

БЛАСТНАЯ ПЛАЗМАЦИТОИДНАЯ ДЕНДРИТОКЛЕТОЧНАЯ ОПУХОЛЬ: ОПЫТ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ В СВЕРДЛОВСКОМ ОБЛАСТНОМ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОМ ЦЕНТРЕ

Виноградов А. В.^{1,3}, Резайкин А. В.², Сазонов С. В.²,
Салахов Д. Р.³, Сергеев А. Г.²

¹Министерство здравоохранения Свердловской области; ²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; ³ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург, Россия

Цель – проанализировать случай диагностики и лечения бластной плазмацитоидной дендритоклеточной опухоли в Свердловском областном онкогематологическом центре. Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больной Д., 32 лет, проходившей лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в январе-марте 2014 г. Диагностику осуществляли, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования бластных клеток. Также было выполнено цитогенетическое исследование и детекция криптических генных мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12-13 гена ASXL1, экзонов 18-26 гена DNMT3A, экзонов 12-15 и 19-21 гена FLT3, экзонов 7-12 и 16-19 гена KIT, экзонов 1-4 гена KRAS, экзонов 9-12 гена NPM1, экзонов 1-4 гена NRAS, экзонов 4-11 гена TP53, экзонов 6-9 гена WT1 методом таргетного секвенирования. Цитологическая характеристика бластных клеток при БПДО: крупные клетки с овальными, почковидными, реже – двудольчатыми ядрами с нежной структурой хроматина, с одной-двумя, реже – несколькими мелкими нуклеолами. Цитоплазма широкая, базофильная, со светлой перинуклеарной зоной, обильно вакуолизирована. Цитохимические реакции на липиды положительны в 10,0 % бластов, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 6,0 % бластных клеток. Основным методом дифференциальной диагностики БПДО в описанном наблюдении являлось выявление бластных клеток в костном мозге. Иммунофенотипически на бластных клетках экспрессировались CD4, CD15, CD33, CD38, CD56, CD64, CD65, HLA-DR, в части клеток – MPO-цит. При кариотипировании бластных клеток определялись одна структурная и две количественные аномалии хромосом (48, XX, add(1)(p36), +6, +8 [8]). Методом таргетного секвенирования при БПДО определялась криптическая инсерция протяженностью 280 нуклеотидов в гене KIT, соответствующая транскрипту интрона 11, и несинонимичная трансверсия с. 215 C>G в антионкогене TP53. Кодирующие последовательности экзонов остальных исследованных генов полностью соответствовали «дикому типу».

Ключевые слова: иммунофенотип, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль, кариотип, прямое автоматическое секвенирование

Введение. Нозологическая форма «бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль» (БПДО) была впервые обособлена в классификации острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) ВОЗ пересмотра 2008 года. В соответствии с ней, она определяется как агрессивная злокачественная опухоль, развивающаяся из предшественников плазмацитоидных дендритных клеток, и характеризуется экспрессией специфических маркеров CD4 и CD56 при отсутствии экспрессии CD34, CD117, миелопероксидазы, CD3цит, TdT и прочих миелоидных, лимфоидных и НК-клеточных маркеров. В качестве основного дифференциально-диагностического маркера выступает CD123 [1,2].

Примечательно, что в классификации гемобластозов ВОЗ пересмотра 2001 года все CD56-позитивные опухоли относились к НК-клеточным гемобластозам и классифицировались в разделе зрелых Т- и НК-клеточных лимфом, что привело к необходимости ретроспективной ревизии диагнозов в этой гетерогенной группе злокачественных опухолей крови, главным образом, на основании иммуногистохимического исследования архивных биоптатов и аутоптатов [3,4].

Цель работы – выполнить анализ случая прижизненной диагностики и лечения бластной плазмацитоидной дендритоклеточной опухоли в Свердловском областном онкогема-

тологическом центре ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» (г. Екатеринбург).

Материалы и методы исследований. Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больной Д., 32 лет, проходившей лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» (г. Екатеринбург) в январе-марте 2014 г. Диагностику БПДО осуществляли, в соответствии с рекомендациями ВОЗ [1, 2], на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования бластных клеток. Также было выполнено цитогенетическое исследование (G-banding) и детекция криптических генных мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12-13 гена ASXL1, экзонов 18-26 гена DNMT3A, экзонов 12-15 и 19-21 гена FLT3, экзонов 7-12 и 16-19 гена KIT, экзонов 1-4 гена KRAS, экзонов 9-12 гена NPM1, экзонов 1-4 гена NRAS, экзонов 4-11 гена TP53, экзонов 6-9 гена WT1 методом прямого автоматического секвенирования. Праймеры, использованные для детекции мутаций в указанных генах, описаны нами ранее [5-8].

