

Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы

А.М. Попов¹, М.В. Белевцев², Е.В. Боякова^{1,3}, Т.Ю. Вержбицкая^{4,5}, Л.В. Мовчан², М.С. Фадеева¹,
А.Б. Пашенко¹, В.П. Савицкий², А.А. Левадный³, Г.А. Цаур^{4,5}, С.А. Кашпор¹, С.А. Плясунова¹,
Л.Г. Фечина⁴, О.В. Алейникова², А.И. Карачунский^{1,6}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»; Республика Беларусь, 223053 Минский район, дер. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43;

³ГБУЗ «Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 115516 Москва, ул. Бакинская, 31;

⁴ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

⁵ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

⁶ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Александр Михайлович Попов uralscytometry@gmail.com

Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей диктует необходимость разработки собственных алгоритмов мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ). Целью работы является разработка оптимального стандартного подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики МОБ у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) во временных точках исследования костного мозга, предусмотренных протоколами группы «Москва—Берлин». Был разработан и успешно внедрен стандартизованный протокол определения МОБ методом проточной цитометрии при ВП-ОЛЛ на разных этапах терапии. Применение таких подходов позволило достичь очень высокой сопоставимости данных, получаемых в разных лабораториях. Эффективная интеграция в систему референсных лабораторий еще одной лаборатории показала высокую воспроизводимость разработанных алгоритмов определения МОБ. Это позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию для определения МОБ при лечении ОЛЛ по протоколам группы «Москва—Берлин».

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, стандартизация

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-64-73

Standardization of flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Russia—Belarus multicenter group experience

A. M. Popov¹, M. V. Belevtsev², E. V. Boyakova^{1,3}, T. Yu. Verzhbitskaya^{4,5}, L. V. Movchan², M. S. Fadeeva¹, A. B. Pashchenko¹,
V. P. Savitskiy², A. A. Levadnyy³, G. A. Tsaur^{4,5}, S. A. Kashpor¹, S. A. Plyasunova¹, L. G. Fechina⁴, O. V. Aleynikova², A. I. Karachunskiy^{1,6}

¹Federal Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitriy Rogachev;
1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Republican Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology; 43 Frunzenskaya St., Borovlyany village,
Minsk region 223053, Republic of Belarus;

³The Blood Transfusion Station of the Moscow Healthcare Department; 31 Bakinskaya St., Moscow 115516, Russia;

⁴Regional Children Clinical Hospital No 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., Ekaterinburg 620149, Russia;

⁵Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia;

⁶N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianova St., Moscow 117997, Russia

We developed and implemented in multicenter setting the standardized approach for flow cytometric minimal residual disease (MRD) monitoring in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Participation of multicenter group reference laboratories in several ring trial studies demonstrated high concordance rate between participants. Successful integration of one additional laboratory in the multicenter group has shown good level of our approach reproducibility. These results will allow implementing MRD detection in stratification system of pediatric ALL treatment protocols of Russia-Belarus multicenter group.

Key words: minimal residual disease, flow cytometry, standardization

Введение

Снижение в результате терапии количества опухолевых клеток в костном мозге (КМ) традиционно считается важным прогностическим фактором при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей [1, 2]. Но даже в случае, если количество опухолевых клеток ниже чувствительности обычных цитологических методов (менее 1 %), они могут вносить существенный вклад в неблагоприятный исход заболевания [3–7]. Совокупность этих клеток, не выявляемых цитологически, но обнаруживаемых другими, более чувствительными методами диагностики, получила название минимальной остаточной болезни (МОБ).

Одним из основных методов оценки МОБ является проточная цитометрия [7, 8]. Прогностическая значимость уровня МОБ, определяемого данным методом, показана в рамках различных протоколов терапии [9–13]. Наиболее важные для прогнозирования исхода заболевания точки исследования – середина и окончание индукции ремиссии [9–13]. Существенными недостатками мониторинга МОБ методом проточной цитометрии по сравнению с количественной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) являются субъективность и сложность стандартизации в рамках многоцентровых исследований [8, 14]. В то время как технология молекулярно-генетического исследования МОБ хорошо отработана и стандартизована [8, 14, 15], опубликовано лишь несколько работ по начальным этапам стандартизации цитометрического мониторинга ОЛЛ в рамках отдельных исследовательских групп [16–18].

Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛЛ у детей [19–22] диктует необходимость разработки собственных алгоритмов мониторинга МОБ.

Целью работы является разработка оптимального стандартного подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики МОБ у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) во временных точках исследования КМ, предусмотренных протоколами группы «Москва–Берлин».

