

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Технические аспекты определения минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии у пациентов с острыми миелоидными лейкозами

Technical Aspects of Minimal Residual Disease Detection by Multicolor Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia Patients

И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, К.А. Никифорова, Е.Н. Паровичникова

IV Galtseva, YuO Davydova, NM Kapranov, KA Nikiforova, EN Parovichnikova

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Определение и мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) — необходимые компоненты программной терапии. Они имеют ключевое значение для выбора лечебной тактики и оценки прогноза фактически при всех заболеваниях системы крови. Для установления МОБ часто используют метод многоцветной проточной цитометрии, который обладает достаточно высокой специфичностью и чувствительностью. Однако определение МОБ у больных острыми миелоидными лейкозами представляется одной из самых непростых задач, стоящих перед специалистом по проточной цитометрии. Анализ цитометрических данных требует экспертного знания иммунофенотипа всех созревающих клеток костного мозга. Кроме того, исследование МОБ при острых миелоидных лейкозах не стандартизовано, а предлагаемые в разных исследованиях подходы значительно отличаются. В настоящей статье отражен собственный опыт анализа МОБ с демонстрацией используемой стратегии гейтирования, описанием иммунофенотипа нормальных неопухолевых гемопоэтических клеток и представлением нескольких примеров оценки МОБ. Приводятся также использованные нами панели моноклональных антител с оценкой их достоинств и недостатков.

Detection and monitoring of minimal residual disease (MRD) are essential components of programmed therapy. They are crucial for the choice of treatment strategy and for prognostic purposes practically in all hematologic diseases. MRD is often detected by multicolor flow cytometry, the method with fairly high specificity and sensitivity. However, to identify MRD in acute myeloid leukemia patients is one of the most challenging tasks flow cytometry specialists are faced with. Cytometric data analysis requires the expert knowledge of immunophenotype of all maturing bone marrow cells. Besides, MRD analysis in acute myeloid leukemia has not been standardized while approaches suggested by different studies vary considerably. The present paper reports the experience of MRD analysis, demonstrates the gating strategy, immunophenotype description of normal non-tumor hematopoietic cells, and presents some examples of MRD assessment. Additionally, panels of monoclonal antibodies are provided, along with an evaluation of their advantages and disadvantages.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, острые миелоидные лейкозы, проточная цитометрия, гейтирование, иммунофенотипирование.

Keywords: minimal residual disease, acute myeloid leukemias, flow cytometry, gating, immunophenotyping.

Получено: 9 июня 2021 г.

Received: June 9, 2021

Принято в печать: 5 сентября 2021 г.

Accepted: September 5, 2021

Для переписки: Юлия Олеговна Давыдова, канд. мед. наук, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: 8(495)612-62-21; e-mail: juliya89mur@yandex.ru

For correspondence: Yuliya Olegovna Davydova, MD, PhD, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: 8(495)612-62-21; e-mail: juliya89mur@yandex.ru

Для цитирования: Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М. и др. Технические аспекты определения минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии у пациентов с острыми миелоидными лейкозами. Клиническая онкогематология. 2021;14(4):503–12.

For citation: Galtseva IV, Davydova YuO, Kapranov NM, et al. Technical Aspects of Minimal Residual Disease Detection by Multicolor Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia Patients. Clinical oncohematology. 2021;14(3):503–12. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-4-503-512

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-4-503-512

ВВЕДЕНИЕ

Наличие остаточной популяции бластных клеток, или минимальной остаточной болезни (МОБ), после проведения химиотерапии считается неблагоприятным прогностическим признаком и связано с высоким риском развития рецидивов. Определение МОБ при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) рекомендуют проводить в контрольных точках на начальных этапах терапии (в период индукции ремиссии) и на постремиссионных этапах [1–3]. При этом в пределах одного протокола больные с быстрым клиренсом резидуальных опухолевых клеток имеют более благоприятный прогноз, чем больные с медленным клиренсом опухолевого клона и высокими значениями МОБ. Исследование МОБ используют для стратификации больных на группы риска, а также корректировки противоопухолевого воздействия, рассмотрения возможности изменения схемы терапии, добавления таргетных препаратов или проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) [4]. У больных острыми лейкозами важное независимое прогностическое значение в отношении результатов аллоТГСК имеет предтрансплантационный МОБ-статус. При выявлении МОБ непосредственно перед аллоТГСК наблюдается крайне высокая частота развития рецидивов [5–9].

Определение МОБ у больных ОМЛ выполняют с помощью многоцветной проточной цитометрии (МПЦ) или методом полимеразной цепной реакции. Поиск МОБ методом МПЦ основан на знании того, какие кластеры дифференцировки (clusters of differentiation, CD) обнаруживают на клетках костного мозга (КМ) разной линейной принадлежности (лимфоидной и миелоидной) и на разных стадиях созревания. Принцип МПЦ заключается в поиске популяций клеток, имеющих такое сочетание экспрессии антигенов дифференцировки, которое не встречается на нормальных клетках КМ. Это сочетание называют лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ) [3].

Существует два подхода к определению МОБ методом МПЦ: поиск клеток с ЛАИФ, аналогичным обнаруженному в дебюте заболевания, и поиск клеток с иммунофенотипом, не встречающимся при нормальном созревании лейкоцитов [10]. Первый подход подразумевает составление набора моноклональных антител на основании данных, полученных в результате поиска ЛАИФ на лейкозных клетках в дебюте заболевания. Такой набор затем используют для мониторинга МОБ на этапе терапии и в последующем. У каждого больного сочетание используемых моноклональных антител может быть индивидуальным. Очевидным недостатком этого метода является то, что при смене иммунофенотипа бластных клеток, выявленного в дебюте заболевания, результат исследования может быть ложноотрицательным [11, 12]. Кроме того, использование индивидуальных панелей для каждого пациента не всегда удобно в рутинной практике.

Второй подход поиска МОБ требует тщательного изучения нормального иммунофенотипа зрелых

клеток и их предшественников и может осуществляться без знания иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания. Во всех контрольных точках применяется одна универсальная и широкая панель моноклональных антител, которая позволяет обнаружить аномальные клетки определенной линейности. В ходе анализа используют двумерные графики — диаграммы, которые позволяют визуально оценить экспрессию двух антигенов одновременно, а с помощью гейтирования (выделения клеток с интересующими характеристиками) можно изучить экспрессию всех антигенов на клетках, выделенных на диаграмме. Если выделенная популяция клеток находится в тех областях диаграммы, в которых нормальные клетки отсутствуют, то дают заключение о наличии резидуальных опухолевых клеток с иммунофенотипом, отличным от нормального. Такой подход называют методом «пустых мест» или методом «отличия от нормального» [11, 12]. Рекомендуется комбинировать оба методических подхода: в дебюте заболевания выполнять поиск ЛАИФ с помощью той же панели антител, по которой в дальнейшем будет проводиться определение МОБ. Знание иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания помогает в определении остаточных опухолевых клеток в период ремиссии [11, 12].

