ACUTE MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA

<sup>1</sup>The Dmitrii Rogachev Federal research clinical center of children hematology, oncology and immunology of Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia; <sup>2</sup>The academician I.P. Pavlov First St. Petersburg state medical university, laboratory of clinical immunology and molecular diagnostic, 197022 St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>The academician I.P. Pavlov First St. Petersburg state medical university, the research methodical center of molecular medicine, 197022 St. Petersburg, Russia; <sup>4</sup>The Ariel University, Faculty of natural sciences, molecular biology dep., 40700 Ariel, Israel; <sup>5</sup>The academician I.P. Pavlov First St. Petersburg state medical university, chair of faculty therapy, 197022 St. Petersburg, Russia

*The acute megakaryoblastic leukemia is a rather rare form of pathology even in practice of specialized oncological hematological departments. The data of cytometry analysis of 2363 patients monitored from 2007 to 2014 carried out in The Dmitrii Rogachev Federal research clinical center of children hematology, oncology and immunology and The academician I.P. Pavlov First St. Petersburg state medical university was used to diagnose acute megakaryoblastic leukemia. The corresponding diagnosis was established in 24 patients of various age categories, including 16 children (11 boys and 5 girls) and 8 adults (ratio male/female 1:1). The trisomy on chromosome 21 was revealed only in 4 children out of 13 of early age (younger than 3 years). The article describes characteristics of samples taking preparation and interpretation of data of multicolor with regard to experience of national and foreign colleges.*

**Key words:** flow cytometry; immune phenotyping; acute leukemia; megakaryoblastic leukemia; megakaryoblast; laboratory diagnostic

**Citation:** Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (7): 42–49. (in Russ.)

**Введение.** Острый мегакариобластный лейкоз (ОМЛ – М-7 по ФАВ классификации) – достаточно редкая патология, которая составляет не более 0,5% всех острых нелимфобластных лейкозов (ОНЛЛ), в том числе не более 1–10% ОМЛ взрослых, 3–10% ОМЛ детского возраста и 20% ОМЛ новорожденных [10, 11], при этом частота развития М-7 у детей с синдромом Дауна в 500 раз превышает заболеваемость детей без данной патологии [14, 20, 28]. ОМЛ М-7 представляет собой заболевание высокого уровня злокачественности,

диагностический код которого согласно международной классификации – ICD-O 9910/3.

Клиническая картина неспецифична по отношению к другим острым лейкозам, характеризуется выраженной гепато- и спленомегалией, анемией, тромбоцитопенией умеренным увеличением количества лейкоцитов в периферической крови (ПК), часто ассоциируется с цитопенией и признаками дисплазии. У детей возможны поражения костей и брюшной полости. Прогноз неблагоприятный [1].

Морфология заболевания достаточно характерна, но также неспецифична [21]. Диагноз может быть установлен, если в костном мозге выявлено не менее 20% бластов и среди них не менее половины (50%) обладают признаками мегакариоцитарного направления дифференцировки. В дебюте заболе-

Для корреспонденции: Илларионова Ольга Ивановна,  
e-mail: olga.illarionoff@gmail.com

For correspondence: Illarionova O.I., olga.illarionoff@gmail.com

вания характерно низкое содержание бластов. В связи с тем что мегакариобластный лейкоз часто сопровождается миелофиброзом, получение качественного аспирата может быть затруднено вплоть до «сухого» мазка и необходимости использования периферической крови как основного биологического материала для диагностики. При низком уровне дифференцировки мегакариобласты похожи на миелобласты или лимфобласты, бласты с «лимфоидной» морфологией и отшнуровкой цитоплазмы; при более дифференцированных формах наблюдаются мегакариобласты среднего (12–18 мкм) и крупного размера с примесью менее дифференцированных бластных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Ядра мегакариобластов округлые, слегка неправильной формы или с вдавлениями с нежной сеткой хроматина, с одним-тремя ядрышками.

Характерно равномерное распределение хроматина и гиперхромия ядер; цитоплазма клеток базофильная, часто образует выпячивания или псевдоподии; тельца Ауэра отсутствуют. В исследуемом материале могут быть выявлены диспластические микромегакариоциты, ядра недольчатого строения с плотной структурой хроматина. Диспластические изменения в клетках гранулоцитарного и эритроидного ростка наблюдаются редко.

При М-7 образец биологического материала может не содержать опухолевые клетки [23, 24] при паратрабекулярном расположении лейкозных бластов и при наличии конгломератов, которые не вошли в образец, направленный на исследование.

Цитохимическая оценка бластов при М-7 достаточно типична [2, 11, 12]: миелопероксидаза, хлорацетатэстераза и липиды отсутствуют. В большинстве случаев выявляют диффузную или крупногранулярную реакцию на кислую фосфатазу,  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразу, кислую неспецифическую эстеразу и PAS.

Специфические генетические аномалии отсутствуют [3, 13]. Сопровождающая М-7 *de novo* мультилинейная дисплазия характеризуется множественными неспецифическими хромосомными поломками, в том числе -7/7q- и -5/5q- [27]. У взрослых выявляют 3q21q26, -5/del (5q), -7/del (7q), inv (12) (p10) и другие структурные нарушения. У детей выявляют нормальный кариотип, t (1;22) (p13;q13), либо множественные поломки [17]. Выявление у маленького пациента транслокации t (1;22) (p13;q13) (RMB15–MKL1) подтверждает диагноз М-7 детского возраста. Данную форму выявляют преимущественно у девочек младенческого возраста (в первые 6 мес жизни) и у детей до 3 лет [16]. Химерный ген *RBM15–MKL1* оказывает модулирующее влияние на организацию хроматина, NOx-индуцированную дифференцировку и внеклеточные сигнальные пути. Значительно реже выявляется мегакариобластный вариант бластного криза при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) [4].