Материалы и методы

В разработке и стандартизации подходов к цитометрическому определению МОБ приняли участие 3 референсные лаборатории иммунофенотипирования группы «Москва–Берлин»: ОДКБ № 1 (Екатеринбург), РНПЦ ДОГИ (Минск) и ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева (Москва). В 2 лабораториях определение МОБ производилось на цитометре FACS-CantoII (Becton Dickinson, США) (2 лазера, 6 цветов, затем 3 лазера, 8 цветов в обоих случаях), в 1 – на FC 500 и Navios (оба – Beckman Coulter, США) (2 лазера, 5 цветов).

Данная работа включала следующие этапы:

- обсуждение принятых в каждой лаборатории подходов к иммунофенотипированию ОЛЛ;

- выработка общих рекомендаций по пробоподготовке, подбору антител и флуорохромов, настройке проточных цитометров;
- разработка алгоритма анализа цитометрических данных и выявления остаточных опухолевых клеток на разных этапах терапии по протоколу ALL-MB 2008;
- участие в различных системах внешнего контроля качества;
- разработка стандартного операционного протокола (СОП) для цитометрического мониторинга МОБ в рамках протокола ALL-MB 2008;
- проведение кругового исследования с рассылкой цитометрических данных с последующим анализом отдельно в каждой лаборатории.

Обсуждение технологических аспектов, разработка общих подходов и оценка результатов работы проводились на встречах специально для этого созданной кооперативной группы в рамках группы «Москва–Берлин» (руководитель – проф. А.И. Карачунский). Всего с февраля 2007 г. (начало работы) по ноябрь 2014 г. (окончание включения пациентов в протокол ALL-MB 2008) было проведено 7 таких встреч. Обсуждались последовательность этапов при окрашивании моноклональными антителами, выбор реагентов для лизиса эритроцитов и отмывки клеток, подбор клонов антител и приемлемых для каждого маркера сочетаний антитело–флуорохром, алгоритмы настройки проточных цитометров.

Данные проточной цитометрии анализировали в программном обеспечении FACSDiva 6.1 (Becton Dickinson), а также CXP и Kaluza 1.5 (обе – Beckman Coulter). Вырабатывали рекомендации для последовательного выделения на точечных графиках опухолевых клеток при определении МОБ в зависимости от их иммунофенотипа [23, 24] и с учетом изменений антигенного профиля под действием терапии по протоколу ALL-MB 2008 [25, 26].

Все 3 лаборатории принимали участие во внешнем контрольном исследовании по определению МОБ, которое проводилось в декабре 2007 г. группой AIEOP-BFM и представляло собой рассылку fcs-файлов 23 пациентов, лечившихся по протоколу ALL-BFM 2000. Оценивали результаты определения МОБ на 15-й день терапии. Показатели каждой лаборатории сравнивали с референсным значением, представляющим собой медиану данных 4 наиболее опытных лабораторий группы AIEOP-BFM [16].

Ретроспективно оценивали распределение по величине полученных в каждой лаборатории результатов определения МОБ у пациентов, получавших терапию по протоколу ALL-MB 2008. Данный протокол является дальнейшим развитием отечественных протоколов по лечению ОЛЛ у детей ALL-MB 91 и ALL-MB 2002 и использовался в рамках многоцентровой кооперативной группы «Москва–Берлин» [19–21, 27].

Круговое исследование для оценки сопоставимости результатов, получаемых в 3 лабораториях, проводили посредством рассылки цитометрических данных в виде fcs-файлов с проточных цитометров. Так как основной задачей этой части работы была оценка возможности проспективного многоцентрового мониторинга МОБ в следующей версии протокола, данные были получены при определении МОБ у 10 пациентов на 15-й и 36-й дни терапии по протоколу ALL-MB 2015. Каждое значение, полученное в отдельной лаборатории, сравнивали с медианой результатов всех 3 лабораторий (референсная величина), по аналогии с исследованием, ранее проводившимся группой AIEOP-BFM [16]. Кроме того, к исследованию была подключена еще 1 лаборатория, в которой также планируется проведение мониторинга МОБ в рамках протокола ALL-MB 2015. Ее данные также сравнивали с референсными.

Результаты

Были разработаны следующие рекомендации по проведению иммунофенотипирования КМ в целях определения МОБ на 15-й и 36-й дни терапии по протоколам группы «Москва–Берлин».

