

В. В. Смольникова, Т. В. Лебедева, Н. Ф. Миланович

ЭКСПРЕССИЯ CD10, CD15, CD11B НА МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ (CD34+ CD117+) У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ КАК НЕЗАВИСИМЫЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА БЛАСТНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

*ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии
и гематологии»*

В статье представлены результаты исследования иммунофенотипических и цитогенетических характеристик субпопуляции миелоидных клеток-предшественников (CD34+ CD117+), выявленных при обследовании 116 взрослых пациентов с первичными миелодиспластическими синдромами до начала специфической терапии. Проведен сравнительный анализ времени трансформации в острый миелоидный лейкоз в зависимости от экспрессии иммунофенотипических маркеров на субпопуляции ранних миелоидных клеток-предшественников. Показано, что наиболее значимыми при риске ранней трансформации в острый миелоидный лейкоз являются маркеры асинхронной экспрессии CD10, CD15, CD11b, экспрессия которых не зависит от варианта миелодиспластического синдрома, согласно ВОЗ классификации, и от наличия цитогенетических aberrаций, определяющих неблагоприятный прогноз, таких как аномалии 7 хромосомы и комплексный кариотип. Таким образом, наличие aberrантной экспрессии CD10, CD15, CD11b, на ранних миелоидных клетках-предшественниках является независимым прогностическим маркером высокого риска ранней трансформации в острый миелоидный лейкоз у взрослых пациентов с миелодиспластическими синдромами.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром, миелоидные клетки-предшественники, иммунофенотипические маркеры, факторы прогноза, острый миелоидный лейкоз, цитогенетические aberrации.

V. V. Smolnikova, T. V. Lebedeva, N. F. Milanovich

CD10, CD15, CD11B EXPRESSION ON MYELOID PRECURSOR CELLS (CD34+CD117+) IN PATIENTS WITH PRIMARY MYELODYSPLASTIC SYNDROME AS INDEPENDENT PREDICTIVE OF BLAST TRANSFORMATION

The article presents the results of the evaluation of immunophenotypic and cytogenetic characteristics of a subpopulation of myeloid progenitor cells (CD34+ CD117+) revealed in cohort of 116 adult patients with primary myelodysplastic syndromes prior to the initiation of specific therapy. A comparative analysis of the time of transformation into acute myeloid leukemia depending on the pattern of expression of immunophenotypic markers on a subpopulation of early myeloid progenitor cells was carried out. It is shown that markers of asynchronous expression of CD10, CD15, CD11b are the most significant at risk of transformation into acute myeloid leukemia. Their expression does not depend on the variant of myelodysplastic syndrome, according to the WHO classification, and on the presence of cytogenetic aberrations determining an unfavorable prognosis, such as anomalies of chromosome 7 and complex karyotype.

Thus, the presence of aberrant expression of CD10, CD15, CD11b on early myeloid progenitor cells is an independent prognostic marker of high risk of early transformation into acute myeloid leukemia in adult patients with myelodysplastic syndromes.

Key words: myelodysplastic syndrome, myeloid progenitor cells, immunophenotypic markers, prognostic factors, acute myeloid leukemia, cytogenetic aberrations.

Миелодиспластические синдромы (МДС) – гетерогенная группа клональных заболеваний опухолевой природы, в основе развития которых лежит поражение гемопоэтической стволовой клетки, сопровождающееся неэффективным гемопоэзом, диспластическими изменениями, затрагивающими клетки одной или нескольких линий миелопоэза и повышенным риском развития острых миелоидных лейкозов (ОМЛ). В соответствии с классификацией ВОЗ МДС относятся к категории хронических миелоидных опухолей [2].

С развитием методов диагностики МДС становятся все более значимыми заболеваниями среди гематологических злокачественных новообразований. Частота встречаемости МДС составляет приблизительно 4 случая на 100 000 населения в год и распространенность около 7 на 100 000. Заболеваемость МДС резко возрастает с возрастом, достигая более 50 случаев на 100 000 населения в год в возрастной группе старше 80 лет. Медиана возраста при первичной диагностике составляет 70 лет и только 10% пациентов моложе 50 лет. У четверти пациентов МДС трансформируются в ОМЛ. Медиана выживаемости с момента постановки диагноза составляет примерно 30 месяцев [6].