Имунофенотип миелоидных бластных клеток значительно отличается у разных больных, поэтому отработка стандартной системы гейтирования остается серьезной проблемой. Кроме того, популяция бластных клеток даже у одного больного может быть гетерогенной и состоять как из незрелых клеток-предшественниц, так и из клеток с экспрессией зрелых миеломоноцитарных маркеров. Примерами ЛАИФ при ОМЛ могут быть обнаружение лимфоидных маркеров на клетках миелоидного происхождения (например, экспрессия CD7, CD2, CD56, CD19), повышенная экспрессия антигенов (например, CD33, CD34, CD99), сниженная экспрессия антигенов (например, CD38, человеческого лейкоцитарного антигена DR — HLA-DR), асинхронная коэкспрессия ранних и поздних антигенов (например, CD34 и CD11b) [13]. Следует учитывать, что на нормальных гемопоэтических клетках CD34⁺ могут экспрессироваться антигены CD2, CD7 и CD56, но такие клетки в норме определяются в небольшом количестве [14–16]. При мониторинге МОБ полагаться только на обнаружение клеток CD34⁺ с лимфоидными антигенами недопустимо. Необходимо обращать внимание на то, образуют ли кластер эти клетки, как на их поверхности экспрессированы другие маркеры (например, CD45, CD33, CD34, HLA-DR и др.) и насколько экспрессия этих антигенов соотносится с нормальными клетками CD34⁺.

Исследование МОБ у больных ОМЛ методом МПЦ не является стандартизованным. Однако в 2018 г. опубликованы рекомендации Европейской рабочей группы по острым лейкозам относительно анализа МОБ у больных ОМЛ [3]. Согласно этим рекомендациям, панель моноклональных антител должна быть минимум 8-цветной и включать антитела против антигенов CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR. Выделение бластных клеток рекомендуется выполнять по маркерам CD45,

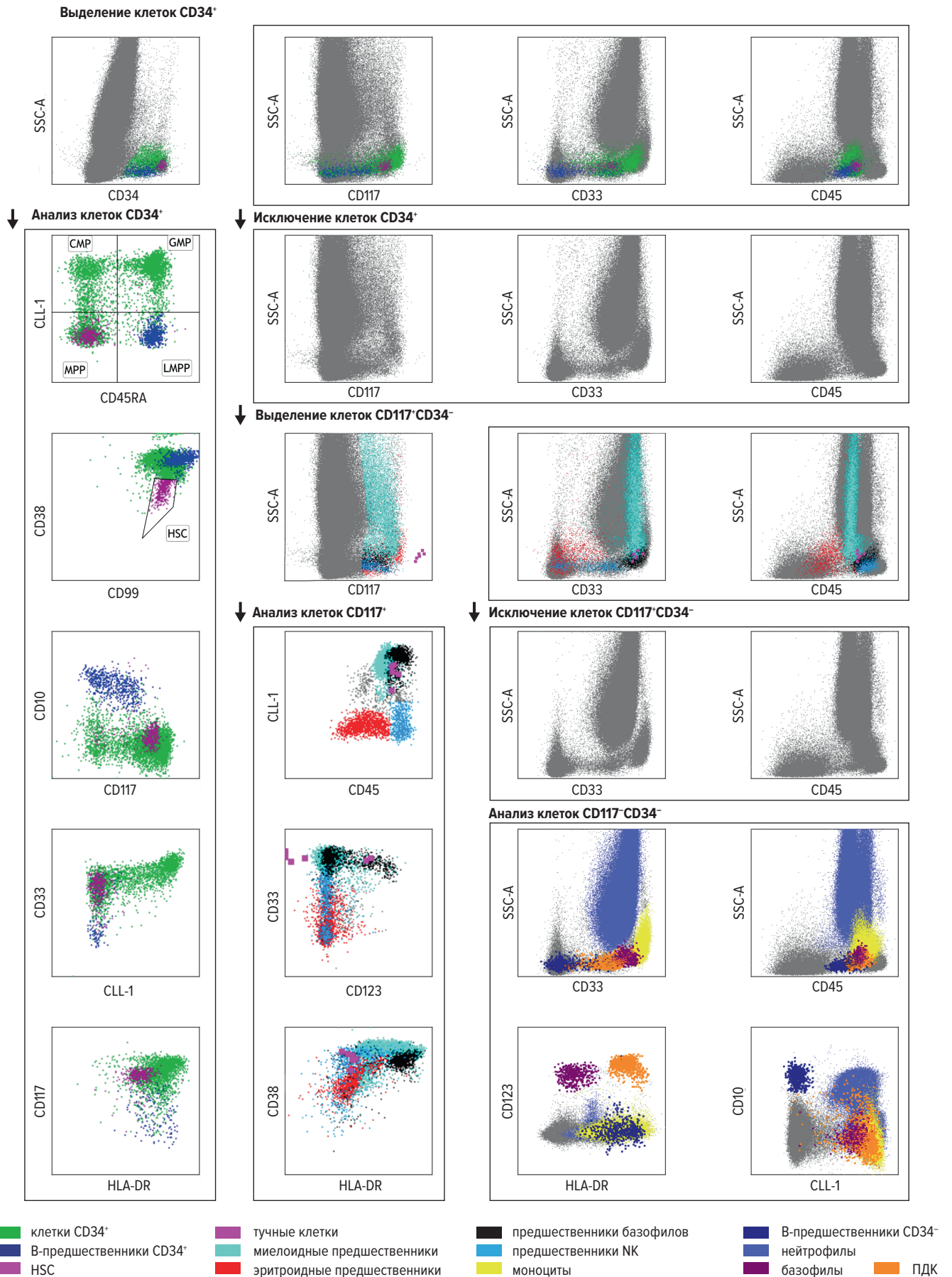


Рис. 1. Цитометрический анализ основных клеточных компонентов костного мозга донора

CMP — общие миелоидные предшественники; GMP — гранулоцитарно-макрофагальные предшественники; HSC — гемопоэтические стволовые клетки; LMPP — лимфоидные мультипотентные предшественники; MPP — мультипотентные предшественники; NK — естественные киллеры; ПДК — плазматоидные дендритные клетки.

Fig. 1. Cytometric analysis of main cellular components of a donor bone marrow

CMP — common myeloid progenitors; GMP — granulocyte-macrophage progenitors; HSC — hematopoietic stem cells; LMPP — lymphoid multipotent progenitors; MPP — multipotent progenitors; NK — natural killers; ПДК — plasmacytoid dendritic cells.

CD34, CD117, CD13, CD33, а также по параметрам прямого и бокового светорассеяния (side scatter, SSC). Полезным может оказаться включение маркеров CD38, CD99, CD123, CD371 (CLL-1 или CLEC12A), CD11a и CD45RA [17]. Дополнительно можно исследовать антигены CD64, CD11b, CD14, CD4, CD16, позволяющие оценить моноцитарную дифференцировку клеток [3].