Иммунофенотипирование позволяет быстро и точно установить мегакариоцитарное направление дифференцировки бластов, провести дифференциальную диагностику с такими патологиями, как острый лимфобластный лейкоз, другие формы миелобластных лейкозов [9], метастазы в костный мозг мелкоклеточных злокачественных опухолей [10, 15].

Цитометрическая оценка биологического материала, направленного на исследование при подозрении на острый лейкоз, в обязательном порядке включает оценку дот-плота SSC/CD45, где расположение основных популяций клеток достаточно стабильно (рис. 1, а). Появление значительных кластеров клеток вне мест традиционного расположения лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в подавляющем большинстве случаев свидетельствует о патологии онкогематологического

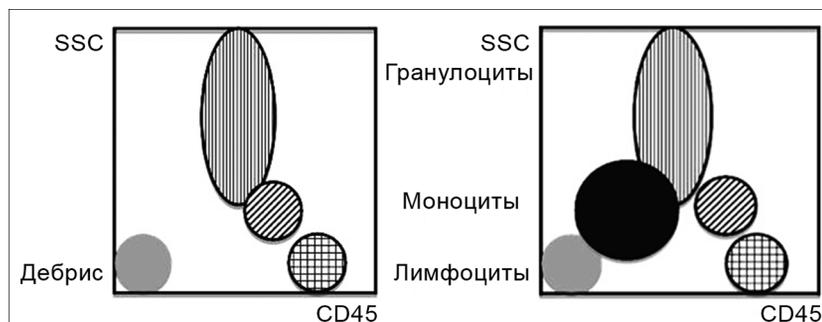


Рис. 1. Схема расположения популяций лимфоцитов (поперечно-вертикальная штриховка), моноцитов (диагональная штриховка) и гранулоцитов (вертикальная штриховка) в пространстве дот-плота SSC/CD45.

По оси абсцисс – уровень экспрессии маркера CD45; по оси ординат – уровень бокового светорассеяния) до применения гейтирования. Дебрис обозначен сплошным серым цветом, бласты – сплошным черным цветом. а – расположение кластеров основных событий на дот-плоте SSC/CD45 в норме. б – бласты в большинстве случаев расположены в свободных, пустых местах пространства анализа.

происхождения, так как образование пустых пространств не характерно для нормальных клеток (см. рис. 1, б) [5].

Предполагаемый нормальный аналог лейкозных мегакариобластов — миелоидная стволовая клетка с признаками преимущественной коммитации в клетки мегакариоцитарного ряда. К линейно-ассоциированным маркерам мегакариоцитарных клеток относят CD31, CD41a, CD61, CD62 и антиген фактора VIII системы свертывания. Молекулы CD41a и CD61 вместе образуют комплекс гликопротеинов gpIIb/gpIIIa [18, 22, 26].

Иммунологически для М-7 характерна экспрессия одного или более тромбоцитарных антигенов: CD41a (гликопротеин IIb), CD61 (гликопротеин IIIa), а также CD42b (гликопротеин Ib), чаще встречающийся на более зрелых клетках. Характерна также экспрессия антигена CD36. В большинстве случаев на бластных клетках выявляют экспрессию миелоидных антигенов CD13 и CD33 (bright), Т-клеточных антигенов CD7, CD4, редко CD2, NK-ассоциированного CD56. На бластных клетках могут присутствовать линейно-неограниченные антигены CD34, HLA-DR, CD38, CD117 (dim). Панлейкоцитарный маркер CD45 и HLA-DR чаще негативны, особенно у детей, либо уровень экспрессии значительно снижен [6, 25, 26].

Оценка экспрессии мегакариоцитарных маркеров требует осторожности, так как при многих патологических состояниях тромбоциты прилипают к более крупным клеткам, моноцитам и нейтрофилам и таким образом создают эффект позитивности по маркерам мегакариоцитарного направления дифференцировки. Предположительно тромбоцитарный сателлитизм развивается за счет взаимодействия молекулы CD62P, экспрессируемой на активированных тромбоцитах, и CD15, экспрессируемой на нейтрофилах. Существует точка зрения, согласно которой использование CD42b дает возможность дифференцировать тромбоциты, адгезированные к ядросодержащим клеткам, и мегакариобласты: CD42b экспрессируется на тромбоцитах и, как правило, отсутствует на мегакариобластах. Следовательно, высокий уровень экспрессии CD41a и CD61 при низком уровне CD42b характерен