Формирование прогноза развития заболевания при первичной диагностике имеет большое значение как для пациентов, так и для клиницистов. Это особенно актуально при МДС, которые характеризуются не только разнообразием клинических проявлений, но и большим различием в выживаемости и времени трансформации в ОМЛ. В то время как у некоторых пациентов развитие острого лейкоза происходит вскоре после установления диагноза, другие демонстрируют относительно индолентное протекание заболевания и отсутствие прогрессии в течение нескольких лет при использовании симптоматической и гемокompонентной терапии [9].

В настоящее время не существует универсальной прогностической шкалы, которая включала бы в себя все клинически значимые для МДС параметры, и, в связи с этим, при принятии решения о выборе тактики терапии необходимо оценивать прогноз сразу по нескольким шкалам (IPSS, IPSS-R, WPSS) [4].

Исследование клеток костного мозга методом проточной цитометрии позволяет идентифицировать специфические aberrации как незрелых, так и зрелых клеток различных гемопоэтических линий. Учитывая тот факт, что понятие МДС объеди-

няет разнородную группу миелоидных неоплазий, наличие множественных aberrаций может иметь важное значение для диагностики и стратификации риска МДС. Таким образом, оценка специфических иммунофенотипических aberrаций на бластных клетках при МДС может стать удобным инструментом для прогноза течения заболевания и риска трансформации в ОМЛ.

Цель исследования. Определить иммунофенотипические маркеры на миелоидных клетках-предшественниках (CD34+ CD117+) костного мозга при первичных МДС у взрослых, имеющих прогностическую значимость в оценке риска ранней трансформации в ОМЛ.

Материалы и методы. В исследование включены 116 пациентов, поступившие на обследование и лечение в гематологические отделения ГУ «Минский НПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии» с февраля 2012 г. по декабрь 2017 г. с первичными МДС до начала специфической терапии. Средний возраст пациентов составил 58,9 лет, медиана возраста 59,1 (29:79), среди них 62 – мужчины (53%) (медиана возраста 58,7 (29,2:78,4) и 54 – женщины (47%) (медиана возраста 59,1 (38:79).

Вариант заболевания устанавливали в соответствии с критериями ВОЗ классификации миелоидных неоплазий [12].

Экспрессию антигенов на бластных клетках костного мозга определяли методом восьмицветной проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACSCanto II («Becton Dickinson», США), оснащенный тремя лазерами 488 нм, 633 нм и 405 нм. Анализ данных проводили в рабочей программе FACS Diva (v.6.1.3) и Kaluza (v 1.3). Пробоподготовку проводили в соответствии с инструкциями фирм-производителей.

Для оценки иммунофенотипа бластных клеток в аспирате костного мозга, была использована разработанная нами восьмицветная панель моноклональных антител, включающая следующие моноклональные антитела: CD45, CD34, CD117, CD14, CD19, CD10, HLA-DR, CD33, CD7, CD54, CD56, CD38, CD3, CD5, CD2, CD22, CD9, CD109, CD25, CD64, CD15, CD13, CD16, CD11b, CD71, CD105, CD235a [1].

Ранжировку антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований, изложенных в литературе [8]. Каждый образец костного мозга анализировали в течение 24 ч. после забора биологического материала. Количество проанализированных клеток в каждом образце составляло не

менее тысячи событий в регионе бластных клеток (CD45^{low} CD34+).

Оценку цитогенетических aberrаций проводили стандартным методом G-бэндинга. Кариотип анализировали в соответствии с критериями Международной цитогенетической номенклатуры.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ для медико-биологических исследований STATISTICA (Version 7, StatSoft Inc.). Параметры распределения количественных переменных, которое было отличным от нормального, представлены медианой с 25% и 75% квантилями, статистические параметры нормально распределенных переменных описаны средним значением (M) и стандартным отклонением (SD) или стандартной ошибкой (SE). Для анализа сравнения были применены непараметрические методы: для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной использовали U-тест Mann – Whitney, при сравнении 3 и более переменных – тест Kruskal – Wallis (непараметрический ANOVA). Для оценки взаимосвязи экспрессии иммунофенотипических маркеров на время до трансформации в острый лейкоз использовали кривые, построенные с помощью метода Каплана-Мейера. Значимость различий между кривыми оценивали критерием Кокса-Мантеля.