ГЕЙТИРОВАНИЕ И ИММУНОФЕНОТИП НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ КОСТНОГО МОЗГА

Для анализа МОБ у больных ОМЛ должна использоваться такая комбинация моноклональных антител, которая позволит выделить клетки основных миелоидных ростков гемопоэза и изучить стадии их созревания. Обычно остаточные опухолевые клетки обнаруживают в так называемом бластном регионе — области, ограничивающей часть клеток с низкой экспрессией CD45 и низким показателем SSC. На рис. 1 бластный регион показан в виде красного многоугольника на диаграмме CD45 против SSC. В бластный регион попадают нормальные ранние предшественники CD34⁺, В-клеточные предшественники (гематопоны), промиелоциты, часть миелоцитов и зрелых нейтрофилов, эритроидные предшественники, базофилы, плазмоцитоидные дендритные

клетки (ПДК), промоноциты, тучные клетки и часть лимфоцитов [18]. Для того чтобы дифференцировать все эти клетки и обнаружить среди них популяцию МОБ, мы рекомендуем гейтирование, при котором последовательно изучаются и исключаются уже проанализированные клетки.

На первом этапе мы предлагаем выделить все клетки CD34⁺. Эта популяция в норме небольшая и у взрослых составляет не более 2,0–2,5 % всех клеток КМ, но при этом является довольно гетерогенной. Так, с помощью антигена CD19 и/или CD10 можно определить популяцию нормальных гематопонов CD34⁺, которая на рис. 1 выделена синим цветом. Эта популяция характеризуется наличием экспрессии CD38, HLA-DR, CD45RA, CD99 и отсутствием миелоидных маркеров CD13, CD33, CD117, CLL-1 (рис. 2).

Не-В-клеточные предшественники выделены на рис. 1 и 2 зеленым цветом, и среди них можно определить несколько субпопуляций разной степени зрелости. Так, по маркерам CD45RA, CLL-1 и CD123 можно выделить четыре основные субпопуляции клеток CD34⁺: общие миелоидные предшественники (common myeloid progenitors, CMP), гранулоцитарно-макрофагальные предшественники (granulocyte-macrophage progenitors, GMP), лимфоидные мультипотентные предшественники (lymphoid multipotent progenitors, LMPP) и мультипотентные предшественники (multipotent progenitors, MPP) (см. рис. 1). Среди MPP клетки

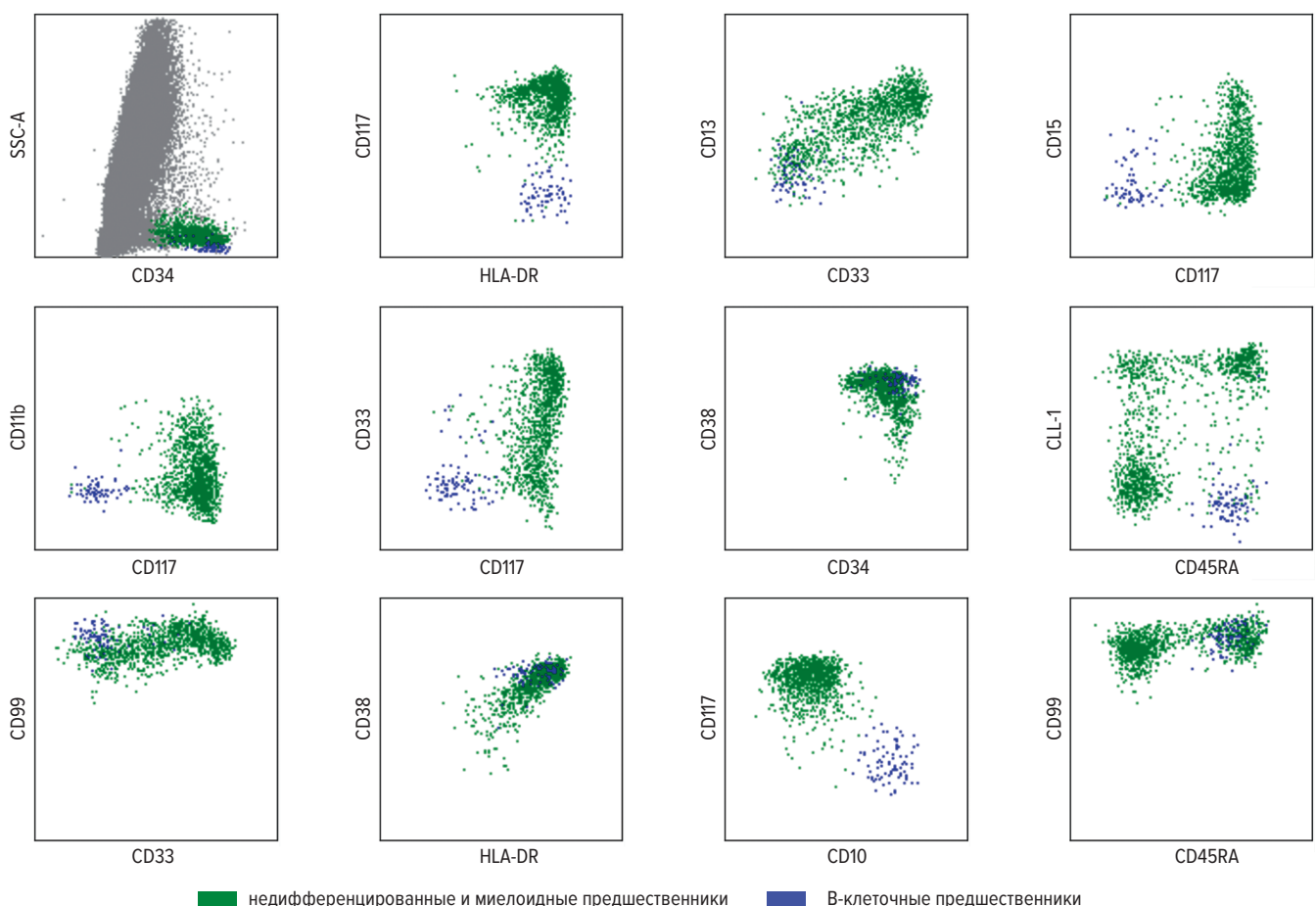


Рис. 2. Цитометрический анализ клеток CD34⁺ костного мозга донора

Fig. 2. Cytometric analysis of a donor bone marrow CD34⁺ cells

с наиболее низкой экспрессией CD38 образуют популяцию истинных гемопоэтических предшественников (hematopoietic stem cells, HSC) [19–22]. Интересно, что HSC имеют более высокую плотность CD45, хотя они самые незрелые из всех стволовых клеток крови CD34⁺ (см. рис. 1). Более зрелые клетки CD34⁺ могут начинать экспрессировать CD15 и даже CD11b (см. рис. 2), при этом они продолжают оставаться CD117-позитивными, плотность экспрессии CD34 в процессе дифференцировки на них снижается, а CD33 — увеличивается.