Таблица 1

#### Демография больных М-7

Пациенты	Пол	
	мужской	женский
Дети	11	5
Взрослые	4	4

**Иммунофенотипический профиль бластных клеток у пациентов с мегакариобластным лейкозом**

Пол	Возраст	Цитогенетика	Особенности фенотипа	Бластный регион, %	Иммунофенотип
М	1 год 6 мес		CD7	30,0	CD7 <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>
М	2		CD16	20,0	CD13 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> HLDR <sup>+</sup>
М	4			59,0	CD41a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>
М	10		CD4 CD7	84,0	cytCD36 <sup>+</sup> cytCD41a <sup>+</sup> cytCD61 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> CD63 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> очень ранний, мегакариоцитарные маркеры только в цитоплазме
Ж	н/д		CD4 CD7	24,0	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42b <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD62P <sup>+</sup>
Ж	2 года 1 мес		CD7	43,0	CD7 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42b <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Ж	1 год 5 мес	Трисомия 3 хромосомы 47XX	CD56	70,0	CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>
М	1 год 3 мес	t (1; 22) (p13; q13)	CD4 <sup>dim</sup>	20,0	CD4 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>
Ж	1 год 6 мес		CD7	85,0	CD7 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD65 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
М	2 года 9 мес	синдром Дауна, делеция 7 хромосомы 47XY	CD7	24,0	cytCD13 <sup>+</sup> cytCD33 <sup>+</sup> cytCD61 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup> CD36 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD45 <sup>low</sup> CD117 <sup>+</sup> отсутствие CD61на поверхности
М	1 год 9 мес	Гиперплоидный клон, дериват 1 и 17 хромосомы, 53 XY	CD4 CD7	35,0	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>
М	2 года 10 мес	Клон с трисомией 21	CD56	70,0	cytCD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>
М	1 год 3 мес	Клон с t (1;22), 61, XYYY	CD4 <sup>+</sup>	30,0	CD4 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD36 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42a <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup>
М	39 лет		GlyA	67,0	CD15 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD41 <sup>+</sup> CD42b <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup> CD62P <sup>+</sup>
М	50 лет		CD15 CD25	84,8	CD7 <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41 <sup>+</sup> CD42 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> CD61 <sup>+</sup> CD62P <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>
Ж	26 лет			10,1	CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD42b <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup>
Ж	66 лет			34,9	CD15 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41 <sup>+</sup> CD42 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> CD61 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Ж	59 лет			27	CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD45 <sup>neg to dim</sup> CD61 <sup>+</sup> частичная экспрессия CD117 и CD34
Ж	10 лет			56,9	CD42b <sup>+</sup> CD45 <sup>bright</sup> CD61 <sup>+</sup> CD62P <sup>+</sup>
М	2 дня			87	CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD45 <sup>neg to dim</sup> CD56 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup>
М	-			53,3	миелобласты CD45 <sup>dim</sup> CD13 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> мегакариобласты CD41 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> CD61 <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup>
М	73 года		CD7	40,4	CD7 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41a <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> CD61 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Ж	48 лет		CD36	81,4	CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD36 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD41 <sup>+</sup> CD42b <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup>
М	2 года		CD4 <sup>dim</sup> CD7 CD16 CD56 CD36 <sup>+</sup>	78,0	CD4 <sup>dim</sup> CD7 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD36 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>

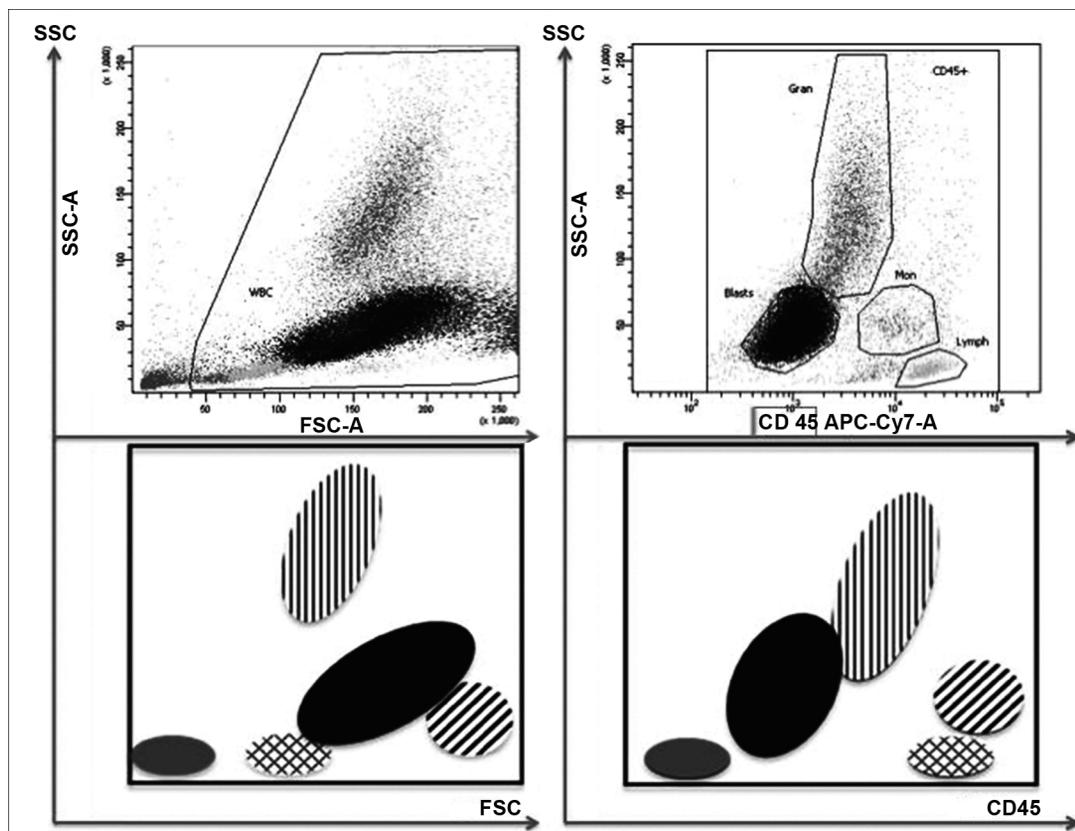


Рис. 2. Дот-плоты и соответствующие схемы расположения основных популяций клеток костного мозга больного С. в пространстве FSC/SSC.

