

Применение лазерной проточной цитометрии и световой микроскопии для оценки эффекта лечения острого мегакариобластного лейкоза

Аннотация

Рассмотрено применение лазерной проточной цитометрии и световой микроскопии в оценке эффекта лечения острого мегакариобластного лейкоза. Экспериментально исследовался костный мозг у детей – пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в возрасте от трех месяцев до одиннадцати лет. Показаны возможности морфологической и проточно-цитометрической диагностики для определения уровней минимальной остаточной болезни при остром мегакариобластном лейкозе у детей.

Введение

Лазерная проточная цитометрия (flow cytometry) – это метод, позволяющий измерять параметры клеток по мере того, как клетки поочередно пересекают луч лазера. Клетки с различными структурными характеристиками рассеивают лазерный свет в разных направлениях, и таким образом их относительный размер и сложность внутриклеточного строения могут быть измерены. В образцах цельной крови, костного мозга, ликвора и выпотных жидкостей человека лимфоциты, моноциты и гранулоциты различимы друг от друга потому, что рассеивают лазерный свет различным образом. Современные проточные цитометры могут измерять клеточные свойства: экспрессию различных антигенов – кластеров дифференцировки на клеточной поверхности и внутри клеток, содержание нуклеиновых кислот, активность ферментов и многое другое. Для исследования используются флуоресцентные реагенты – антитела, конъюгированные с флуорохромом. Эти реагенты имеют характерные свойства светоизлучения, поэтому могут быть обнаружены отдельно в различных параметрах флуоресценции. Когда флуоресцентно меченые клетки проходят через лазерный луч, флуоресцентные зонды возбуждаются. Обнаружение испускаемого света и регистрация событий происходит со скоростью до 10 000 событий/с.

Проточная цитометрия особенно важна для диагностики некоторых онкологических заболеваний, а именно лимфопролиферативных опухолей и острых лейкозов. Ранее диагностика была ограничена морфологическим и цитохимическим методами исследования, которые остаются рутинными, однако на современном этапе обязательно дополняются иммунологическими, в частности проточной цитометрией.

Морфологическое и цитохимическое исследования крови и аспиратов костного мозга проводятся с использованием световой иммерсионной микроскопии (увеличение $\times 1000$). Препараты окрашиваются по методике Романовского-Гимза для морфологического исследования; для цитохимического исследования выполняется окраска на миелопероксидазу, липиды, PAS-положительное вещество и альфа-нафтилацетатэстеразу с ингибированием фторидом натрия. Подсчет миелограммы производится двумя врачами, по 250 клеток каждым. В приведенных ниже примерах морфоцитохимическая диагностика и последующие морфологические исследования выполнялись с использованием светового микроскопа «Leica ICC50 E».

Острые лейкозы – гетерогенная группа злокачественных заболеваний гемопоэтической ткани, характеризующихся клональной экспансией аномальных предшественников кроветворения (бластных клеток) в костном мозге, крови, печени, селезенке и, реже, – в некроветворных органах.

При диагностике острых лейкозов важно комплексное и быстрое морфоцитохимическое, проточно-цитометрическое, цитогенетическое исследование бластных клеток. По завершении этапов лечения посредством тех же методов проводятся оценка эффекта лечения и определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Проточно-цитометрическая оценка эффекта является рутинной и обязательной при В- и Т-клеточных

острых лимфобластных лейкозах; для острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) критерии определения МОБ окончательно не определены, главным образом ввиду гетерогенности этой группы заболеваний [1], [2].

Проблема определения МОБ при ОМЛ является предметом интенсивных научных исследований. Для успешного статистического анализа материала и получения достоверного результата как в рутинных, так и в исследовательских задачах необходимо подробное внесение диагностических данных в медицинскую информационную систему.

В литературе недостаточно освещено применение метода проточной цитометрии для диагностики минимальной остаточной болезни при остром мегакариобластном лейкозе.

Цель работы: демонстрация возможностей диагностики минимальной остаточной болезни при CD7-позитивном остром мегакариобластном лейкозе методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Оценка МОБ методом проточной цитометрии базируется на количественных (процент клеток, которые экспрессируют тот или иной антиген) и качественных (интенсивность экспрессии антигенов) характеристиках бластных клеток, выявленных при диагностике. Экспрессия на клетках антигенов несвойственных линий дифференцировки называется aberrantной экспрессией, или коэкспрессией. Существуют также другие признаки aberrantного иммунофенотипа: асинхронность экспрессии линейноспецифичных антигенов и отличие в уровнях экспрессии антигенов бластных клеток ОМЛ от нормальных миелоидных предшественников.