С помощью специального программного обеспечения для анализа цитометрических данных можно исключить все клетки CD34⁺ после их анализа (см. рис. 1). Из оставшихся клеток мы рекомендуем выделить все клетки CD117⁺. Большую часть из этих клеток составляют миелоидные предшественники (выделены голубым цветом на рис. 1), среди которых можно различить промиелоциты, не экспрессирующие HLA-DR, и предшественники моноцитов HLA-DR⁺. Миелоидные предшественники имеют на поверхности маркеры CD13, CD33, CLL-1, CD38, CD99 и частично могут приобретать CD11b (рис. 3). Другой крупной популяцией клеток CD117⁺ являются эритроидные предшественники (на рис. 1 выделены красным цветом, а на рис. 3 — синим). Эритроидные предшественники не экспрессируют CD13, CD33, CLL-1, и лишь очень небольшая часть из них может быть HLA-DR-слабопозитивной (см. рис. 3). Среди клеток CD117⁺ также можно обнаружить предшественники базофилов, которые частично положительны по CD123, экспрессируют миелоидные маркеры и HLA-DR (на рис. 1 выделены черным цветом). Кроме того, в изучаемом регионе CD117⁺ можно обнаружить клетки со слабой экспрессией CD117 и CD33, отсутствием CD13, CLL-1 и высокой плотностью экспрессии CD45, которые, вероятно, соответствуют предшественникам

естественных киллеров (на рис. 1 обозначены светло-синим цветом), что подтверждается наличием на их поверхности CD7 [23]. По нашему опыту, особенно много таких клеток у больных после аллотГСК, что связано с интенсивной регенерацией естественных киллеров, восстанавливающихся быстрее остальных лимфоцитов. У больных после химиотерапии может обнаруживаться большое количество тучных клеток, которые имеют наиболее высокую плотность экспрессии CD117, высокий показатель SSC, экспрессируют миелоидные маркеры и HLA-DR-негативны. Предшественники тучных клеток имеют низкий показатель SSC, а по экспрессии CD117 — самые яркие. На рис. 1 тучные клетки и их предшественники выделены розовым цветом.

После анализа CD117-позитивных клеток мы рекомендуем исключить эту популяцию и рассмотреть оставшиеся клетки (см. рис. 1). Основную часть из них будут составлять нейтрофилы разной степени зрелости. Они имеют высокий показатель SSC и средний уровень экспрессии CD33, а экспрессия антигенов CD11b, CD16, CD10 и CD45 будет увеличиваться по мере созревания нейтрофилов. Клетки с наибольшей плотностью CD33 образуют популяцию промоноцитов и моноцитов (выделены желтым цветом на рис. 1). По мере созревания на поверхности моноцитов увеличивается плотность экспрессии CD11b, CD14 и уменьшается — HLA-DR. На части этих клеток обнаруживается высокая экспрессия CD16. Минорными популяциями, обнаруживаемыми среди CD117-негативных клеток в бластном регионе, являются базофилы, ПДК и гематогоны. Базофилы и ПДК характеризуются наличием CD123. Отличием ПДК от базофилов является более высокая экспрессия CD123, более низкая экспрессия CD33 и наличие HLA-DR. На рис. 1 базофилы выделены фиолетовым цветом, а ПДК — оранжевым. Гематогоны стадий 2 и 3, т. е. CD34-негативные, обнаруживаются по высокой экспрессии CD10 (см. рис. 1).

