

Цаур Г.А.^{1,2,3}, Пермикин Ж.В.^{1,3}, Попов А.М.⁴, Вержбицкая Т.Ю.^{1,2}, Ригер Т.О.^{1,2}, Демина А.С.^{1,2},
Нохрина Е.С.¹, Аракаев О.Р.^{1,2},
Савельев Л.И.^{1,2,3}, Фечина Л.Г.^{1,2}

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ КЛАСТЕРОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ T(12;21)(P13;Q22)/ETV6-RUNX

- ¹ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Российская Федерация;
²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация;
³ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» г. Екатеринбург, Российская Федерация;
²ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», 620149, г. Екатеринбург, Россия;
⁴ФГБУ «Национальный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», г. Москва, Российская Федерация

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз; дети; иммунофенотипирование; проточная цитометрия; транслокация t(12;21)(p13;q22), химерный транскрипт *ETV6-RUNX1*

Для корреспонденции: Цаур Григорий Анатольевич, доктор медицинских наук, Заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Областной детской клинической больницы, 620149, г. Екатеринбург, Россия. e-mail: tsaur@mail.ru.

Резюме: *Целью* данной работы был поиск иммунофенотипических маркеров для прогнозирования наличия транслока-

ции $t(12;21)(p13;q22)$. Транслокация $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ была обнаружена у 72 из 341 (21,1%) обследованных пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. Опухолевые бласты пациентов с транслокацией $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ достоверно чаще имели высокую экспрессию CD10, коэкспрессию миелоидных маркеров CD13, CD33 и CD117, а также гетерогенную экспрессию CD34. Для них также было типично отсутствие экспрессии CD20. Однако показатели диагностической ценности каждого из показателей по отдельности не могли достоверно предсказывать наличие транслокации $t(12;21)(p13;q22)$. На втором этапе мы использовали комбинацию различных показателей. Наиболее высокие показатели диагностической ценности теста были получены при комбинации экспрессии CD117 и CD34. Оценка показателей диагностической ценности теста показала высокие значения специфичности 0,996 (95% ДИ 0,989-1,000), предсказательной ценности положительного результата 0,947 (95% ДИ 0,847-1,000), отношение правдоподобия положительного результата 67,250 (95% ДИ 9,130-495,348), в то время как отношение правдоподобия отрицательного результата было 0,752 (95% ДИ 0,659-0,860). Таким образом, комбинация гетерогенной экспрессии CD34 и экспрессии CD117 является высокоспецифичной для транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$, однако, вследствие того эта комбинация выявляется только у 25,0% пациентов она имеет ограниченное применение для предсказания наличия данной транслокации.

Введение

У детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и повторяющимися генетическими aberrациями наиболее часто встречаемой транслокацией является $t(12;21)(p13;q22)$, ведущая к образованию химерного гена *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*) [1-3]. Данная хромосомная aberrация является криптической, т.е. ее невозможно выявить при стандартном цитогенетическом анализе [4]. Поэтому для ее определения необходимо использовать такие высокотехнологичные методы клинической лабора-

торной диагностики как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) [4-6]. Важность выявления транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ связана с тем, что она ассоциирована с благоприятным прогнозом ОЛЛ у детей [7-11], в том числе при существенном снижении продолжительности терапии [12].

К сожалению, методы FISH и ОТ-ПЦР используются только в ограниченном числе лабораторий в нашей стране. В тоже время, ранее неоднократно предпринимались попытки найти иммунофенотипические маркеры, ассоциированные с наличием данной транслокации. Наиболее убедительные данные получены для иммунофенотипа, соответствующего ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) с экспрессией CD27 и отсутствием/слабой экспрессией CD44, а так же отсутствием экспрессии CD20, CD9, CD66c [13-19]. Однако вышеперечисленные маркеры, кроме CD20, редко используется на этапе первичного иммунофенотипирования при установлении диагноза ОЛ. Поэтому нами была предпринят поиск иммунофенотипических маркеров, применяемых в общепринятой диагностической панели [20] для прогнозирования наличия транслокации $t(12;21)(p13;q22)$.