Выделение тотальной РНК из лейкозных blasts проводили методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной в миницентрифужной колонке с помощью комплекта реагентов «QIAamp RNA Blood Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции с целью получения кДНК проводили с использованием ревертазы M-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов («РЕВЕРТА-L», ФГБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, РФ). Участки кДНК, соответствующие исследуемым экзонам указанных генов, амплифицировали методом ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [5-8].

Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) по прямой и обратной последовательностям согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили

с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0 [9].

Результаты исследования. В дебюте заболевания отмечалась лихорадка до 39°C, потеря массы тела более, чем на 4 кг, менее, чем за один месяц, геморрагическая сыпь в сочетании с типичными псориатическими элементами на различных участках кожи. В анамнезе – псориаз, хронический вирусный гепатит С минимальной степени активности, по поводу которых пациентка наблюдалась и лечилась у профильных специалистов.

В клиническом анализе крови уровень гемоглобина составил 83 г/л, лейкоцитов – 900/мкл (бластемия – 78,0%), тромбоцитов – 5×10^3 /мкл. В гипоклеточном костном мозге (миелокарициты – 12000/мкл) бластные клетки составляли 78,0%, митозы бластных клеток – 0,8%. Бластная популяция была представлена крупными клетками с овальными, почковидными, реже – двудольчатыми ядрами с нежной структурой хроматина, с одной-двумя, реже – несколькими мелкими нуклеолами. Цитоплазма широкая, синего цвета, со светлой перинуклеарной зоной, обильно вакуолизирована, в некоторых клетках в цитоплазме содержались оксифильные включения. Цитохимические реакции на липиды были положительны в 10,0% blasts, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 6,0% лейкоцитарных клеток. Иммунофенотипически бластные клетки характеризовались экспрессией CD4, CD15, CD33, CD38, CD56, CD64, CD65, HLA-DR (66,0%), кроме того, в 27,0% клеток определялась экспрессия MPO-cyt. На основании данных иммунофенотипирования у больной была диагностирована БПДО. При дополнительном инструментальном обследовании выявлена спленомегалия (площадь селезенки по данным УЗИ – 88 см²), лимфоаденопатия переднешейных лимфоузлов (до 36×7 мм), в биохимическом анализе – повышенный уровень ЛДГ 632 Е/л.

Комплексный aberrантный кариотип лейкозных клеток (по данным G-banding) включал одну структурную и две количественные аномалии хромосом (48, XX, add(1)(p36), +6, +8 [8]). Методом таргетного секвенирования определялась криптическая инсерция в гене KIT протяженностью 280 нуклеотидов, начиная с позиции 1776 кодирующей последовательности, соответствующая транскрипту

интрона 11. По-видимому, она обусловлена нарушением сплайсинга пре-мРНК и проявлялась функционально значимыми изменениями в транслируемом белке с-Kit. Кроме того, в кодирующей последовательности антионкогена TP53 определялась несинонимичная трансверсия с. 215 C>G, являющаяся, по данным литературы, полиморфным аллельным вариантом, не имеющим доказанного патогенетического значения в онкогенезе лейкозов [10]. Кодирующие последовательности экзонов остальных исследованных генов полностью соответствовали «дикому типу».

Лечение БПДО проводилось по схеме FLAG+Ida (флударабин 30 мг/м² в 1-й – 5-й дни, цитарабин 1000 мг/м² с 1-го по 4-й день, идарубицин 8 мг/м² в 1-й и 3-й дни, Г-КСФ 5 мкг/кг в сутки с 0-го по 4-й дни) [11]. В постцитостатическом периоде на +10 сутки диагностирована двусторонняя бактериально-грибковая пневмония и энтеропатия, по поводу которых пациентка получала антибиотики широкого спектра действия, противогрибковые и противовирусные препараты. На +30 сутки после окончания курса полихимиотерапии в аспирате костного мозга при клеточности 30000 миелокариоцитов/мкл определялась остаточная популяция бластных клеток 1,0%, а также 61,0% клеток гранулоцитарного ростка и 31,0% – эритроидного. В клиническом анализе крови сохранялась лейкопения 2300/мкл (сегментоядерные нейтрофилы – 93%), низкий уровень гемоглобина (90 г/л) и тромбоцитов (27×10³/мкл) на фоне заместительной трансфузионной терапии эритроцитарной, тромбоцитарной массой и свежзамороженной плазмой в полном объеме. В эти же сроки зафиксировано появление неврологической симптоматики в виде нижнего вялого пареза, а на +38 сутки – признаки острой церебральной недостаточности. Неоднократно осматривалась неврологами, нейрохирургом, проводилось КТ- и МРТ-исследование головы и позвоночника, диагностирован синдром энцефаломиелополинейропатии сложного генеза с нарушением сознания и развитием вялой тетраплегии. На +47 сутки появилась и стала прогрессировать депрессия гемодинамики, пациентка переведена на вазопрессорную поддержку. На +48 сутки в связи с нарастанием синдрома полиорганной недостаточности переведена в реанимационное отделение на ИВЛ, однако несмотря на проводимые реани-

мационные мероприятия зафиксирована асистолия, клиническая и биологическая смерть пациентки.