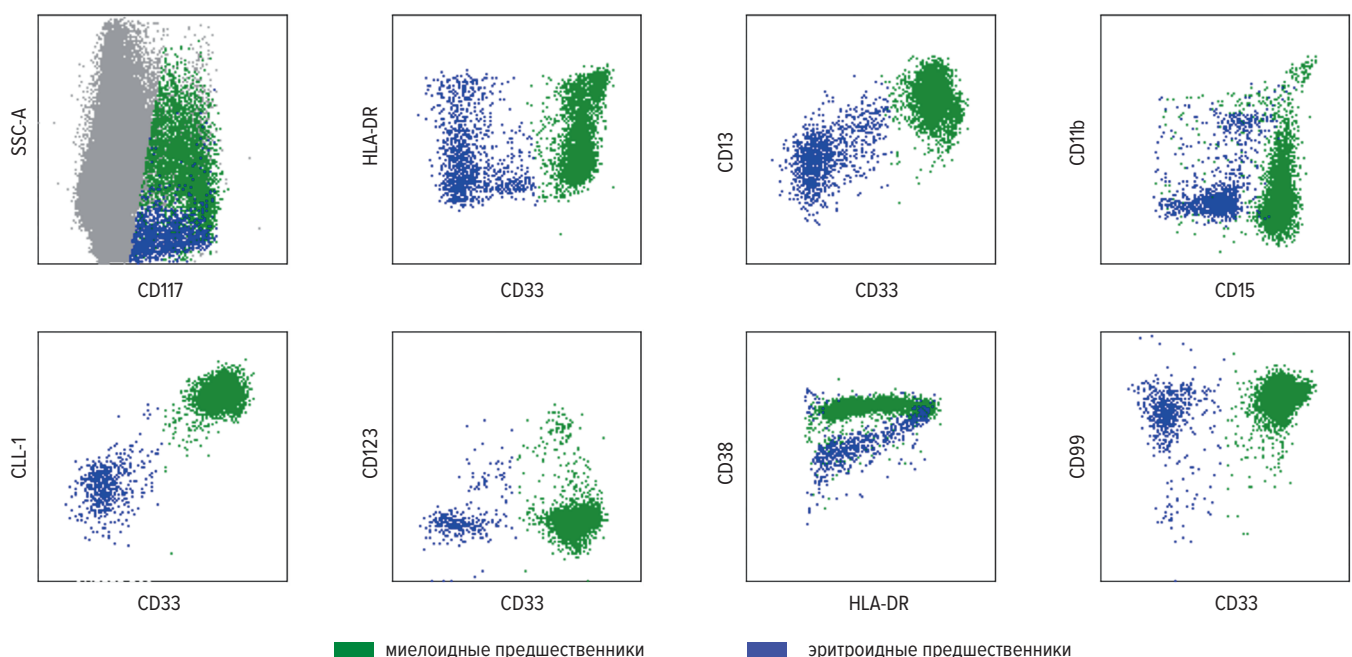


Рис. 3. Цитометрический анализ клеток CD117⁺ костного мозга донора

Fig. 3. Cytometric analysis of a donor bone marrow CD117⁺ cells

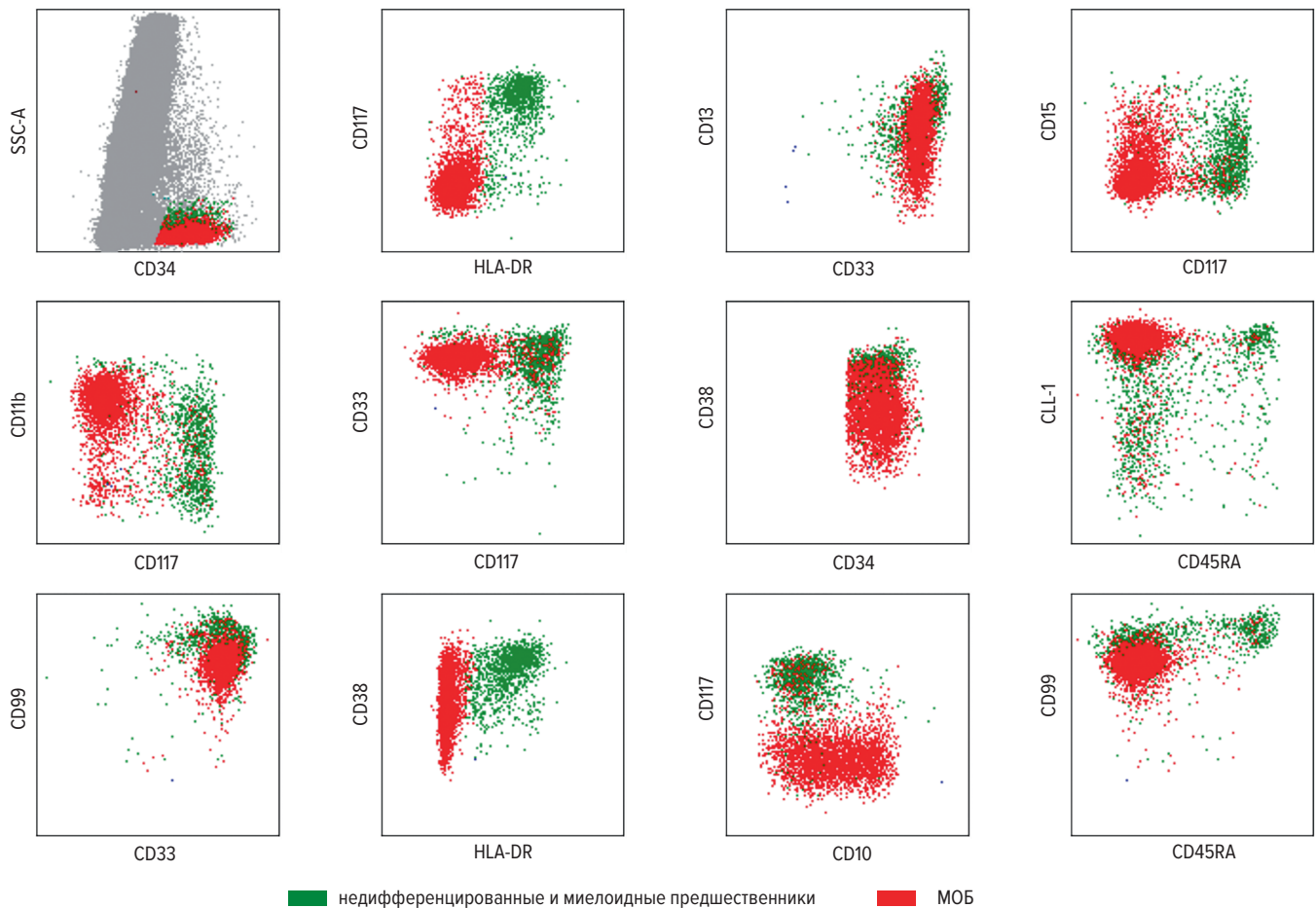


Рис. 4. Пример определения остаточной опухолевой популяции с асинхронной коэкспрессией CD11b и CD34, сниженной экспрессией CD38, HLA-DR, CD117 и коэкспрессией лимфоидного маркера CD10 у пациента с ОМЛ
МОБ — минимальная остаточная болезнь.

Fig. 4. Detection of residual tumor population with asynchronous CD11b and CD34 co-expression, reduced CD38, HLA-DR and CD117 expression, and CD10 lymphoid marker co-expression in an AML patient
MOB — minimal residual disease.

ПРИМЕРЫ МОБ, ВЫЯВЛЕННОЙ МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Рассмотрим несколько примеров МОБ у больных ОМЛ. На рис. 4 и 5 показаны случаи остаточных опухолевых клеток CD34⁺, причем последовательность диаграмм такая же, как на рис. 2, где отображены нормальные клетки КМ донора. В первом наблюдении у больного ОМЛ после 1-го курса химиотерапии среди анализируемых клеток CD34⁺ обнаружены нормальные миелоидные предшественники, которые на рис. 4 отображены зеленым цветом, В-клеточные предшественники отсутствуют, при этом определена довольно большая популяция аномальных клеток, выделенных красным цветом. Клетки этой популяции имеют асинхронную коэкспрессию CD11b и CD34 при отсутствии CD117, HLA-DR и низкой экспрессии CD38. Интересно, что на клетках этой популяции частично экспрессирован CD10, поэтому их можно перепутать с В-клеточными предшественниками. Доказательством того, что эти клетки не являются В-клеточными предшественниками, служит наличие на них миелоидных маркеров CD13, CLL-1 и CD33.

Во втором наблюдении у больного ОМЛ после 2 курсов химиотерапии обнаруживается популяция

аномальных клеток CD34⁺, которые по иммунофенотипу ближе всего к мультипотентным стволовым клеткам (МРР) (см. рис. 5). Эта популяция преобладает среди всех клеток CD34⁺, а В-клеточные предшественники не выявляются, так же как и в предыдущем случае. Опухолевые клетки имеют низкую экспрессию CD38, HLA-DR, CD33, а экспрессия CD13 на них отсутствует (см. рис. 5).

В последнем примере показан случай определения МОБ среди клеток CD117⁺CD34⁻ у больной ОМЛ с достигнутой полной ремиссией, готовившейся к аллотГСК. Остаточные опухолевые клетки показаны на рис. 6 и выделены красным цветом. Отличием этих клеток от нормальных миелоидных предшественников является отсутствие HLA-DR, сниженная экспрессия CD13, при этом клетки обладают яркой экспрессией CD33 и CD99, а также частично положительны по маркеру CD123 (см. рис. 6).