Результаты и обсуждение. Генетические нарушения, приводящие к образованию опухолевого клона, способствуют формированию aberrантного иммунофенотипа, отличающегося от антигенного профиля нормальных клеток. Учитывая вышеизложенное, нами были выделены несколько типов aberrантной экспрессии маркеров, определяемой на бластных клетках при МДС:

- гомогенная экспрессия – отсутствие типичного для нормального созревания гетерогенного распределения клеток по экспрессии антигенов;
- фенотип с полным отсутствием или низким уровнем экспрессии антигена, характерного для данной стадии дифференцировки;
- избыточная экспрессия антигена;
- асинхронный фенотип, одновременная экспрессия антигенов, относящихся к разным стадиям дифференцировки;
- экспрессия антигенов, не встречающаяся в норме;
- выявление маркеров не миелоидной линейной принадлежности.

С целью определения потенциальных иммунофенотипических предикторов прогноза течения МДС был проведен сравнительный анализ времени трансформации в ОМЛ в зависимости от спектра

экспрессии иммунофенотипических маркеров на субпопуляции CD34+ CD117+ миелоидных клеток предшественников. Полученные данные показали, что наиболее значимыми при риске трансформации в ОМЛ являются маркеры асинхронной экспрессии CD10, CD15, CD11b. При этом, экспрессия данных маркеров не зависела от варианта заболевания (рис. 1).

Как видно из представленных на рис. 1 данных, aberrантная экспрессия маркеров CD10, CD15 и CD11b может определяться при любом варианте МДС, вне зависимости от наличия дисплазии и процента бластных клеток, выявляемых в периферической крови или костном мозге.

К цитогенетическим аномалиям, относящимся к неблагоприятному прогнозу по классификации WPSS относятся аномалии 7 хромосомы и комплексный кариотип. Под комплексным кариотипом подразумевается наличие трех и более хромосомных аномалий [3]. Клиническое течение МДС с аномалией хромосомы 7 характеризуется более короткой средней продолжительностью жизни пациентов, выраженным цитопеническим синдромом, тяжелыми инфекционными осложнениями и высокой частотой развития ОМЛ. Наличие множественных хромосомных аномалий ассоциировано с плохим ответом на проводимую терапию и короткой продолжительностью жизни пациентов с МДС [10]. При сравнительном анализе значимых различий экспрессии маркеров CD10, CD15 и CD11b в зависимости от наличия цитогенетических aberrаций, определяющих неблагоприятный прогноз, не было выявлено (рис. 2).

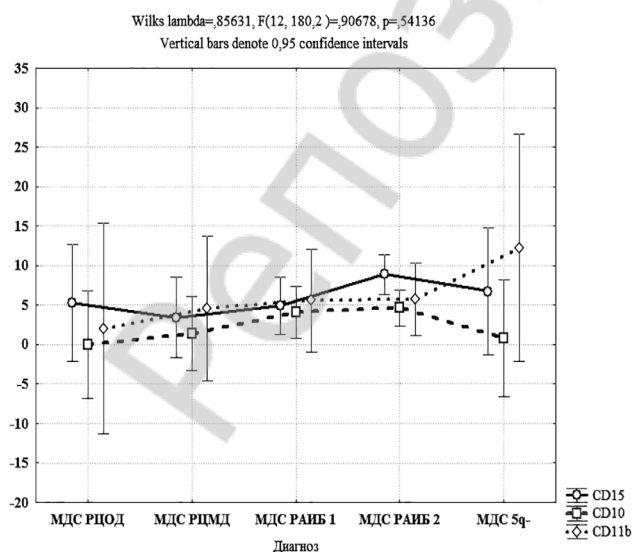


Рис. 1. Уровни экспрессии CD10, CD15, CD11b в группах пациентов с МДС, в зависимости от варианта заболевания

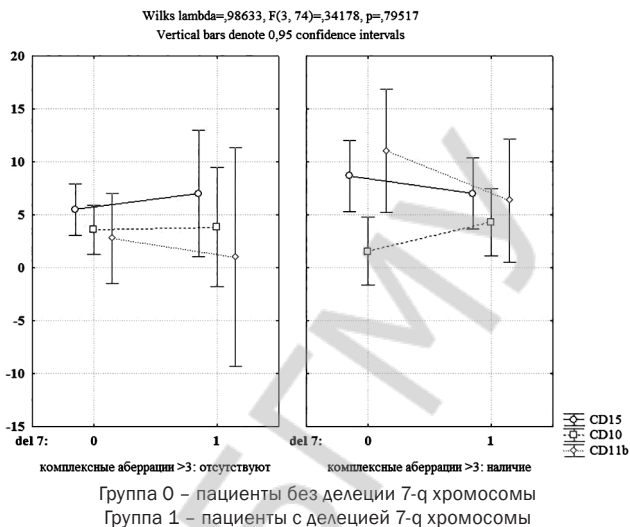


Рис. 2. Уровни экспрессии CD10, CD15, CD11b в группах пациентов с МДС, в зависимости от цитогенетических аномалий, определяющих неблагоприятный прогноз

Антиген CD10, также известный как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA), является распространенной цинк-зависимой металлопротеазой, которая инактивирует ряд сигнальных пептидов. CD10 также экспрессируется на поверхности нейтрофилов на последних стадиях дифференцировки, регулируя их активацию путем разложения воспалительных пептидов [5]. В связи с этим, aberrантная экспрессия CD10 на ранних миелоидных клетках-предшественниках рассматривалась нами как асинхронный иммунофенотип.