По оси абсцисс – уровень прямого светорассеяния; по оси ординат – уровень бокового светорассеяния) и SSC/CD45 (по оси абсцисс – уровень экспрессии маркера CD45, по оси ординат – уровень бокового светорассеяния). Бласты занимают положение, обычно пустующее при анализе сохранного костного мозга, по размеру примерно соответствуют моноцитам, уровень экспрессии CD45 снижен по сравнению с другими ядросодержащими клетками. Дебрис обозначен сплошным серым цветом, бласты – сплошным черным цветом. Лимфоциты (поперечно-диагональная штриховка), моноциты (диагональная штриховка) и гранулоциты (вертикальная штриховка).

для мегакариобластов, а не для миелобластов с адгезированными тромбоцитами. Цитометрическое выявление CD61 на поверхности лейкоцитов является артефактом сателлитизма тромбоцитов или их фрагментов с ядросодержащими клетками. До 18% случаев М-7 в педиатрической практике позитивны по гликофоруину А. В-клеточные маркеры негативны.

**Материалы и методы.** Основу данной работы составляют: база данных лаборатории ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева, Москва, 2012–2014 гг., согласно которой диагноз острого лейкоза был установлен 731 пациенту детского возраста, и база данных ЛКИИМД ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2007–2014 гг., согласно которой диагноз острого лейкоза был установлен 1623 пациентам различных возрастов. Диагноз М-7 был установлен в 24 случаях.

Биологический материал, направленный для диагностического исследования, в основном представлен костным мозгом: 13 образцов из ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева и 9 образцов из ЛКИИМД ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. При отсутствии возможности получить костный мозг на исследование была направлена периферическая кровь двух пациентов ЛКИИМД ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (пациенты мужского пола, 2 дня и 73 года). В одном из случаев при клиническом подозрении на поражение ЦНС на исследование был направлен ликвор и костный мозг (пациентка женского пола 49 лет).

Пробоподготовка проведена по методу окрашивание – лизис – отмывка в лаборатории ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева и по методу окрашивание-лизис в ЛКИИМД ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Протоочная цитометрия выполнена на цитометре BD FACSCanto II (ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева).

Таблица 3

Анализ иммунофенотипа бластов

Маркер	ОМЛ1 М7	Данные цитометрии		
		Бласты, %		
		пациент 1	пациент 2	пациент 3
Мегакариоцитарные				
CD41a	+	88,0	-	78,6
CD61	+	99,0	51	55,8
CD42a	+	99,0	-	46,3
Линейно-неограниченные				
CD34	+/-	99,0	53	15,4
CD38	+/-	2,5	31	76,9
CD117	-/+	38,0	-	14,0
HLADR	-	-	-	93,3
Другие направления дифференцировки				
CD36	+	-	н/д	н/д
CD4	-/+	-	-	0,1
CD7	-/+	-	30	54,7
CD56	-/+	99,0	-	
Миелоидные				
CD13	+/-	-	-	64,8
CD33	+	99,0	46	68,8
MPO	-	-	-	-

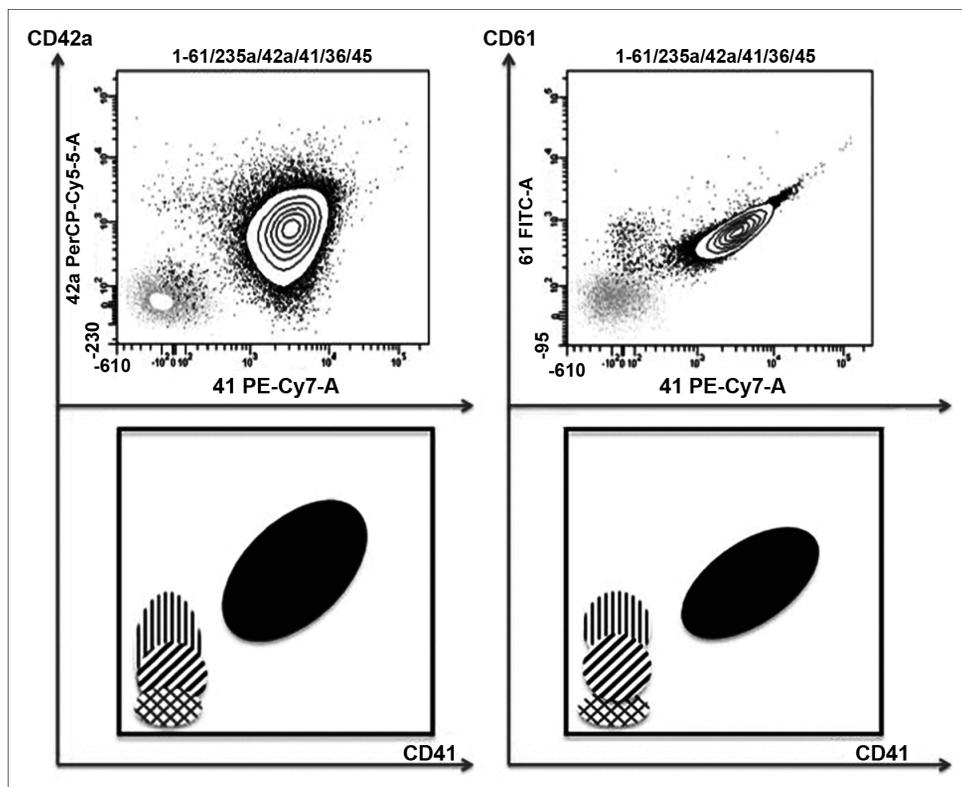


Рис. 3. Дот-плоты и соответствующие схемы экспрессии маркеров мегакариоцитарного направления дифференцировки на бластах костного мозга больного С.