ПРИМЕРЫ ПАНЕЛЕЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОБ ПРИ ОМЛ

В лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии»

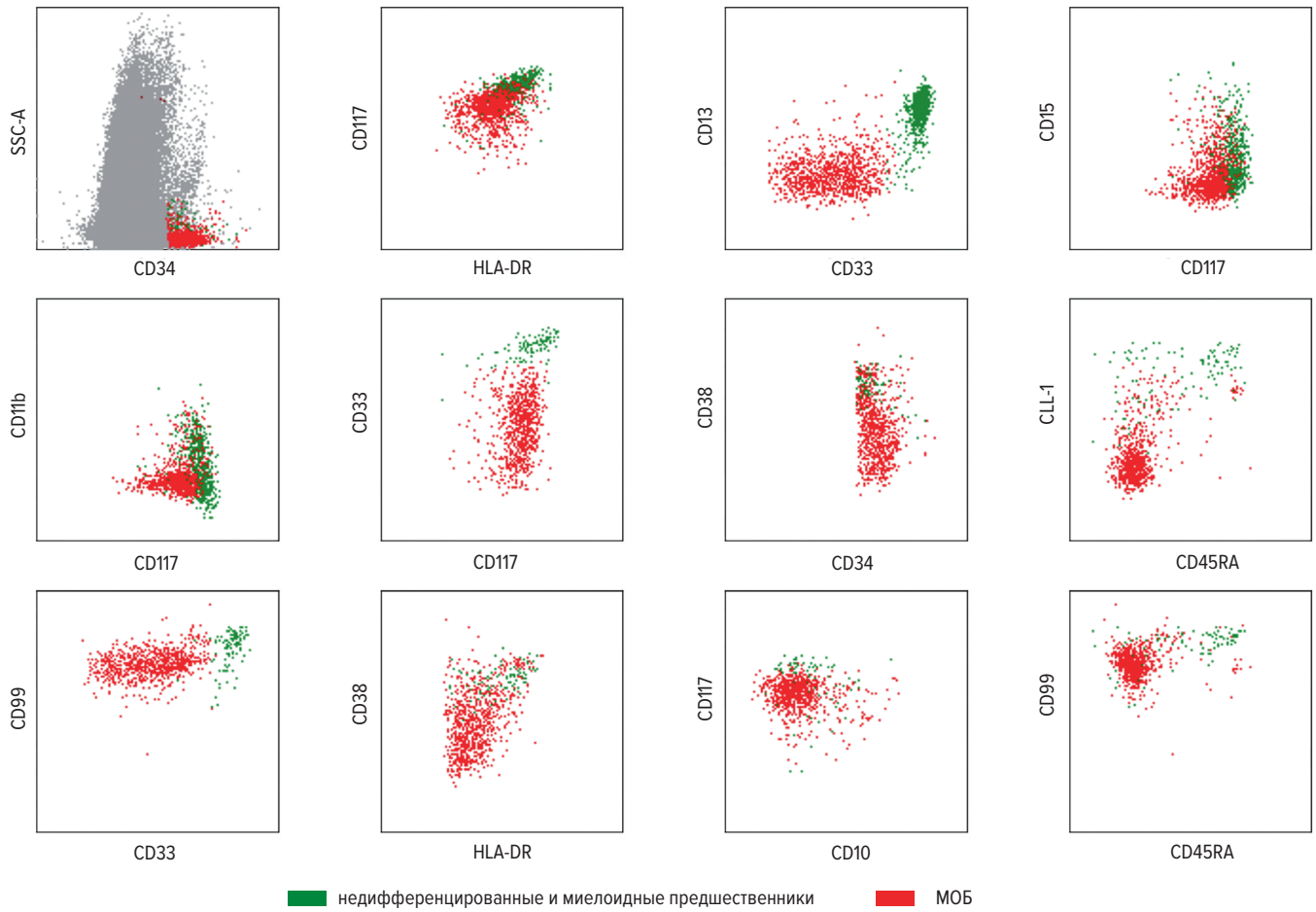


Рис. 5. Пример определения остаточной опухолевой популяции со сниженной экспрессией CD38, HLA-DR и CD13 среди клеток CD34⁺ у пациента с ОМЛ
МОБ — минимальная остаточная болезнь.

Fig. 5. Detection of residual tumor population with reduced CD38, HLA-DR and CD13 expression among CD34⁺ cells in an AML patient
МОБ — minimal residual disease.

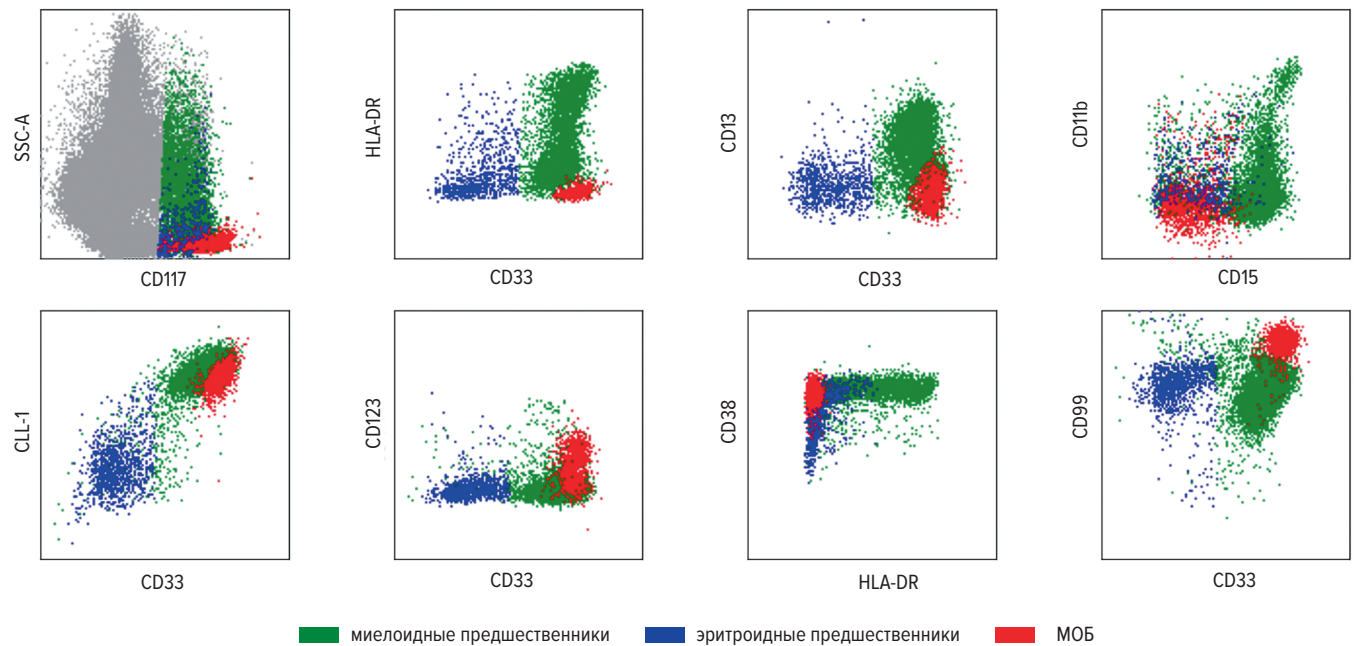


Рис. 6. Пример определения остаточной опухолевой популяции среди клеток CD117⁺ с отсутствием HLA-DR, высокой плотностью CD33 и CD99, а также частично положительных по маркеру CD123 у пациентки с ОМЛ
МОБ — минимальная остаточная болезнь.