Нами было установлено, что наличие aberrантной экспрессии CD10 на ранних миелоидных клетках-предшественниках при МДС значительно повышает риск ($p = 0,0023$) трансформации в ОМЛ (рис. 3).

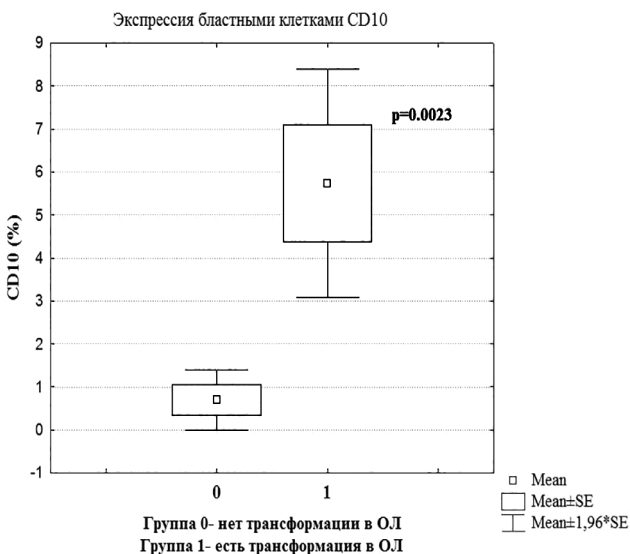


Рис. 3. Уровень экспрессии CD10 в группах пациентов с МДС без трансформации с и трансформацией в ОМЛ

Нами выявлено, что наличие aberrантной экспрессии CD10 $\geq 10\%$ на субпопуляции миелоидных клетках-предшественниках (CD34+ CD117+) вызывает быструю прогрессию заболевания и сокращает сроки трансформации в ОМЛ.

Приведенные кривые Каплана-Мейера у пациентов с МДС в зависимости от наличия aberrантной экспрессии CD10 на миелоидных бластных клетках демонстрируют, что в группе пациентов, у которых выявлено наличие экспрессии CD10 медиана времени до трансформации в ОМЛ составляет 6 месяцев, что значимо ($p = 0,00001$) ниже, чем в группе пациентов, у которых данная aberrация отсутствовала, где значение медианы времени до трансформации в ОМЛ составило 48 месяцев (рис. 4).

Таким образом, наличие aberrантной экспрессии CD10 на ранних миелоидных клетках-предшественниках является независимым прогностическим маркером высокого риска быстрой трансформации в ОМЛ у взрослых пациентов с МДС.

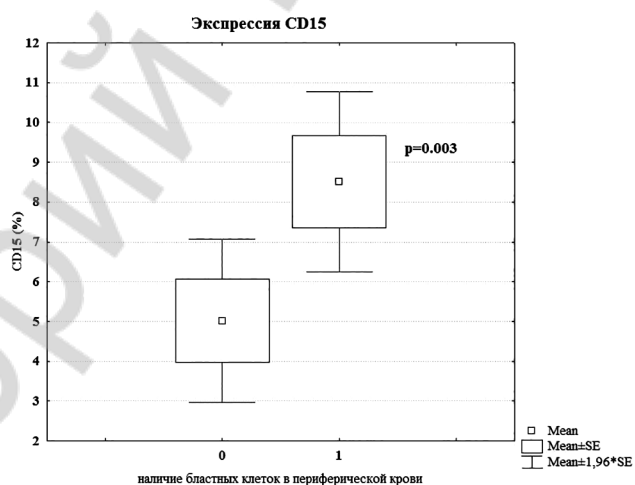
Антиген CD15 (3-фукозил-N-ацетиллактозамин, Lewis X) – иммунологически важная углеводная молекула адгезии, являющаяся компонентом гликопротеинов, гликолипидов и протеогликанов. Гликопротеины, экспрессирующие CD15, присутствуют на поверхности нейтрофилов, опосредуя фагоцитоз и хемотаксис нейтрофилов. Этот поверхностный гликопротеид служит лигандом для селектинов эндотелиальных клеток. Данная молекула является посредником клеточных взаимодействий как в нормальной, так и опухолевой ткани в виде гомофильных LewisX-LewisX реакциях адгезии [7].