Острый мегакариобластный лейкоз (ОмегаЛ) возникает из мегакариоцитарных предшественников. Происхождение и развитие ОмегаЛ являются сложными и разнородными процессами у взрослых и у детей. У взрослых пациентов ОмегаЛ может быть первичным процессом или являться результатом лейкоэмической трансформации предсуществовавшего гематологического заболевания [3]. Ранее диагностика ОмегаЛ была затруднительна из-за того, что его сложно отличить от острого панмиелоэоза с миелофиброзом на основании гистологического исследования костного мозга [4]. Появление диагностических критериев ФАБ-классификации и проточной цитометрии существенно улучшило точность диагностики ОмегаЛ. При проточно-цитометрическом исследовании мегакариобласты экспрессируют антигены CD61, CD42a, CD42b, CD41; может присутствовать aberrantная коэкспрессия лимфоидных маркеров – чаще всего CD7; могут отсутствовать пан-миелоидные маркеры CD33 и CD13, а также отсутствовать некоторые из мегакариоцитарных маркеров, что также будет являться aberrantностью.

В исследование были включены 8 девочек и 9 мальчиков в возрасте от 3 месяцев до 11 лет с впервые выявленным ОмегаЛ. Диагноз устанавливался на основе клинико-гематологических данных, морфоцитохимического и проточно-цитометрического исследований опухолевой популяции (использован прибор «BD FACS Canto II»). Наиболее часто на бластных клетках,

помимо мегакариоцитарных антигенов, были экспрессированы CD9 (83,3 %), CD33 (75 %), CD34 (60 %), CD13 (50 %), CD7 и CD117 (40 %).

При определении МОБ панель антител составлялась индивидуально для каждого случая сообразно первичному иммунофенотипу бластных клеток пациента. Анализировались 2 млн. событий. Путем последовательного гейтирования выделялась малая популяция клеток с иммунологической аберрантностью, соответствующей таковой при первичном исследовании.

Результаты

Пример аберрантности по CD7, позволяющий мониторировать МОБ у больных острым мегакариобластным лейкозом, представлен на рис. 1.

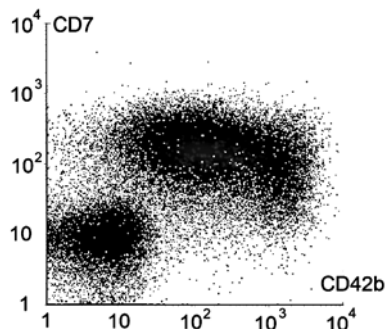


Рис. 1. Коэкспрессия CD7 на бластной популяции при остром мегакариобластном лейкозе (область справа-сверху). По осям отмечена интенсивность экспрессии соответствующих антигенов: CD42b – по оси абсцисс; CD7 – по оси ординат

Пример определения МОБ у пациента И.Д., 7 лет.

При диагностическом исследовании образца костного мозга отмечено: пунктат костного мозга среднечелочный. Бластные клетки составляют 41,2 %, макро- и мезоформы с высоким и умеренным ядерно/цитоплазматическим соотношением, ядрами округлой формы, умеренной базофилией цитоплазмы, встречаются 2-ядерные формы. При цитохимическом исследовании: миелопероксидаза и липиды негативны; PAS-реакция в части бластных клеток гранулярная, в единичных – в виде крупных капель на фоне диффузного окрашивания цитоплазмы; неспецифическая эстераза в части бластов на (+), не гасится фторидом натрия. По морфоцитохимическим данным больше данных за острый миелобластный лейкоз, в первую очередь нужно исключить мегакариобластный вариант ОМЛ (М7).

Данные иммунофенотипирования указывают на мегакариобластный вариант острого лейкоза с коэкспрессией антигена CD7 (табл. 1).

Определение МОБ проведено на 34-й день лечения. По данным морфологического исследования, пунктат костного мозга гипоклеточный. Бластные клетки не найдены, лимфоциты составляют 18,0 %. В гранулоцитарном ростке (63,0 %) отмечается преобладание зрелых форм (53,2 %). Умеренно выражена моноцитарная реакция (13,8 %). Содержание клеток эритроидного ростка снижено до 5,2 %. Мегакариоциты единичные в препарате.