Цель исследования: оценить возможности иммунофенотипирования для прогнозирования выявления транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ у детей с ВП-ОЛЛ

Материалы и методы

Исследование проводилось в Лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Отдела детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1 г. Екатеринбурга с марта 2008 г. по декабрь 2016 г. В исследуемую группу был включен 341 пациент с диагнозом ВП-ОЛЛ. Медиана возраста составила 3,4 года (диапазон 3 месяца — 17 лет). Диагноз ОЛЛ устанавливался на основании стандартных цитологических критериев [21], дополненных результатами иммунофенотипирования согласно рекомендациям группы EGIL [22, 23]. Вы-

явление транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ проводилось методом двухстадийной («гнездной») ОТ-ПЦР по ранее описанной методике [24]

Для оценки ассоциации между экспрессией отдельных иммунофенотипических маркеров и их комбинаций с выявлением $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ проводился расчет диагностической чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного результата, предсказательной ценности отрицательного результата, диагностической эффективности теста, отношения правдоподобия (ОП) положительного результата теста, ОП отрицательного результата теста. Расчет вышеуказанных диагностических критериев проводили с определением 95% доверительного интервала (ДИ) в программе Microsoft Excel.

Результаты: Транслокация $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ была обнаружена у 72 из 341 обследованных пациентов (21,1%). Опухолевые бласты пациентов с транслокацией $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ достоверно чаще имели высокую экспрессию CD10, гетерогенную экспрессию CD34, а также имели коэкспрессию миелоидных маркеров CD13, CD33, CD117. Для них также было типично отсутствие экспрессии CD20 (табл. 1)

Исходя из этого, для дальнейших расчетов мы разделили пациентов на 4 группы: истинно-позитивными мы считали пациентов с наличием $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ и экспрессией одного из приведенных в таблице 1 антигенов, для которых были получены достоверные различия между группами пациентов с наличием и отсутствием транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$; истинно-негативными – пациентов с отсутствием транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ и исследуемых маркеров; ложно-позитивными — пациентов с отсутствием $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ и наличием экспрессией оцениваемых маркеров; ложно-негативными — пациентов с наличием $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$, но без экспрессии исследуемых маркеров. Расчет показателей диагностической ценности отдельных маркеров приведен в таблице 2. Наиболее высокая чувствительность (0,750) была выявлена для гетерогенной экс-

прессии CD34, наибольшая специфичность (0,981) — для экспрессии CD117. Также CD117 обладал наилучшим показателем диагностической эффективности теста (0,833). Обращает на себя внимание, что для всех индивидуальных маркеров значения предсказательной ценности отрицательных результатов теста были заметно выше, чем положительных. В тоже время, наиболее важные показатели диагностической ценности — ОП положительного и отрицательного тестов — были относительно невысокими. Таким образом, нами не было выявлено отдельных показателей, указывающих на наличие транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$.

На втором этапе диагностического поиска нами было высказано предположение, что иммунофенотип опухолевых blastов, характеризующийся гетерогенной экспрессией CD34 и экспрессией CD117, может прогнозировать наличие транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$. Данная комбинация была выявлена у 18 (25,00%) пациентов с наличием транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ и только у 1 (0,37%) без нее ($p < 0,0001$). Оценка показателей диагностической ценности теста показала высокие значения специфичности 0,996 (95% ДИ 0,989-1,000), предсказательной ценности положительного результата 0,947 (95% ДИ 0,847-1,000), ОП положительного результата 67,250 (95% ДИ 9,130- 495,348) и ОП отрицательного результата 0,752 (95% ДИ 0,659-0,860). То есть, присутствие этой комбинации практически со 100% точностью предсказывало наличие транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$. Однако данная комбинация обладает низкой чувствительностью 0,25 (95% ДИ 0,15-0,35), в связи с чем использование данной комбинации ограничено. Дополнительное включение в диагностическую модель других иммунофенотипических показателей приводило к снижению показателей диагностической ценности теста.