По результатам аутопсийного исследования материалов лимфоузлов, селезенки и костного мозга установлено, что инфильтрация тканей лейкоэмическими бластами сохранялась, то есть, опухоль оказалась резистентной к выполненному курсу полихимиотерапии. При этом иммуногистохимического исследования материалов не проводилось. Так же по результатам посмертного исследования подтверждены осложнения со стороны органов нервной и дыхательной системы, диагностированные у пациентки прижизненно.

Обсуждение результатов. Диагностика и лечение относительно редких CD56-позитивных злокачественных опухолей системы крови представляет собой достаточно серьезную проблему в клинической онкогематологии. С одной стороны, дифференциальная диагностика БПДО, НК-клеточного лимфобластного лейкоза и ОМЛ с коэкспрессией CD56 довольно сложна и требует использования довольно широкой панели иммунофенотипических маркеров [1-4]. С другой, эффективных схем химиотерапевтического лечения этих гемобластозов не разработано, а потому методом выбора является аллогенная трансплантация костного мозга в первой ремиссии заболевания, хотя ее эффективность невысока [4,11]. Другой клинической проблемой является возможное сочетание БПДО и ОМЛ, а также описанная в зарубежных литературных источниках лейкоэмизация БПДО в терминальной стадии [4,12].

В описанном наблюдении отмечалось псориазическое поражение кожи, возникшее задолго до манифестации синдрома костномозговой недостаточности, экспрессия специфических маркеров CD4 и CD56, комплексные изменения кариотипа, нетипичные для НК-клеточного лимфобластного лейкоза. Также не выявлена экспрессия на бластных клетках антигенов CD13, CD34 и CD117, характерных для ОМЛ, хотя при цитохимическом исследовании часть клеток дала положительную реакцию на липиды, а при иммунофенотипировании – МРО-сyt и CD33.

Таким образом, резюмируя данные цитологических и цитохимических исследований, иммунофенотипирования популяции лейкоэмических бластов, а также посмертного гистологического анализа тканей селезенки,

лимфоузлов и костного мозга, можно констатировать, что в описанном наблюдении была прижизненно диагностирована БПДО в терминальной стадии трансформации в острый миелоидный лейкоз, оказавшаяся резистентная к химиотерапевтическому лечению по схеме FLAG+Ida.

Интересной находкой, выявленной методом таргетного секвенирования в представленном наблюдении БПДО, являлась функционально значимая криптическая инсерция, соответствующая транскрипту интрона 11, в гене KIT. Указанный участок кодирующей последовательности соответствует области полипептидной цепи белка c-Kit, обеспечивающей ингибирование аутофосфорилирования рецептора, следовательно, необходимо дополнительное клиническое исследование возможности таргетного лечения ингибиторами тирозинкиназ при выявлении подобных мутаций [13].

Выводы:

1. Цитологическая характеристика бластных клеток при БПДО: крупные клетки с овальными, почковидными, реже – двудольчатыми ядрами с нежной структурой хроматина, с одной-двумя, реже – несколькими мелкими нуклеолами. Цитоплазма широкая, базофильная, со светлой перинуклеарной зоной, обильно вакуолизирована. Цитохимические реакции на липиды положительны в 10,0 % бластов, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 6,0 % бластных клеток.

2. Основным методом дифференциальной диагностики БПДО в описанном наблюдении являлось выявление бластных клеток в костном мозге. Иммунофенотипически на бластных клетках экспрессировались CD4, CD15, CD33, CD38, CD56, CD64, CD65, HLA-DR, в части клеток – MPO-цит.

3. При кариотипировании бластных клеток при БПДО (по данным G-banding) определялись одна структурная и две количественные аномалии хромосом (48, XX, add(1)(p36), +6, +8 [8]).