Fig. 6. Detection of residual tumor population among CD117⁺ cells with absent HLA-DR, tight CD33 and CD99 cells as well as partially CD123 positive cells in a female AML patient
МОБ — minimal residual disease.

Таблица 1. Панели моноклональных антител для мониторинга минимальной остаточной болезни у больных острыми миелоидными лейкозами

Антигенная специфичность (клон)	Флюорохром										
	FlTC	PE	ECD	PerCPy5.5/PC5.5	PE-Cy7	APC	APC-A700	APC-Cy7	BV421	BV510	BV605
6-цветная панель, 1-й вариант											
CD7 (8H8.1) или CD56 (NCAM16.2)	CD19 (SJ25C1) или CD4 (RPA-T4)		HLA-DR (L243)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)			CD45 (2D1)			
CD65 (VIM8)	CD15 (HI98)		CD14 (MφP9)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)			CD45 (2D1)			
CD66b (G10F5)	CD11b (D12)		CD16 (3G8)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)			CD45 (2D1)			
CD99 (3B2/TA8)	CD13 (L138)		CD117 (104D2)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)			CD45 (2D1)			
6-цветная панель, 2-й вариант											
CD38 (HIT2)	CD7 (8H8.1), или CD56 (NCAM16.2), или CD4 (RPA-T4)		HLA-DR (L243)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)			CD45 (2D1)			
CD38 (HIT2)	CD133 (clone 7)		CD19 (SJ25C1)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)			CD45 (2D1)			
CD99 (3B2/TA8)	CD33 (WM53)		CD13 (WM15)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)			CD45 (2D1)			
CD65 (88H7)	CD33 (WM53)		CD13 (WM15)	CD56 (NCAM16.2)	CD123 (7G3)			CD45 (2D1)			
CD66b (G10F5)	CD33 (WM53)		CD14 (MφP9)	HLA-DR (L243)	CD36 (CB38)			CD11b (ICRF44)			
CD15 (MMA)	CD33 (WM53)		HLA-DR (L243)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)			CD11b (ICRF44)			
11-цветная панель											
CD15 (80H5)	CD2 (39C1.5)/CD7 (8H8.1)/CD11a (25.3)/CD19 (J3-119)/CD56 (NCAM16.2)	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3HL60.251)	CD13 (WM15)	CD14 (RMO52)	CD11b (ICRF44)	HLA-DR (L243)	CD45 (2D1)	CD16 (3G8)	
CD38 (HIT2 или T16)	CD371 (50C1)	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3HL60.251)	CD99 (3B2/TA8)	CD123 (SSDCLY107D2)	CD45RA (2H4LDH11LDB9)	HLA-DR (L243)	CD45 (2D1)	CD10 (H10a)	

APC — алофикоцианин; APC-A700 — алофикоцианин Алекса Флюор 700; APC-Cy7 — алофикоцианин-цианин 7; BV — бриллиантовый флюорохром; ECD — краситель с энергетической связью; FITC — флюороэсцина изотиоцианат; PE — фикоэритрин; PE-Cy7 — фикоэритрин-цианин 7; PerCPy5.5 — перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5.

МЗ РФ проводится мониторинг МОБ у больных ОМЛ с использованием 6- и 11-цветных панелей моноклональных антител (табл. 1). Общий принцип при составлении всех панелей заключается в том, что ряд антигенов (CD7, CD19, CD56, CD2, CD4, CD11a) исследуется в случае их информативности, определяемой при анализе первичного иммунофенотипа бластных клеток до начала терапии ОМЛ.

С 2016 по 2018 г. мы применяли 6-цветную панель, состоящую из 4 пробирок, которая имела несколько недостатков: нечеткое отделение CD34-позитивной популяции, антитело против CD117 присутствовало только в 1 пробирке, поэтому не было возможности выполнить детальный анализ клеток CD117⁺, анализ промоноцитов и моноцитов также не был достаточно глубоким. Кроме того, отсутствовали маркеры для отделения ПДК и базофилов. С 2019 по 2020 г. мы обновили 6-цветную панель, которая стала включать 6 пробирок, поменяли антитело против CD34, 4 из 6 пробирок содержали антитела против CD34 и CD117, в результате анализ незрелых предшественников был более детальным. Мы подобрали комбинации для анализа моноцитов, базофилов и ПДК. Однако в такой панели невозможно было анализировать ранние и более зрелые клетки одновременно, поскольку технические характеристики цитометра позволяли нам исследовать только 6 цветов одновременно. С 2020 г. мы начали применять 11-цветную панель, которая на данном этапе исследования удовлетворяет требованиям определения МОБ у больных ОМЛ и может быть признана оптимальной. Эта комбинация моноклональных антител была разработана исследовательской группой по иммунологической диагностике детского больничного комплекса Святой Анны (Вена, Австрия).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОБ

Чувствительность метода МПЦ зависит от общего количества проанализированных клеток и принятого числа клеток, формирующих минимальную популяцию. Это число в разных лабораториях может отличаться. В лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ в качестве минимального количества клеток, которое формирует популяцию, принято 20. Тогда чувствительность будет определяться по формуле 1:

$$\text{Чувствительность} = \frac{20}{\text{Количество ядродержащих клеток}} \times 100 \% \quad (1)$$

Необходимая чувствительность метода составляет 0,01 %. Для того чтобы достичь такой чувствительности достаточно проанализировать 200 000 клеток и более (если минимальной была принята популяция, состоящая из 20 клеток). Если такая чувствительность не достигается, например, вследствие низкой клеточ-

ности КМ или значительного разведения материала периферической кровью, то необходимо провести повторную пункцию КМ и повторное исследование МОБ [4].

Результат исследования МОБ считается положительным, если при цитометрическом исследовании выявлена популяция лейкозных клеток. Определяют долю опухолевых клеток от всех ядродержащих клеток или лейкоцитов. Ответ выдается в виде процента. Если среди собранных клеток не обнаружено популяции лейкозных клеток, то делают заключение, что МОБ не выявлена при достигнутой чувствительности анализа.

Не исключено, что МОБ не будет выявляться, но при этом опухолевая популяция может сохраняться в таком небольшом количестве, которое меньше достигнутого порога чувствительности. Чувствительность метода можно описать как минимальное количество опухолевых клеток, которое можно обнаружить с помощью данного метода. Таким образом, МОБ-негативность не означает, что достигнуто полное отсутствие опухолевых клеток у больного [4].