Бласты (черные) гомогенно позитивны по экспрессии маркеров CD41a, CD42a, CD61. Дебрис обозначен сплошным серым цветом, бласты – сплошным черным цветом. Лимфоциты (поперечно-диагональная штриховка), моноциты (диагональная штриховка) и гранулоциты (вертикальная штриховка).

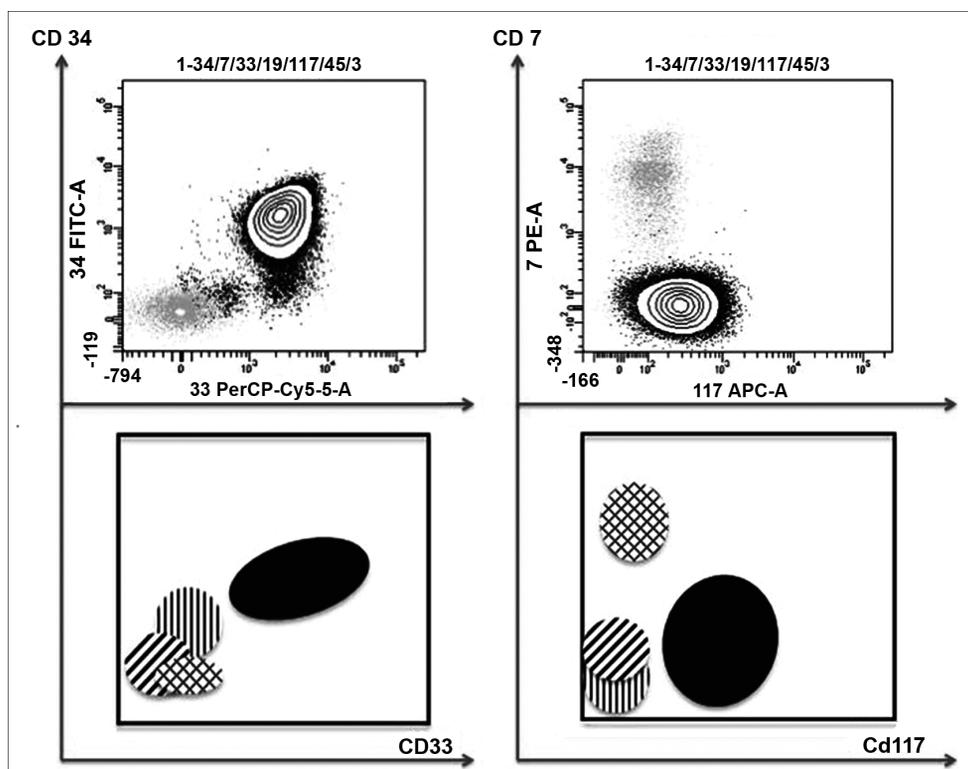


Рис. 4. Дот-плоты и соответствующие схемы экспрессии маркеров миелоидного направления дифференцировки на бластах костного мозга больного С.

Бласты (черные) гомогенно позитивны по экспрессии маркеров CD33, CD34, CD117. Дебрис обозначен сплошным серым цветом, бласты – сплошным черным цветом. Лимфоциты (поперечно-диагональная штриховка), моноциты (диагональная штриховка) и гранулоциты (вертикальная штриховка).

Таблица 4

## Иммунологическая характеристика острых миелобластных лейкозов

Маркер	M 0–2	M2 t (8; 21)	M3 ОПЛ	M4		M5	M6	M7
				бласты	моноциты			
CD2	-	-	+/-	-	-	-	-	-
CD4	-/+	+/-	+/-	+/-	+	+	-	-/+
CD7	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-	+/-	-	-/+
CD10	-	-	-	-	-	-	-	-
CD11b	-	-	-	-	+	+	-	-
CD11c	-/+	-/+	-/+	+/-	+	+	-	-
CD13	+	+	+	+	+	dim	-	-dim
CD14	-	-	-	-/+	+	+/-	-	-
CD15	-/+	+	+	+	+	+	-	-
CD16	-	-	-	-	-	-/+	-	-
CD19	-	+	-	-	-	-	-	-
CD33	+	+	+	+	+	bright	-	bright
CD34	+	+	+	+	-	+/-	+/-	-редко +
CD41	-	-	-	-	-	-	-	+
CD45	+	+	+	+	+	+	-редко +	+редко -
CD56	-/+	+редко -	-	-/+	-/+	+/-	-редко +	-редко +
CD61	-	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+/-	-	-
CD65	-/+	+/-	+/-	+	+	+	-	-
CD79a	-	-	-	-	-	-	-	-
CD117	+	+	+	+	-	-/+	dim	dim
CD133	+/-	+/-	-/+	-/+	-	-	-	-
HLA-DR	+редко-	+редко -	-/+	+	+	+/-	+	-dim
TDT	-/+	-/+	-	-	-	-	-	-
CD235	-	-	-	-	-	-	+	-

чева) и на цитометрах Partec PAS, FC500 Beckman Coulter (ПСПбГМУ). Контроль работы приборов проводили ежедневно с использованием калибровочных частиц для подтверждения качества работы лазера и фотоумножителей с использованием контрольного материала, согласно рекомендациям производителей приборов. Контроль компенсаций выполняли ежемесячно в соответствии с руководством по качеству каждой лаборатории. Обе лаборатории постоянно принимают участие в программах внешней оценки качества проточной цитометрии ФСВОК.