Забор и транспортировка материала

- Цельный КМ в объеме не менее 2 мл забирается в пробирку с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта. Предпочтительно направлять на иммунофенотипирование материал, полученный в самом начале пункции, так как это позволяет максимально избежать разведения КМ периферической кровью, которое может исказить результаты исследования.
- В направлении на определение МОБ, кроме стандартной информации, должны быть указаны тип материала, протокол терапии и этап лечения.
- Образец КМ должен быть доставлен для исследования в течение 48 ч при температуре транспортировки 4 °С. При получении материала в лаборатории должна проверяться его сохранность. При наличии видимых сгустков, гемолиза или при факте длительного хранения запрашивается повторный образец.
- Фильтрация КМ может проводиться при наличии хлопьев жира и мелких сгустков. Если КМ вязкий, возможно его пропорциональное разведение фосфатно-солевым буфером.

Подбор моноклональных антител

Несмотря на четкие отличия между опухолевыми и нормальными клетками в экспрессии различных антигенов, в настоящее время не существует единственного маркера, который был бы применим для мониторинга МОБ во всех случаях ВП-ОЛЛ. Поэтому для адекватного определения остаточных опухолевых клеток предпочтительно использовать многоцветные

комбинации антител, включающие кроме CD19 такие маркеры, как CD10, CD20, CD34, CD45, CD58 и CD38. Попытки упростить подходы к определению МОБ путем сокращения панелей моноклональных антител могут снизить число пациентов, у которых возможно определение МОБ методом проточной цитометрии.

Подбор флуорохрома для каждого конкретного антитела также является критически важным. Ключевые антитела, по которым происходит первичное выделение клеток, среди которых далее производится поиск МОБ (CD19, CD10), должны быть мечены яркими флуорохромами с хорошим разделением позитивного и негативного сигналов (APC, PE). В то же время антитела к антигенам, экспрессируемым с разной интенсивностью различными клетками КМ (CD45, CD38), должны быть мечены флуорохромами с промежуточной интенсивностью свечения (PerCP, APC-Cy7, APC-Alexa750, BV510 и др.), чтобы было возможно получить хорошее разделение популяций среди всех позитивных клеток. Появление на рынке антител, меченных новыми яркими флуорохромами (PE-CF594, BV515 и др.), существенно расширяет возможности формирования панелей для определения МОБ.

Методика окрашивания

- В промаркированные пробирки для проточной цитометрии вносятся первично-меченые антитела в соответствии с используемыми комбинациями маркеров. Вносимый объем раствора антител определяется титрованием и зависит от количества окрашиваемых клеток.
- Добавляется необходимый объем цельного КМ, который рассчитывается исходя из клеточности исследуемого образца, определенной на гемоанализаторе. Необходимо окрасить примерно в 3–4 раза больше клеток, чем планируется проанализировать.
- Образец тщательно перемешивается и инкубируется не менее 15 мин при комнатной температуре в темноте.
- Добавляется соответствующее объему материала количество лизирующего раствора. Предпочтительно использование лизирующего реагента с содержанием фиксирующего компонента для дополнительной стабилизации клеток, подвергающихся химиотерапии.
- Образец тщательно перемешивается и инкубируется согласно инструкции фирмы – производителя лизирующего реагента.
- Образец отмывается 2 раза в 3 мл фосфатно-солевого буфера pH 7,0; удаляется супернатант.
- Добавляется 0,5–1,0 мл фосфатно-солевого буфера.
- Готовый образец должен быть проанализирован на проточном цитометре в течение 2 ч с момента окрашивания.

Если предусмотрено окрашивание ДНК-тропным красителем SYTO16 или SYTO41, необходимо добавить 2–3 мкл раствора (1:200 в 20 мМ Трис-буфере с рН 7,5) красителя после окрашивания и инкубировать 10 мин при комнатной температуре в темноте.

Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используемого прибора. Основными параметрами, влияющими на результат исследования, являются стабильность работы лазеров и жидкостной системы, чувствительность фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) детекторов флуоресценции и цифровая компенсация данных флуоресценции.

Стабильность работы лазеров на большинстве приборов определяется по попаданию показателей работы лазеров в референсные диапазоны. У большинства производителей проточных цитометров существуют системы калибровочных частиц, позволяющие пользователю достаточно легко контролировать работу лазеров и ФЭУ. Персонал лабораторий обязан ежедневно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к компенсации данных, поэтому ее настройка производится одновременно с настройкой компенсации. Для настройки компенсации необходимо применять калибровочные материалы, производимые поставщиком проточного цитометра, имеющегося в конкретной лаборатории. При использовании реагентов различных производителей необходимо проводить настройку чувствительности ФЭУ и компенсации для совершенно конкретных комбинаций используемых антител.