Обсуждение

Имунофенотипирование blastных клеток костного мозга является одним из широко распространенных методов диагностики ОЛЛ. Ранее было показано, что при ВП-ОЛЛ у детей

существуют наиболее типичные иммунофенотипические маркеры, характеризующие группу пациентов с наличием транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$. К их числу чаще всего относят отсутствие экспрессии CD9, CD20, CD66с [13-17], несколько реже — высокую экспрессию CD10 [26], CD40 [27], CD135 [26] и *HLA-DR* [26,27], а также низкую экспрессию CD20 [13] и CD86 [27], коэкспрессию миелоидных антигенов CD13, CD33, CDw65 [5]. Наиболее убедительно выглядят результаты другого исследования, указывающие на то, что экспрессия CD27 и отсутствие/слабая экспрессия CD44 специфичны для транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$. [18, 19].

В тоже время полученные нами результаты не позволили найти как отдельный иммунофенотипический маркер, так и их комбинацию, которые с высокой достоверностью могли бы предсказывать наличие транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$. Ранее для прогнозирования наличия транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ у пациентов с ВП-ОЛЛ чаще всего сравнивали наличие/отсутствие экспрессии отдельных маркеров (чаще) или их комбинаций (реже) между группами с транслокацией $t(12;21)$ и без нее. Оценка показателей диагностической ценности применялась гораздо реже, но даже и в этих случаях чаще всего оценивались только специфичность и чувствительность [13, 14, 26].

Важно подчеркнуть, что отсутствие экспрессии CD66с, которую описывают как один из наиболее специфических изолированных маркеров $t(12;21)$ -позитивного ОЛЛ, также типична для ОЛЛ с перестройками $11q23/MLL$ и ОЛЛ с наличием транслокации $t(1;19)/TCF3-PBX1$ [15]. Вполне возможно, что роль отсутствия экспрессии CD66с при $t(12;21)$ -позитивном ОЛЛ связана с тем, что суммарно доля $t(1;19)$ -позитивного и *MLL*-позитивного ОЛЛ не превышает 3-5%. Также интересно отметить, что экспрессии CD117, которая выявляется у пациентов с Т-ОЛЛ, является высокочувствительным, но низкоспецифичным маркером наличия мутаций в гене *FLT3* [28, 29].

Заключение

Таким образом, пациенты с наличием транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ достоверно чаще имели высокую экспрессию CD10, коэкспрессию CD13, CD33 и CD117, а также гетерогенную экспрессию CD34 и отсутствие CD20 на поверхности опухолевых бластов. Комбинация гетерогенной экспрессии CD34 и экспрессии CD117 является высокоспецифичной для транслокации $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$, однако, вследствие того эта комбинация выявляется только у 25,00% пациентов она имеет ограниченное применение для предсказания наличия данной транслокации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Romana SP., Le Coniat M., Berger R.: $t(12;21)$: A new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994; 9: 186-191
2. Golub T., Barker G., Bohlander S., Hiebert S., Ward D., Bray-Ward P. et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 4917-4921.
3. Romana SP., Mauchauffe M., Le Coniat M., Chumakov I., Le Paslier D., Berger R., Bernard O.A. The $t(12;21)$ of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*. 1995; 85(12): 3662-3670.
4. Shurtleff S., Buijs A., Behm F., Rubnitz J., Raimondi S., Hancock M. et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic $t(12;21)$ is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995; 9(12): 1985-1989.
5. Borkhardt A., Cazzaniga G., Viehmann S., Valsecchi M. G., Ludwig W.D., Burci L. et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood*. 1997; 90 (2): 571-577.
6. Kobayashi H., Rowley J. Identification of cytogenetically undetected 12p13 translocations and associated deletions with

fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995; 12(1): 66-69.