Анализ данных проточной цитометрии выполнен с использованием программного обеспечения FloMax (Partec), CXP (Beckman Coulter), Infinicyte (Cytognos, Salamanca) и BD FACSDiva Software.

**Результаты и обсуждение.** По нашим объединенным данным среди 2363 случаев первичной диагностики лейкозов взрослого и детского возраста выявлено 24 M-7, что составляет 1,02% (табл. 1).

Возраст пациентов от 2 дней до 73 лет. Значительное преобладание мальчиков среди пациентов детского возраста (11:5) особенно выражено в возрастной группе младше 3 лет (10:3). Трисомия по 21-й хромосоме выявлена у 4 пациентов младше 3 лет.

Иммунофенотипическая картина достаточно разнообразна и зачастую представляет определенную трудность для интерпретации (табл. 2).

Клинические примеры анализа данных многоцветной проточной цитометрии.

**Пример 1.** Пациент мужского пола, возраст 2 года 9 мес, биологический материал – костный мозг. По данным проточной цитометрии в костном мозге выявлена популяция, составляющая до 70,0% от всех CD45+ -клеток среднего и крупного размера с промежуточным уровнем гранулярности и низким уровнем экспрессии CD45+. Лимфоциты составляют 4,7% (рис. 2; табл. 3).

Экспрессия маркеров мегакариоцитарного направления дифференцировки выявлена на всех клетках бластной популяции (рис. 3). Миелоидное происхождение подтверждено экспрессией маркера CD33 (рис. 4).

Основные данные цитометрии клеток костного мозга пациента представлены в табл. 3 в сопоставлении с ожидаемой экспрессией различных маркеров дифференцировки при ОМЛ M7. Суммарный фенотип бластов CD33+CD34+CD41a+CD42a+CD61+CD45<sup>neg</sup> to low CD56+CD117+CD123+. Яркая экспрессия миелоассоциированного антигена CD33 и мегакариоцитарных маркеров CD41a, CD42a, CD61 в цитоплазме и на поверхности бластных клеток в сочетании с отсутствием экспрессии МРО позволяет расценить полученные данные как ОМЛ.

**Пример 2.** Пациент мужского пола, возраст 2 дня. Биологический материал – периферическая кровь. По данным проточной цитометрии картина периферической крови резко деформирована и представлена единым кластером клеток 87,0% от всех CD45+ клеток, низкого и промежуточного уровня гранулярности небольшого размера с уровнем экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45<sup>neg to dim</sup>, что полностью соответствует данным морфологии, описывающей тотальный бластоз. Реакция на МПО отрицательная. Сохранные лимфоциты составляют не более 0,6%. Суммарный фенотип бластов CD33+CD34+CD38+CD45<sup>neg to dim</sup> CD56+CD61+ (см. табл.3). Яркая экспрессия миелоассоциированного антигена CD33 и мегакариоцитарного антигена CD61 на поверхности бластных клеток, учитывая результаты цитохимической реакции, позволяет расценить полученные данные как M-7.

Клинический пример расхождения направляющего диагноза и данных проточной цитометрии.

**Пример 3.** Пациент мужского пола, 50 лет. Диагноз направления – эритромиелоз? Биологический материал – костный мозг. По данным проточной цитометрии картина костного мозга резко трансформирована, сохранные лимфоциты составляют 6,4%, моноциты не выявлены, гранулоциты – 8,8%, не менее 84,8% среди лейкоцитов составляют клетки с промежуточным уровнем гранулярности и уровнем экспрессии CD45<sup>dim</sup> (предположительно бласты) (см. табл. 3).

В дополнение к маркерам мегакариоцитарного направления оценен также CD62P: выявлена экспрессия на 67% бластов. Обращает на себя внимание практически полное отсутствие экспрессии гликофорина А, который был выявлен всего на 5% бластов. Особенностью случая является экспрессия маркеров CD7 и CD25 на половине бластов (54,7 и 46,3% соответственно). Маркер CD15 представлен на 20% бластов.

В костном мозге выявлена популяция сохранных лимфоцитов, представленная преимущественно Т-клеточным звеном (соотношение CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток – 1,8), в том числе Т-киллерами CD3<sup>+</sup>CD (16+56)<sup>+</sup>. В-клетки редуцированы: маркер CD19 выявлен на 3% лимфоцитов. Популяция естественных киллеров представлена минимально.

Таким образом, иммунофенотипирование клеток костного мозга не подтверждает диагноз, указанный в направлении. Иммунофенотип выявленной популяции трансформированных клеток с промежуточным уровнем гранулярности и суммарным фенотипом CD45dim+CD7+CD13+CD25+CD33+CD38+CD41+CD42+CD61+HLA-DR<sup>+</sup> более всего соответствует ОМЛ, М-7 варианту.

В результате первичной диагностики 2363 случаев острого лейкоза частота ОМЛ – М-7 составляет 1,02%, что немного выше по сравнению с данными предыдущих исследований. Иммунофенотипический профиль острого мегакариобластного лейкоза в сопоставлении с другими миелобластными лейкозами обладает определенными особенностями (табл. 4) [7, 8, 19].

Оценка экспрессии маркеров CD41 и CD61 требует определенной осторожности, так как при многих патологических состояниях тромбоциты могут быть адгезированы к более крупным клеткам и, таким образом, создавать эффект позитивности по маркерам мегакариоцитарного направления дифференцировки. Поэтому, предполагая оценку мегакариоцитарных маркеров, образец необходимо предварительно отмыть 3–4 раза в объеме 15–20 мл, чтобы избавиться от адгезированных тромбоцитов.