Анализ и интерпретация данных

Существуют значительные различия в иммунофенотипе опухолевых бластов при ВП-ОЛЛ и нормальных В-линейных предшественников (ВП) [28–31]. Именно на этих особенностях ассоциированного с лейкозом иммунофенотипа и строится поиск остаточных лейкоэмических клеток. Важно знать, что во время

индукционной терапии нормальные ВП в КМ отсутствуют, поэтому все обнаруживаемые ВП чаще всего являются опухолевыми [10, 32]. Однако нужно помнить, что В-линейная регенерация может начинаться в самом конце индукционной терапии (особенно у детей раннего возраста), поэтому нормальные ВП могут в крайне небольших количествах присутствовать в образце при определении МОБ на момент окончания индукционной терапии [33].

Есть существенные различия в экспрессии маркеров между опухолевыми клетками при CD10⁺ и CD10⁻ вариантах ВП-ОЛЛ [23, 34]. Кроме количественных отличий экспрессии существуют также различия в доле пациентов, бласты которых экспрессируют тот или иной антиген. Так, при CD10⁻ ВП-ОЛЛ число CD20⁺ пациентов ниже, чем при CD10⁺ варианте. В то же время доля пациентов с гомогенной экспрессией CD45 достоверно выше при CD10⁻ варианте. Несмотря на то, что при CD10⁺ и CD10⁻ вариантах ВП-ОЛЛ применяются сходные панели антигенов, отдельные маркеры используются в различных целях (см. таблицу) [34].

Описанные различия в экспрессии маркеров приводят к тому, что для CD10⁺ и CD10⁻ вариантов ВП-ОЛЛ при мониторинге МОБ необходимо применять различные алгоритмы анализа данных (рис. 1) [34, 35]. В любом случае поиск МОБ начинается с выделения CD19⁺ клеток, среди которых проводится дальнейший анализ. Для CD10⁺ ВП-ОЛЛ анализ точечных графиков основывается на определении экспрессии CD10 и маркеров, по которым можно отличить опухолевые клетки от нормальных ВП (например, CD45 при CD45⁻ ВП-ОЛЛ или CD58) (рис. 2). В случае гетерогенной экспрессии CD10 необходимо оценивать также экспрессию всех остальных используемых маркеров, прежде всего CD34. Для CD10⁻ ВП-ОЛЛ при анализе данных наиболее значимым является определение экспрессии CD10 и CD20. При этом из анализа исключаются CD10⁺ и CD20⁺ клетки. Среди оставшихся CD19⁺CD10⁻CD20⁻ клеток необходимо отличать МОБ от плазмочитов и продуктов неспецифического связывания антител.

Задачи применения различных антигенов для определения минимальной остаточной болезни при CD10⁺ и CD10⁻ ВП-ОЛЛ

Маркер	CD10 ⁺ ВП-ОЛЛ	CD10 ⁻ ВП-ОЛЛ
CD19	Выделение всех клеток В-линии	Выделение всех клеток В-линии
CD10	Выделение опухолевых клеток	Исключение из анализа нормальных ВП
CD20	Выделение опухолевых клеток, исключение из анализа В-лимфоцитов	Исключение из анализа нормальных ВП и В-лимфоцитов
CD34	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток
CD58	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток
CD38	Дифференцирование опухолевых клеток от нормальных ВП	Дифференцирование опухолевых клеток от прогениторных
CD45	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток

Примечание. ВП – В-линейные предшественники; ВП-ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз из ВП.