При проточно-цитометрическом определении МОБ в пределах гейта ядросодержащих клеток, исключающего дуплеты, выделены клетки с экспрессией CD42a, их количество составило 0,67 %. Четкого кластера CD7+событий в пределах клеток с экспрессией CD42a не наблюдалось, а в целом коэкспрессия CD7 на этих клетках составила 7,74 %.

Клетки с иммунофенотипом, соответствующим таковому при диагностике лейкоза, а именно CD42a+CD33+CD7+ составили 0,05 %, что соответствует МОБ-негативному статусу (рис. 2).

Пациент И., 3 года, синдром Дауна. По данным морфоцитохимического исследования при диагностике в костном мозге 58,4 % бластных клеток крупного и среднего размера, с вы-

соким и средним ядерно/цитоплазматическим соотношением. Ядра бластов округлые, цитоплазма базофильная; в части клеток – слабая зернистость; часть бластных клеток имеет отростчатую цитоплазму. Миелопероксидаза, липиды, PAS-реакция отрицательны; неспецифическая эстераза позитивна в 76 % бластов, не гасится фторидом натрия.

При иммунофенотипировании использовалась следующая панель антител (табл. 2).

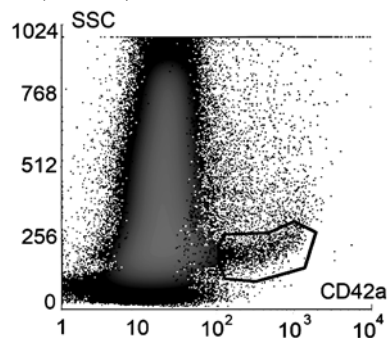


Рис. 2. Область CD42a-позитивных клеток (обведена линией) в пределах ядросодержащих синглетных клеток исследованного образца: по оси абсцисс отмечена интенсивность экспрессии антигенов CD42a; по оси ординат – интенсивность светорассеяния SSC

Иммунофенотип бластных клеток сочетает в себе экспрессию миелоидных антигенов CD117, CD13, CD33, стволовомклеточного антигена CD34 и мегакариоцитарных антигенов CD42a, CD42b, CD61. Таким образом, данные морфоцитохимии и иммунофенотипирования указывают на мегакариобластный вариант острого лейкоза. Особенностью случая является яркая, на одном уровне с Т-клетками, коэкспрессия CD7 на большинстве бластов, а также CD56 – на части бластов.

В день исследования МОБ (перед началом второго курса химиотерапии) пунктат костного мозга характеризовался нормальной клеточностью, определялись 2 % бластных клеток, эритроидный росток был расширен до 33,6 %, гранулоцитарный росток незначительно сужен – 53,2 %. Мегакариоциты присутствовали в достаточном количестве.

По данным проточной цитометрии синглетные клетки, экспрессировавшие мегакариоцитарные антигены CD61a+42a, составили 0,65 %, лишь на 6,45 % из них наблюдалась экспрессия CD7. 39,14 % таких клеток слабо экспрессировали CD45 (рис. 3). Итоговое значение минимальной остаточной болезни составило 0,015 % от мегакариоцитов.

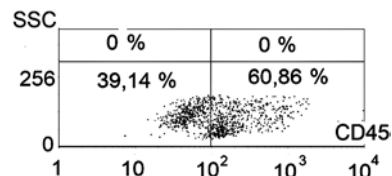


Рис. 3. Характеристика экспрессии CD45 на популяции клеток с экспрессией CD7+CD61a+42a+, слабо экспрессируют 39,14 % клеток: по оси абсцисс отмечена интенсивность экспрессии антигенов CD45; по оси ординат – интенсивность светорассеяния SSC

Представленные примеры наглядно иллюстрируют возможности морфологической и проточно-цитометрической диагностики и определения уровней МОБ при остром мегакариобластном лейкозе у детей.