При сравнительном анализе экспрессии CD15 на ранних миелоидных клетках-предшественниках с цитоморфологическими показателями периферической крови было выявлено, что наличие бласт-

ных клеток в периферической крови ассоциировано со значимым повышением ($p = 0,003$) экспрессии CD15 (рис. 5), что, по-видимому, связано с функциональными свойствами молекулы CD15.

Нами установлено, что наличие aberrантной экспрессии CD15, как и CD10 на субпопуляции миелоидных клетках-предшественников (CD34+ CD117+) также влияет на быструю прогрессию заболевания и сокращение срока трансформации в ОМЛ.

Представленные на рис. 6 данные показывают, что в группе пациентов с МДС, характеризующейся экспрессией CD15 на бластных клетках медиана времени до трансформации в ОМЛ значимо ниже ($p = 0,017$) и составляет 13 месяцев в сравнении с группой, где экспрессия CD15 на бластных клетках не определялась, и значение медианы времени до трансформации в ОМЛ составляет 36 месяцев.



Группа 0 – отсутствие бластных клеток в периферической крови
Группа 1 – наличие бластных клеток в периферической крови

Рис. 5. Уровень экспрессии антигена CD15 в зависимости от наличия бластных клеток в периферической крови у пациентов с МДС

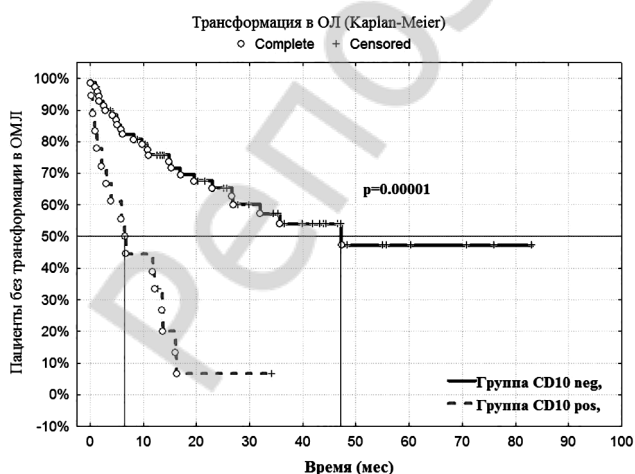


Рис. 4. Время до трансформации в ОМЛ у взрослых пациентов с МДС в зависимости от наличия экспрессии CD 10 на миелоидных бластных клетках

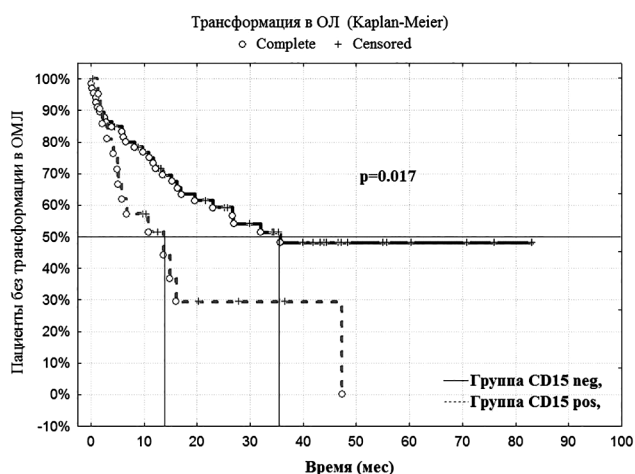


Рис. 6. Время до трансформации в ОМЛ у взрослых пациентов с МДС в зависимости от экспрессии CD15 на миелоидных бластных клетках

Антиген CD11b представляет собой мембранный белок, гликопротеин из надсемейства интегринов. Экспрессия CD11b наблюдается на поверхности большинства лейкоцитов, включая моноциты, нейтрофилы, натуральные киллеры и макрофаги. Функционально CD11b регулирует адгезию и миграцию лейкоцитов для опосредования воспалительного ответа [11].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что наличие aberrантной экспрессии CD11b $\geq 20\%$ на субпопуляции миелоидных клеток-предшественников (CD34+ CD117+) обуславливает быструю прогрессию МДС и сокращает сроки трансформации в ОМЛ.