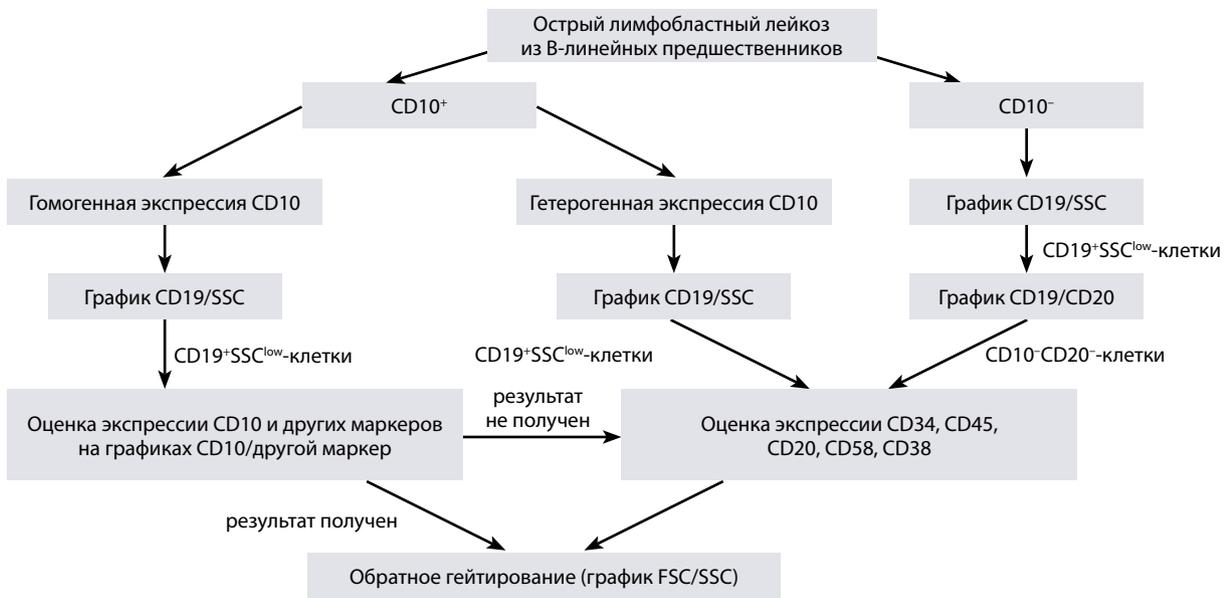


Рис. 1. Алгоритм анализа данных проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при $CD10^+$ и $CD10^-$ вариантах острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников

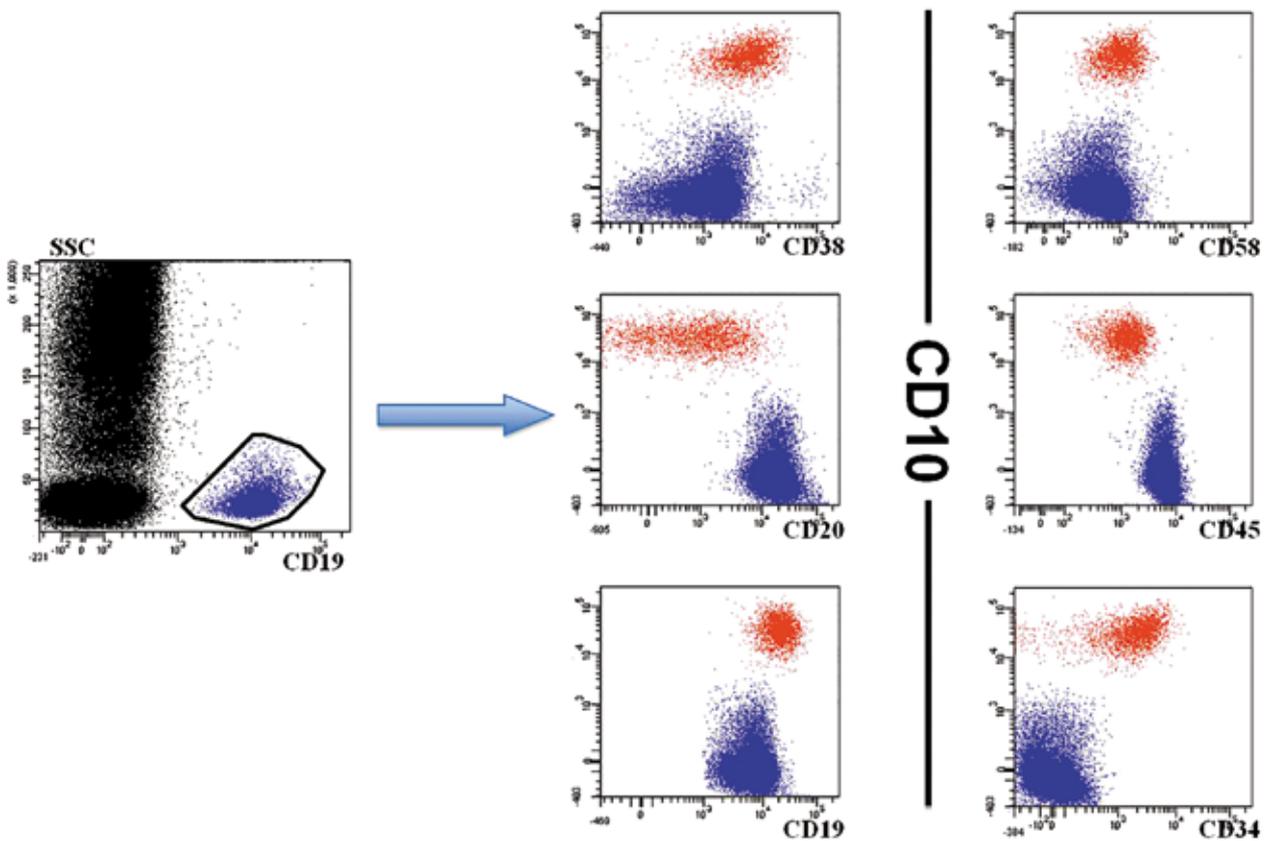


Рис. 2. Пример расположения остаточных опухолевых клеток на точечных графиках на 15-й день терапии $CD10^+$ острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников. Опухолевые клетки показаны красным цветом, зрелые В-лимфоциты – синим, остальные клетки – черным

Для этого необходимо использовать CD38, CD34, CD45. После выделения опухолевых клеток они должны быть отображены на графике FSC/SSC для исключения из анализа мертвых клеток (рис. 3) [34, 35].