Заключение

В статье рассмотрено применение медицинских приборов – светового иммерсионного микроскопа «Leica ICC50 E» и проточного цитофлуориметра «BD FACS Canto II» – для диагностики острого мегакариобластного лейкоза. Отмечено, что метод проточной цитометрии является комплексным и в то же время доступным способом оценки глубины достигнутой после этапов лечения ремиссии при условии наличия полно-

ценных данных о первичном иммунофенотипе заболевания. Показаны морфоцитохимическая и проточно-цитометрическая диагностика и возможность определения минимальной остаточной болезни на основе коэкспрессии Т-лимфоидного антигена CD7 при остром мегакариобластном лейкозе у детей.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) по проекту № 18-29-09115.

Список литературы:

1. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition) / Editors: Swerdlow S.H. et al. – IARC: Lyon, 2017.
2. Buldini B., Maurer-Granofsky M., Varotto E., Dworzak M.N. Flow-Cytometric Monitoring of Minimal Residual Disease in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia: Recent Advances and Future Strategies // Front Pediatr. 2019. Vol. 7. P. 412.
3. Hahn A.W., Li B., Prouet P., Giri S., Pathak R., Martin M.G. Acute megakaryocytic leukemia: What have we learned // Blood Reviews. 2016. Vol. 30. № 1. PP. 49-53.
4. Orazi A., O'Malley D., Jiang J. et al. Acute panmyelosis with myelofibrosis: An entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia // Mod. Pathol. 2005. Vol. 18. № 5. PP. 603-614.

Николай Николаевич Тупицын,
д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией,
лаборатория иммунологии гемопоэза,
Тамара Викторовна Шведова,
биолог,
Ирина Николаевна Серебрякова,
канд. мед. наук, врач,
клинико-диагностическая лаборатория,
Александра Дмитриевна Палладина,
врач клинической лабораторной диагностики,
лаборатория иммунологии гемопоэза,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»,
Валентин Григорьевич Никитаев,
д-р техн. наук, профессор, зав. кафедрой,
кафедра компьютерных медицинских систем,
Александр Николаевич Проничев,
канд. техн. наук, доцент,
отделение биотехнологий офиса
образовательных программ,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
ядерный университет «МИФИ»,
г. Москва,
e-mail: vgnikitayev@mephi.ru

Таблица 1

Иммунофенотипирование при диагностике варианта ОМЛ у больного И.Д.

Номер пробы	Флуорохромы							
	PacBlue	PacOrange	FITC	PE	PE-су5	PE-су7	APC	APCH7
ALOT	суCD3 0,1	CD45	MPO 2,5	CD19 1,6	CD34 1,0	–	CD7 70,6	CD3 0,4
1	CD16 1,0	CD45	CD117 1,6	CD13 6,5	CD34	HLA-DR 2,6	CD11b 0,6	CD10 1,7
2	–	CD45	CD35 0,3	CD64 0,2	CD34	HLA-DR	CD300 0,2	CD14 1,3
3	–	CD45	CD36 0,7	CD105 2,0	CD34	HLA-DR	CD33 81,3	CD71 33,1
4	–	CD45	TdT 0,1	CD56 1,2	CD34	HLA-DR	CD7 70,2	CD19 1,8
5	–	CD45	CD15 0,5	NG2 0,2	CD34	HLA-DR	–	CD38 4,4
6	–	CD45	CD42a+61 94,3	CD203 0,3	CD34	HLA-DR	CD123 0,3	CD4 0,9
7	–	CD45	CD41 71,8	CD25 0,6	CD34	HLA-DR	CD42b 3,1	CD9 76,7

Таблица 2

Иммунофенотипирование при диагностике варианта ОМЛ у больного И.

Номер пробы	PacBlue	PacOr	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	HLA-DR 0,1	CD45	CD16 0,1	CD13 71,4	CD34 60,0	–	–	CD10 3,1
2	HLA-DR	CD45	CD35	CD64 5,0	CD3 0,7	–	CD300 1,0	–
3	HLA-DR	CD45	CD36 92,0	CD117 75,0	–	–	–	CD71 90,0
4	HLA-DR	CD45	TdT 0,1	CD56 31,0	–	–	–	–
5	HLA-DR	CD45	CD38 66,9	NG2 0,1	CD5 0,1	CD19 2,9	CD22 1,0	–
6	HLA-DR	CD45	CD7 86,7	CD33 70,7	–	–	–	–
7	суCD3 0,1	CD45	CD7 86,7	–	CD34 60,0	–	CD3 0,1	–
8	HLA-DR	CD45	CD61+CD42 86,7	GlyA 5,5	–	–	CD42b 69,8	CD9 отр