В последнее время при мониторинге МОБ уделяют особое внимание понятиям LOD (Limit of Detection) и LLOQ (Lower Limit of Quantification). LOD — это минимальный порог определения, когда найдена популяция не менее 30 клеток, что позволяет сделать заключение просто о наличии МОБ (формула 2). LLOQ — это порог точной количественной оценки, который достигается, если найдена популяция не менее чем из 50 клеток, когда можно определить количество МОБ точно и воспроизводимо (формула 3) [24].

$$\text{LOD} = \frac{30 \text{ аберрантных клеток}}{\text{Количество ядродержащих клеток}} \times 100 \% \quad (2)$$

$$\text{LLOQ} = \frac{50 \text{ аберрантных клеток}}{\text{Количество ядродержащих клеток}} \times 100 \% \quad (3)$$

Применение подходов LOD/LLOQ позволяет повысить специфичность исследования за счет выделения группы МОБ-положительных пациентов с низким количеством обнаруженных опухолевых клеток (от 20 до 50) и группы истинно МОБ-отрицательных пациентов с достигнутым высоким показателем чувствительности [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, стало необходимым интегрировать в протоколы лечения больных ОМЛ определение МОБ-статуса. Определение МОБ у больных ОМЛ — одна из самых непростых задач в проточной цитометрии. Анализ цитометрических данных требует

экспертного знания иммунофенотипа всех клеточных компартментов КМ. Вследствие того, что опухолевые клетки при ОМЛ существенно отличаются у разных больных, а иммунофенотип лейкозных клеток иногда незначительно отличается от нормальных клеточных аналогов, требуются не менее 8–10-цветный анализ, правильно подобранные панели моноклональных антител, достаточная чувствительность исследований, хорошее качество образцов КМ и лабораторный архив донорских нормальных образцов дифференцировки и созревания клеток КМ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова, Ю.О. Давыдова.

Сбор и обработка данных: Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, К.А. Никифорова.

Предоставление материалов исследования: Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, К.А. Никифорова.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Cheson BD, Bennett JM, Kopecy KJ, et al. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4642–9. doi: 10.1200/JCO.2003.04.036.
2. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000;14(5):783–5. doi: 10.1038/sj.leu.2401780.
3. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2018;131(12):1275–91. doi: 10.1182/blood-2017-09-801498.
4. Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Паровичникова Е.Н. Определение минимальной измеримой остаточной болезни у взрослых больных острыми лейкозами. *Гематология и трансфузиология.* 2020;65(4):460–72. doi: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-460-472. [Galtseva IV, Davydova YO, Parovichnikova EN. Detection of measurable residual disease in adults with acute leukaemia. *Russian journal of hematology and transfusiology.* 2020;65(4):460–72. doi: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-460-472. (In Russ)]
5. Shen Z, Gu X, Mao W, et al. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: Systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2018;18(1):755. doi: 10.1186/s12885-018-4670-5.

6. Leung W, Pui C-H, Coustan-Smith E, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood.* 2012;120(2):468–72. doi: 10.1182/blood-2012-02-409813.
7. Norkin M, Katragadda L, Zou F, et al. Minimal residual disease by either flow cytometry or cytogenetics prior to an allogeneic hematopoietic stem cell transplant is associated with poor outcome in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2017;7(12):634. doi: 10.1038/s41408-017-0007-x.
8. Anthias C, Dignan FL, Morilla R, et al. Pre-transplant MRD predicts outcome following reduced-intensity and myeloablative allogeneic hemopoietic SCT in AML. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(5):679–83. doi: 10.1038/bmt.2014.9.
9. Buckley SA, Wood BL, Othus M, et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica.* 2017;102(5):865–73. doi: 10.3324/haematol.2016.159343.
10. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016;90(1):47–53. doi: 10.1002/cyto.b.21239.
11. Wood BL. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* 2004;75:559–76. doi: 10.1016/s0091-679x(04)75023-2.
12. Wood BL. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia. In: Czader M, ed. *Hematological Malignancies. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols).* Vol. 999. Totowa: Humana Press; 2013. pp. 123–36. doi: 10.1007/978-1-62703-357-2_8.
13. Лобанова Т.И., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы). *Онкогематология.* 2018;13(1):83–102. doi: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-83-102. [Lobanova TI, Galtseva IV, Parovichnikova EN. Minimal residual disease assessment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry (literature review). *Oncohematology.* 2018;13(1):83–102. doi: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-83-102. (In Russ)]
14. Tien HF, Wang CH. CD7 positive hematopoietic progenitors and acute myeloid leukemia and other minimally differentiated leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1998;31(1–2):93–8. doi: 10.3109/10428199809057588.
15. Jorgensen JL, Chen SS. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11(Suppl 1):S49–53. doi: 10.1016/j.clml.2011.03.023.
16. Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(9):1129–38. doi: 10.1038/bmt.2014.99.
17. Buldini B, Maurer-Granofszky M, Varotto E, Dworzak MN. Flow-cytometric monitoring of minimal residual disease in pediatric patients with acute myeloid leukemia: recent advances and future strategies. *Front Pediatr.* 2019;7:412. doi: 10.3389/fped.2019.00412.
18. Wood BL. Acute myeloid leukemia minimal residual disease detection: the difference from normal approach. *Curr Protoc Cytom.* 2020;93(1):e73. doi: 10.1002/cpsy.73.
19. Ostendorf BN, Flenner E, Florcken A, Westermann J. Phenotypic characterization of aberrant stem and progenitor cell populations in myelodysplastic syndromes. *PLoS One.* 2018;13(5):e0197823. doi: 10.1371/journal.pone.0197823.
20. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2011;19(1):138–52. doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.012.
21. Sharneli A, Dharmani-Khan P, Luider J, et al. Exploring blast composition in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: CD45RA and CD371 improve diagnostic value of flow cytometry through assessment of myeloblast heterogeneity and stem cell aberrancy. *Cytom Part B: Clin Cytom.* 2020:1–16. doi: 10.1002/cyto.b.21983. Epub ahead of print.
22. Bill M, van Kooten Niekerk BP, Woll SP, et al. Mapping the CLEC12A expression on myeloid progenitors in normal bone marrow; implications for understanding CLEC12A-related cancer stem cell biology. *J Cell Mol Med.* 2018;22(4):2311–8. doi: 10.1111/jcmm.13519.
23. Eissens DN, Spanholtz J, van der Meer A, et al. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One.* 2012;7(2):e30930. doi: 10.1371/journal.pone.0030930.
24. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytom Part B: Clin Cytom.* 2016;90(1):26–30. doi: 10.1002/cyto.b.21249.
25. Palmieri R, Piciocchi A, Arena V, et al. Clinical relevance of limit of detection (LOD) - limit of quantification (LOQ) - based flow cytometry approach for measurable residual disease (MRD) assessment in acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2020;136(Suppl 1):37–8. doi: 10.1182/blood-2020-139557.