Для успешного определения МОБ нужно также учитывать, что фенотип опухолевых клеток может

существенно меняться во время терапии. Наиболее распространенными тенденциями изменений являются снижение экспрессии CD10, CD34 и CD58, а также повышение экспрессии CD20, CD45 и CD19 [25, 26]. При наличии перестроек гена *MLL* изменения иммунофенотипа могут быть очень существенными [36, 37].

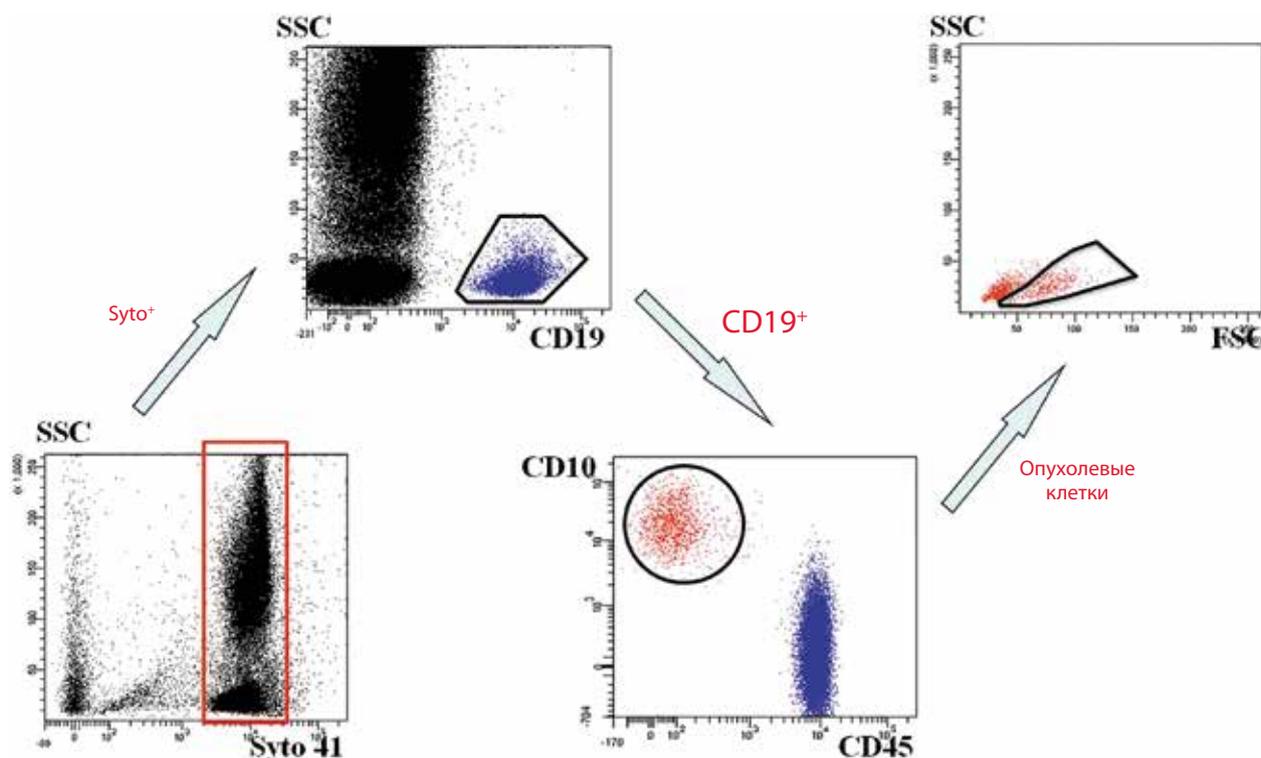


Рис. 3. Пример последовательного выделения опухолевых клеток при определении минимальной остаточной болезни. Опухолевые клетки показаны красным цветом, зрелые В-лимфоциты — синим