4. Методом таргетного секвенирования при БПДО определяется криптическая инсерция протяженностью 280 нуклеотидов в гене KIT, соответствующая транскрипту интрона 11, и несинонимичная трансверсия с. 215 C>G в антионкогене TP53. Кодирующие последовательности экзонов остальных исследованных генов полностью соответствуют «дикому типу».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Lyon, 2008, 439.
2. Vardiman J. V., Thiele J., Arber D. A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009, 114 (5), 937-952.
3. Редкие гематологические болезни и синдромы. Под ред. М. А. Волковой. Практическая медицина, Москва 2011, 384 с.
4. Френкель М. А., Баранова О. Ю., Антипова А. С., Купрышина Н. А., Тупицын Н. Н. НК-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома (обзор литературы и собственные наблюдения). *Клиническая онкогематология* 2016, 2, 208-217.
5. Виноградов А. В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARE, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах. *Российский онкологический журнал* 2013, 4, 34-35.
6. Виноградов А. В., Резайкин А. В., Изотов Д. В., Сергеев А. Г. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2016, 4, 38-51.
7. Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г. Детекция точечных мутаций в гене DNMT3A при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования. *Бюллетень сибирской медицины* 2015, 1, 18-23.
8. Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г. Детекция точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. *Вестник Башкирского университета* 2014, 3, 845-847.
9. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011, 28 (10), 2731-2739.
10. Edlund K., Larsson O., Ameur A., Bunikis I., Gyllenstein U., Leroy B., Sundström M., Micke P., Bottling J., Soussi T. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, 109, 9551-9556.
11. Программное лечение заболеваний системы крови. Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. Под ред. В. Г. Савченко. Практика, Москва 2012, 1056 с.
12. Rauh M. J., Rahman F., Good D., Silverman J., Brennan M. K., Dimov N., Liesveld J., Ryan D. H., Bu-

- rack W.R., Bennett J.M. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation, lacking cutaneous involvement: case series and literature review, *Leuk Res.* 2012, 36 (1), 81-86.
13. Heldin C.H., Lennartsson J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013,5(8), a009100.

BLASTIC PLAZMATSITOIDS DENDRITOCCELL TUMOUR: EXPERIENCE OF DIAGNOSTICS AND TREATMENT IN THE SVERDLOVSK REGIONAL ONCOHEMATOLOGICAL CENTER

**Vinogradov A. B.^{1,3}, Rezaykin A. B.², Sazonov P. B.²,
Salakhov D. R.³, Sergeev A. G.²**

¹Ministry of Health of Sverdlovsk region; ²FGBOU VO "The Ural state medical university" of the Russian Ministry of Health, ³GBUZ SO "Sverdlovsk regional clinical hospital No. 1", Yekaterinburg, Russia

Aim: to analyze the case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDN) detection and treatment in Sverdlovsk Regional Hematological Centre (Ekaterinburg). Bone marrow and peripheral blood samples obtained from female, aged 32, treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the Jan-Marth 2014. Diagnosis of BPDN verified using cytology, cytochemistry and immunophenotyping. Cytogenetic analysis was realized using G-banding. Detection of mutations in exons 12-13 ASXL1, exons 18-26 DNMT3A, exons 12-15 and 19-21 FLT3, exons 7-12 and 16-19 KIT, exons 1-4 KRAS, exons 9-12 NPM1, exons 1-4 NRAS, exons 4-11 TP53, exons 6-9 WT1 genes was performed using direct sequencing. Cytological characterization of BPDN blast cells: large cells with oval, reniform nuclei with delicate chromatin structure, with one or two, at least – several small nucleoli, with wide basophilic cytoplasm and bright perinuclear area, richly vacuolated. In cytochemistry lipids is positive in 10.0% of blasts, glycogen – 6.0%. The primary method of differential diagnosis of BPDN in case study was the identification of blast cells in the bone marrow. Immunophenotype of blast cells was CD4, CD15, CD33, CD38, CD56, CD64, CD65, HLA-DR(+), MPO-cyt (+/-). Karyotype was 48, XX, add(1)(p36), +6, +8 [8]. In case 2 gene mutations were co-existed in samples: KIT gene insertion and TP53 gene non-synonymous substitution c. 215 C>G. Coding sequence the remaining exons of the investigated genes is fully consistent with "wild type".

Key words: immunophenotyping, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, cytogenetics, direct sequencing

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА АНТИТЕЛОГЕНЕЗ У САМЦОВ И САМОК МЫШЕЙ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Гейн С. В.^{1,2}, Волошина А. А.², Тендрякова С. П.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; ²Пермский научно-исследовательский государственный университет, Пермь, Россия

Установлено, что у как у самок, так и у самцов 6-ч иммобилизационный приводил к выраженному угнетению количества АОК в селезенке. Предварительная блокада опиатных рецепторов приводила к отмене эффекта стресса как у самцов, так и у самок. Однако, у самцов введение одного налоксона никакого влияния на количество АОК не оказывало, в то время как у самок налоксон угнетал образование АОК как по относительным, так и по абсолютным показателям.

Ключевые слова: стресс, опиоидные рецепторы, антителогенез, пол