На рис. 7 показано, что медиана времени до трансформации в ОМЛ у пациентов с наличием экспрессии CD11b на бластных клетках составляет 9 месяцев по сравнению с 36 месяцами в группе с отсутствием экспрессии CD11b ($p = 0,00008$).

Таким образом, полученные в ходе данного исследования данные позволили сделать заключение о том, что наличие aberrантных маркеров асинхронной экспрессии CD10, CD15, CD11b на миелоидных клетках-предшественниках (CD34+CD117+) влияет на скорость прогрессии МДС и значительно сокращает сроки до трансформации в ОМЛ у взрослых пациентов. Учитывая тот факт, что маркеры CD10, CD15, CD11b не зависят от формы МДС и цитогенетических aberrаций, признанных как факторы высокого риска, полученные в ходе исследования данные позволяют рассматривать их как независимые прогностические маркеры высокого риска быстрой трансформации в ОМЛ у взрослых пациентов с МДС.

Учитывая современные возможности иммунофенотипического анализа, оценка маркеров асинхронной экспрессии на бластных клетках у взрос-

лых пациентов с первичными МДС может стать удобным инструментом для прогноза развития заболевания на первичном этапе диагностики с целью определения тактики ведения данной категории пациентов.

Литература

1. Смольникова, В. В. Иммунофенотипическая диагностика первичных миелодиспластических синдромов у взрослых / В. В. Смольникова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2018. – Т. 7, №4. – С. 477–487.
2. Bennett, J. M. Changes in the updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms / J. M. Bennett // Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. – 2016. – № 16. – P. 607–609.
3. Bennett, J. M. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms / J. M. Bennett // Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. – 2016. – Vol. 16, № 11. – P. 607–609.
4. Della Porta, M. G. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM) / M. G. Della Porta, H. Tuechler, L. Malcovati, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Solé [et al.] // Leukemia. – 2015. – Vol. 29, № 7. – P. 1502–1513.
5. Elghetany, M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review / M. T. Elghetany // Blood Cells, Molecules and Diseases. – 2002. – Vol. 28, № 2. – P. 260–274.
6. Germing, U. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment / U. Germing, G. Kobbe, R. Haas, N. Gattermann // Deutsches Ärzteblatt International. – 2013. – Vol. 110, № 46. – P. 783–790.
7. Kerr, M. A. The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion / M. A. Kerr, S. C. Stocks // Histochemistry. – 1992. – Vol. 24, № 11. – P. 811–826.
8. Mahnke, Y. D. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay / Y. D. Mahnke, M. Roederer // Clinics in Laboratory Medicine. – 2007. – Vol. 27. – P. 469–485.
9. Malcovati, L. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes / L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen [et al.] // Journal of Clinical Oncology. 2007. – Vol. 25, № 23. – P. 3503–3510.
10. Sole, F. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes / F. Sole [et al.] // Haematology. – 2005. – Vol. 90. – P. 1168–1178.
11. Solovjov, D. A. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alpha-M-beta-2 / D. A. Solovjov, E. Pluskota, E. F. Plow // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280, № 2. – P. 1336–1345. (12)
12. Vardiman, J. W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / J. W. Vardiman, J. Thiele, D. A. Arber [et al.] // Blood. – 2009. – № 114. – P. 937–951.

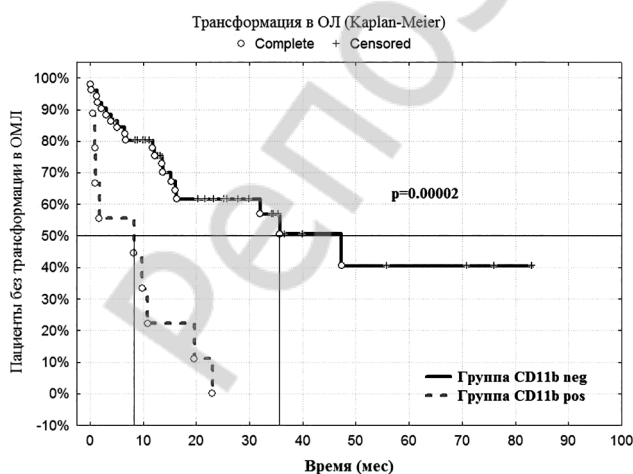


Рис. 7. Время до трансформации в ОМЛ у взрослых пациентов с МДС в зависимости от экспрессии CD11b на миелоидных бластных клетках

Поступила 8.02.2019 г.