Величина МОБ при определении методом проточной цитометрии рассчитывается как процентное содержание опухолевых клеток среди всех ядродержащих клеток КМ. При этом для идентификации опухолевых клеток используются различные варианты комбинаций антител, а итоговым уровнем МОБ считается максимальное количество, полученное в одной из пробирок. Ядродержащие клетки в образце могут быть определены 2 разными способами. Возможно выделение региона лейкоцитов на графике FSC/SSC, однако при анализе большого числа клеток обычно достаточно сложно на скатерограмме четко отделить клетки от дребриса. Рекомендуется применение ДНК-тропного красителя, окрашивание которым позволяет четко отделить ядродержащие клетки от всех случайно зафиксированных цитометром событий. Чаще всего для этих целей используются красители SYTO16 (канал FITC проточного цитометра) или SYTO41 (канал PacificBlue). Предпочтительным является добавление ДНК-тропного красителя прямо в пробирку, в которой проводится определение МОБ. В этом случае выделение CD19⁺ клеток производится только среди SYTO⁺ (см. рис. 3). Если же такой возможности нет, рекомендуется провести дополнительное окрашивание SYTO/CD19/CD45.

При определении МОБ методом проточной цитометрии позитивными считаются образцы, в которых на точечных графиках определяется группа из 10 и более клеток, имеющих лейкозассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, соответствующие лимфоцитам/лимфобластам. Макси-

мальная чувствительность метода (анализ 1 000 000 клеток) составляет 0,001 %, т. е. возможно выявить 1 опухолевую клетку среди 100 000 нормальных. В то же время далеко не во всех случаях клеток в образце достаточно для достижения такой чувствительности. Поэтому минимально достаточной рутинной чувствительностью обычно принято считать 0,01 %, для достижения которой необходим анализ 100 000 клеток. Если по тем или иным причинам не удастся собрать достаточное количество клеток, а опухолевые клетки не выявляются, исследование считается невозможным.

В заключении, выдаваемом лабораторией по результатам определения МОБ, кроме базовой информации о пациенте должны также указываться название протокола терапии и этап лечения.

Апробация применения выработанных подходов для определения минимальной остаточной болезни в рамках многоцентрового исследования

Результаты участия лабораторий группы «Москва—Берлин» во внешнем контрольном исследовании по определению МОБ, которое проводилось в декабре 2007 г. группой AIEOP-BFM, представлены на рис. 4. Результаты, полученные в каждой из лабораторий, показали очень высокую сопоставимость с референсными значениями.

Рассылка цитометрических данных внутри группы также показала хорошую сходимость результатов, получаемых в разных лабораториях, как на 15-й, так и на 36-й дни терапии по протоколу ALL-MB 2015 (рис. 5a–в). При этом результаты определения МОБ

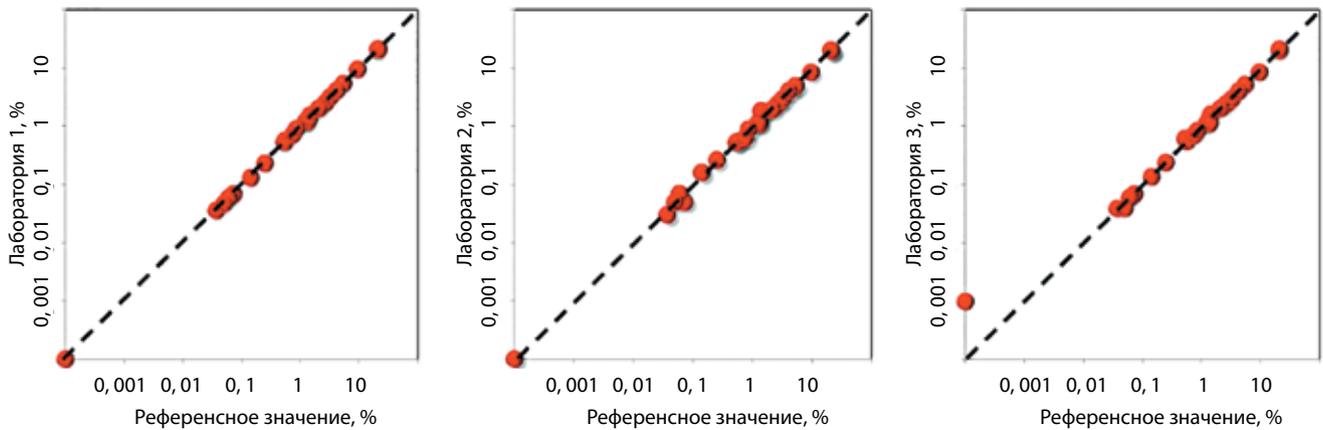


Рис. 4. Результаты участия лабораторий рабочей группы в круговом исследовании, проводившемся группой AIEOP-BFM (данные предоставлены M.N. Dworzak). Результаты определения минимальной остаточной болезни на 15-й день терапии, полученные в каждой лаборатории, сравнивались с референсными значениями, представляющими собой медиану результатов 4 наиболее опытных лабораторий группы AIEOP-BFM