7. Moricke A., Zimmermann M., Reiter A., Henze G., Schrauder A., Gadner H. et al Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010; 24: 265–284.

8. Moorman A., Ensor H., Richards S., Chilton L., Schwab C., Kinsey S. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial *Lancet Oncol*. 2010; 11: 429–438.

9. Loh M., Goldwasser M., Silverman L., Poon W.-M., Vattikuti S., Cardoso A. et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood*. 2006; 107(11): 4508-4513.

10. Forestier E., Heyman M., Andersen M-K., Autio K., Blennow E., Borgström G. et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol*. 2008; 140(6): 665-72.

11. Bhojwani D., Pei D., Sandlund J., Jeha S., Ribeiro R., Rubnitz J. et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*. 2012; 26(2): 265-70.

12. Kato M., Ishimaru S., Seki M., Yoshida K., Shiraishi Y., Chiba K. et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*. 2017; 31: 580-584.

13. Borowitz M., Rubnitz K., Nash M., Pullen D., Camitta B. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study *Leukemia*. 1998; 12: 1764–1770.

14. Gandemer V., Aubry M., Roussel M., Rio A.-G., de Tayrac M., Vallee A et al CD9 expression can be used to predict childhood TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia: Proposal for an accelerated diagnostic flowchart. *Leukemia Research* 2010; 34:

430–437.

15. Kiyokawa N., Iijima K., Tomita O., Miharuru M., Hasegawa D. Kobayashi K. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia *Leukemia Research* 2014; 38: 42– 48.
16. van Dongen J, Lhermitte L., Boettcher S., Almeida J., van der Velden V., Flores-Montero J. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes *Leukemia*. 2012; 26: 1908–1975.
17. Kalina T., Vaskova M., Mejstrikova E., Madzo J., Trka J., Stary J. et al. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer*. 2005 12;5:38.
18. Zaliouva M., Kotrova M., Bresolin S., Stuchly J., Stary J., Hrusak O., et al. ETV6/RUNX1-like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017 56(8):608-616.
19. Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, Martinkova P, Omelka M, Trka J., et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005 19(5):876-8.
20. Dworzak MN., Buldini B., Gaipa G., Ratei R., Hrusak O., Luria D. et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. 2017 10.
21. Bennett J., Catovsky D., Daniel M., Flandrin G., Galton D., Gralnick H., et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol*. 1976; 33(4): 451–458.

22. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995; 9(10): 1783—1786.
23. Béné M.C., Nebe T., Bettelheim P., Buldini B., Bumbea H., Kern W., et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011; 25(4): 567—574.
24. Harbott J., Viehmann S., Borkhardt A., Henze G., Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood*. 1997; 90 (12): 4933-4937.
25. Hrusák O., Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 2002 Jul;16(7):1233-58.
26. De Zen L., Orfao A., Cazzaniga G., Masiero L., Cocito M.-G., Spinelli M. et al Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification *Leukemia*. 2000; 14: 1225–1231.
27. Alessandri A., Reid G. Bader S., Massing B., Sorensen P., Schultz K. ETV6 (TEL)-AML1 pre-B acute lymphoblastic leukaemia cells are associated with a distinct antigen-presenting phenotype. *British Journal of Haematology*. 2002; 116: 266-272.
28. Noronha E.P., Andrade F.G., Zampier C., de Andrade C.F., Terra-Granado E., Pombo-de-Oliveira M.S., et al. Immunophenotyping with CD135 and CD117 predicts the FLT3, IL-7R and TLX3 gene mutations in childhood T-cell acute leukemia. *Blood cells, molecules & diseases*. 2016 57:74-80.
29. Hoehn D., Medeiros L.J., Chen S.S., Tian T., Jorgensen J.L., Ahmed Y. Et al. CD117 expression is a sensitive but nonspecific predictor of FLT3 mutation in T acute lymphoblastic leukemia and T/myeloid acute leukemia. *American journal of clinical pathology*. 2012 137(2):213-9.