Учитывая вероятность адгезии тромбоцитов к мембране бластных клеток и клиническую значимость диагноза, не рекомендуется оценивать несвежие образцы, образцы, полученные с несоблюдением правил транспортировки и полученные после начала лечения.

Особенности бластов М-7 позволяют установить иммунофенотипический диагноз в течение 1 рабочего дня после получения биологического материала.

#### Благодарность

Выражаем благодарность нашим коллегам из клиник и лабораторий ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, СПб ГБУЗ ДГБ №1, Ленинградской областной клинической больницы и СПб ГБУЗ Городская больница № 15.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Абдулкадыров К.М., ред. *Гематология: Новейший справочник*. М.: Изд-во Эксмо; СПб.: Изд-во Сова; 2004.
- Глузман Д.Ф., ред. *Диагностическая иммуноцитохимия опухолей*. К.: МОРИОН; 2003.
- Зарайский М.И., Зуева Е.Е., Чухловин А.Б., Чердниченко Д.В., Морозова Е.Б., Галкина О.В., и др. Онкопаспорт-скрининг – система стандартизированной молекулярно-генетической оценки состояния генов для выявления групп населения с повышенным риском развития онкологических заболеваний. *Клинико-лабораторный консилум*. 2013; 1 (45): 13–9.
- Зуева Е.Е., Куртова А.В., Русанова Е.Б., Горчакова М.В., Слободнюк К.Ю., Кустова Е.А. и др. *Проточная цитометрия в медицине и биологии. Справочник*. Алматы; 2011.
- Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Слободнюк К.Ю., Горчакова М.В., Куртова А.В. Информативность проточной цитометрии для онкогематологии. Методическое пособие. СПб.; 2011.
- Зуева Е.Е. Проточная цитометрия. Анализ изображения. Получение и представление данных. *Биомедицинский журнал Med-line.ru*. 2004; 4: 465–70.
- Куртова А.В., Русанова Е.Б., Слободнюк К.Ю., Горчакова М.В., Зуева Е.Е. Диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии в соответствии с классификацией ВОЗ 2008г. опухолей гемопоэтических и лимфоидных тканей (часть I – острые миелобластные лейкозы). *Клиническая онкогематология*. 2009; 2 (3): 232–5.
- Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. *Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов*. М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада»; 2005.
- Слободнюк К.Ю., Зуева Е.Е. Иммунобиологические свойства интегрин-ассоциированного протеина CD47. *Иммунология*. 2011; 32 (11): 45–50.
- Хоффбранд В, Петтит Д. *Гематология. Атлас справочник*: Пер. с англ. М.: «Практика»; 2007.
- Athale U.H., Razzouk B.I., Raimondi S.C., Tong X., Behm F.G., Head D.R. et al. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood*. 2001; 97: 3727–32.
- Bene M., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., van't Veer M.B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995; 9 (10): 1783–6.
- Bennett J., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol*. 1976; 33 (4): 451–8.
- Bozkurt S.U., Berrak S.G., Tugtepe H., Canpolat C., Palanduz S., Tecimer T. Acute megakaryoblastic leukemia mimicking small round cell tumor with novel t (1; 5) (q21; p13). *APMIS*. 2008; 116 (2): 163–6.
- Boztug H., Schumich A., Pötschger U., Mühlegger N., Kolenova A., Reinhardt K., Dworzak M. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2013; 84 (6): 370–8.
- Craig F.E., Foon K.A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008; 111: 3941–67.
- Duchayne E., Fenneteau O., Pages M.P., Sainty D., Arnoulet C., Dastugue N. et al. Groupe Français d'Hématologie Cellulaire; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Leuk. Lymphoma*. 2003; 44 (1): 49–58.
- Gorczyca W., Weisberger J., Emmons F.M. Atlas of differential diagnosis in neoplastic hematopathology. *Taylor & Francis*, 2004.
- Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. eds. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC: 2001.
- Kaleem Z., Crawford E., Pathan M.H., Jasper L., Covinsky M.A., Johnson L.R., White G. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2003; 127 (1): 42–8.
- Karandikar N.J., Aquino D.B., McKenna R.W., Kroft S.H. Transient myeloproliferative disorder and acute myeloid leukemia in Down syndrome. An immunophenotypic analysis. *Am. J. Clin. Pathol*. 2001; 116 (2): 204–10.
- Langebrake C., Creutzig U., Reinhardt D. Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. *Klin. Pediatr*. 2005; 217: 126–34.
- Lichtman M.A., Segel G.B. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cells, eosinophilic, and myeloid dendritic cells subtypes. A review. *Blood Cells Mol. Diseases*. 2005; 35: 370–83.
- Niino D., Tsuchiya T., Tomonaga M., Miyazaki Y., Ohshima K. Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived growth factor. *Pathol. Int*. 2013; 63 (3): 141–9.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. eds. *World Health Organization Classification of Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 2008.
- Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114 (5): 937–51.
- Weinberg O., Seetharam M., Ren L., Seo K., Ma L., Merker J.D., et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009; 113 (9): 1906–8.
- Zipursky A., Poon A., Doyle J. Leukemia in Down syndrome. A review. *Pediatr. Hematol. Oncol*. 1992; 9: 139–49.

## REFERENCES

1. Abdulkadyrov K.M., eds. *Hematology: The latest guide. [Gematologiya: Noveyshiyy spravoshnik]*. Moscow: Eksmo; St. Petersburg: Sova; 2004. (in Russian)
2. Gluzman D.F., eds. *Diagnostic immunocytochemistry of tumors. [Dignosticheskaya immunotsitokhimiya opukholey]*. Kiev: MORION; 2003. (in Russian)
3. Zarayskiy M.I., Zueva E.E., Chukhlovina A.B., Cherednichenko D.V., Morozova E.B., Galkina O.V. et al. Onkopasport screening – a system of standardized molecular genetics assessment of genes to identify populations at higher risk of developing cancer [Onkopasport-skrining – sistema standartizirovannoy molekulyarno-geneticheskoy otsenki sostoyaniya genov dlya vyyavleniya grupp naseleniya s povyshennym riskom razvitiya onkologicheskikh zabolevaniy]. *Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2013; 1 (45): 13–9. (in Russian)
4. Zueva E.E., Kurtova A.V., Rusanova E.B., Gorchakova M.V., Slobodnyuk K.Yu., Kustova E.A. et al. *Flow cytometry in medicine and biology [Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii. Spravochnik]*. Almaty; 2011. (in Russian)
5. Zueva E.E., Rusanova E.B., Slobodnyuk K.Yu., Gorchakova M.V., Kurtova A.V. *Informativeness of flow cytometry for Hematology. [Informativnost' protochnoy tsitometrii dlya onkogematologii. Metodicheskoe posobie]*. St. Petersburg; 2011. (in Russian)
6. Zueva E.E. Flow cytometry. Image analysis. Preparation and presentation of data [Protochnaya tsitometriya. Analiz izobrazheniya. Poluchenie i predstavlenie dannykh]. *Medline.ru*. 2004; 4: 465–70. Available at://medline.ru/public/art/tom4/art131.phtml (Accessed 11 November 2004). (in Russian)
7. Kurtova A.V., Rusanova E.B., Slobodnyuk K.Yu., Gorchakova M.V., Zueva E.E. Diagnosis of acute leukemia by flow cytometry according to the 2008 WHO classification. Tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (Part I – acute myelogenous leukemia). [Diagnostika ostroykh leykozov metodom protochnoy tsitometrii v sootvetstvi s klassifikatsiyey VOZ 2008]. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2009; 2 (3): 232–5. (in Russian)
8. Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E., Tupitsyn N.N. *Immunophenotyping in the diagnosis of hematological malignancies. [Immunofenotipirovanie v diagnostike gemoblastozov]*. Moscow–Tver': Triada; 2005. (in Russian)
9. Slobodnyuk K.Yu., Zueva E.E. Immunobiologichesky properties integrin-associated protein CD47. [Immunobiologicheskie svoystva integrin-assotsirovannogo proteina CD47]. *Immunology*. 2011; 32 (11): 45–50. (in Russian)
10. Khoffbrand B., Pettit D. *Hematology. Atlas directory. [Gematologiya. Atlas spravochnik]*. Moscow: Praktika; 2007. (in Russian)
11. Athale U.H., Razzouk B.I., Raimondi S.C., Tong X., Behm F.G., Head D.R. et al. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood*. 2001; 97: 3727–32.
12. Bene M., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., van't Veer M.B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995; 9 (10): 1783–6.
13. Bennett J., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976; 33 (4): 451–8.
14. Bozkurt S.U., Berrak S.G., Tugtepe H., Canpolat C., Palanduz S., Tecimer T. Acute megakaryoblastic leukemia mimicking small round cell tumor with novel t (1; 5) (q21; p13). *APMIS*. 2008; 116 (2): 163–6.
15. Boztug H., Schumich A., Pötschger U., Mühlegger N., Kolenova A., Reinhardt K., Dworzak M. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2013; 84 (6): 370–8.
16. Craig F.E., Foon K.A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008; 111: 3941–67.
17. Duchayne E., Fenneteau O., Pages M.P., Sainty D., Arnoulet C., Dastugue N. et al. Groupe Français d'Hématologie Cellulaire; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Leuk. Lymphoma*. 2003; 44 (1): 49–58.
18. Gorczyca W., Weisberger J., Emmons F.M. Atlas of differential diagnosis in neoplastic hematopathology. *Taylor & Francis*, 2004.
19. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. eds. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC: 2001.
20. Kaleem Z., Crawford E., Pathan M.H., Jasper L., Covinsky M.A., Johnson L.R., White G. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003; 127 (1): 42–8.
21. Karandikar N.J., Aquino D.B., McKenna R.W., Kroft S.H. Transient myeloproliferative disorder and acute myeloid leukemia in Down syndrome. An immunophenotypic analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001; 116 (2): 204–10.
22. Langebrake C., Creutzig U., Reinhardt D. Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. *Klin. Pediatr.* 2005; 217: 126–34.
23. Lichtman M.A., Segel G.B. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cells, eosinophilic, and myeloid dendritic cells subtypes. A review. *Blood Cells Mol. Diseases*. 2005; 35: 370–83.
24. Niino D., Tsuchiya T., Tomonaga M., Miyazaki Y., Ohshima K. Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived growth factor. *Pathol. Int.* 2013; 63 (3): 141–9.
25. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. eds. *World Health Organization Classification of Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 2008.
26. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114 (5): 937–51.
27. Weinberg O., Seetharam M., Ren L., Seo K., Ma L., Merker J.D., et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009; 113 (9): 1906–8.
28. Zipursky A., Poon A., Doyle J. Leukemia in Down syndrome. A review. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 1992; 9: 139–49.

Поступила 05.02.15

Received 05.02.15