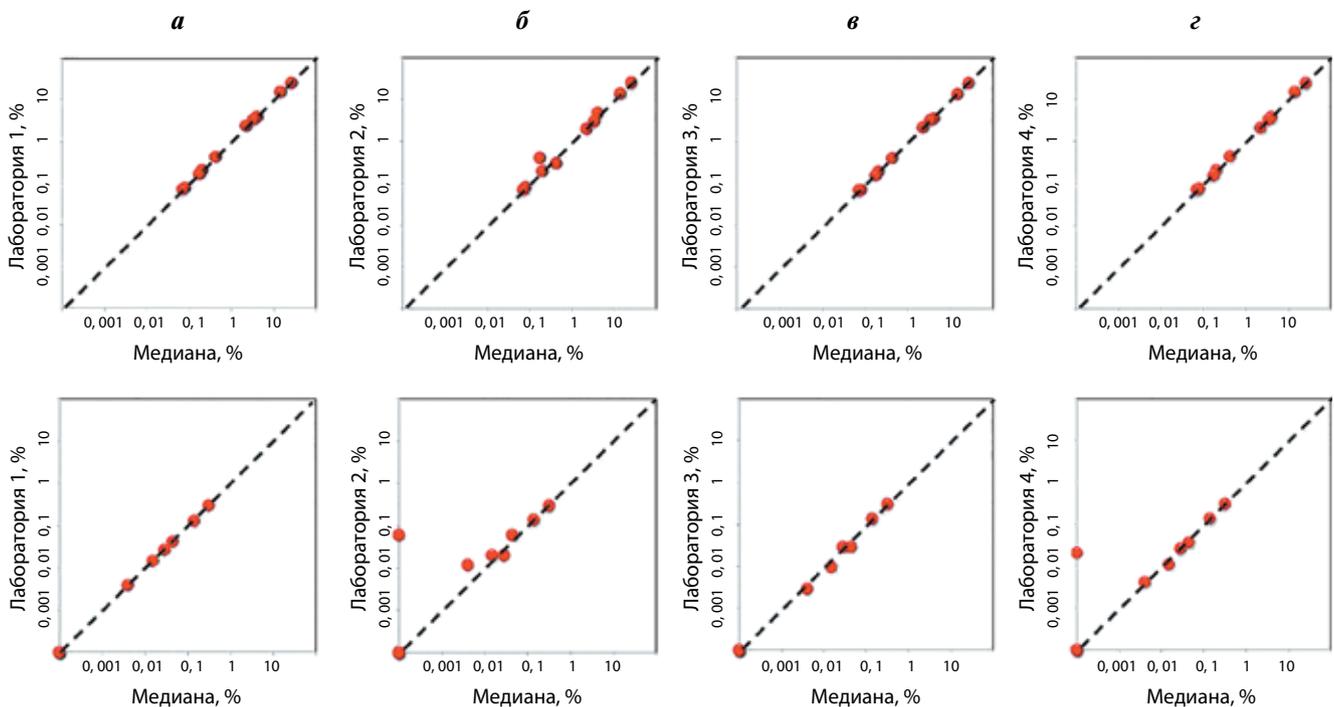


Рис. 5. Результаты участия лабораторий рабочей группы (а–в) в круговом исследовании в рамках протокола ALL–MB 2015. Результаты определения минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й (верхний ряд) и 36-й (нижний ряд) дни терапии, полученные в каждой лаборатории, сравнивались с референсными значениями, представляющими собой медиану результатов всех 3 лабораторий. В исследовании приняла участие еще 1 лаборатория, в которой также планируется проведение мониторинга МОБ в рамках ALL–MB 2015 (г)

на момент окончания индукционной терапии оказались несколько менее сопоставимыми, поскольку на данном этапе лечения величины МОБ обычно ближе к предельным значениям аналитической чувствительности проточной цитометрии, чем на 15-й день. Данные еще одной лаборатории, в которой также планируется проведение мониторинга МОБ в рамках протокола ALL–MB 2015, не отличались существенно от результатов, полученных в референсных лабораториях протокола ALL–MB 2008 (рис. 5з).

Распределение пациентов, у которых МОБ определялась в референсных лабораториях, по количеству

остаточных опухолевых клеток представлено на рис. 6. Существенных различий также не обнаружено, хотя, как и ожидалось, одинаковых результатов получено не было.

Обсуждение

Несмотря на то, что проточная цитометрия относительно давно признается одним из основных методов мониторинга МОБ при ОЛЛ у детей, попытки стандартизации ее применения немногочисленны. Отсутствие должного уровня стандартизации является одним из основных недостатков данной технологии

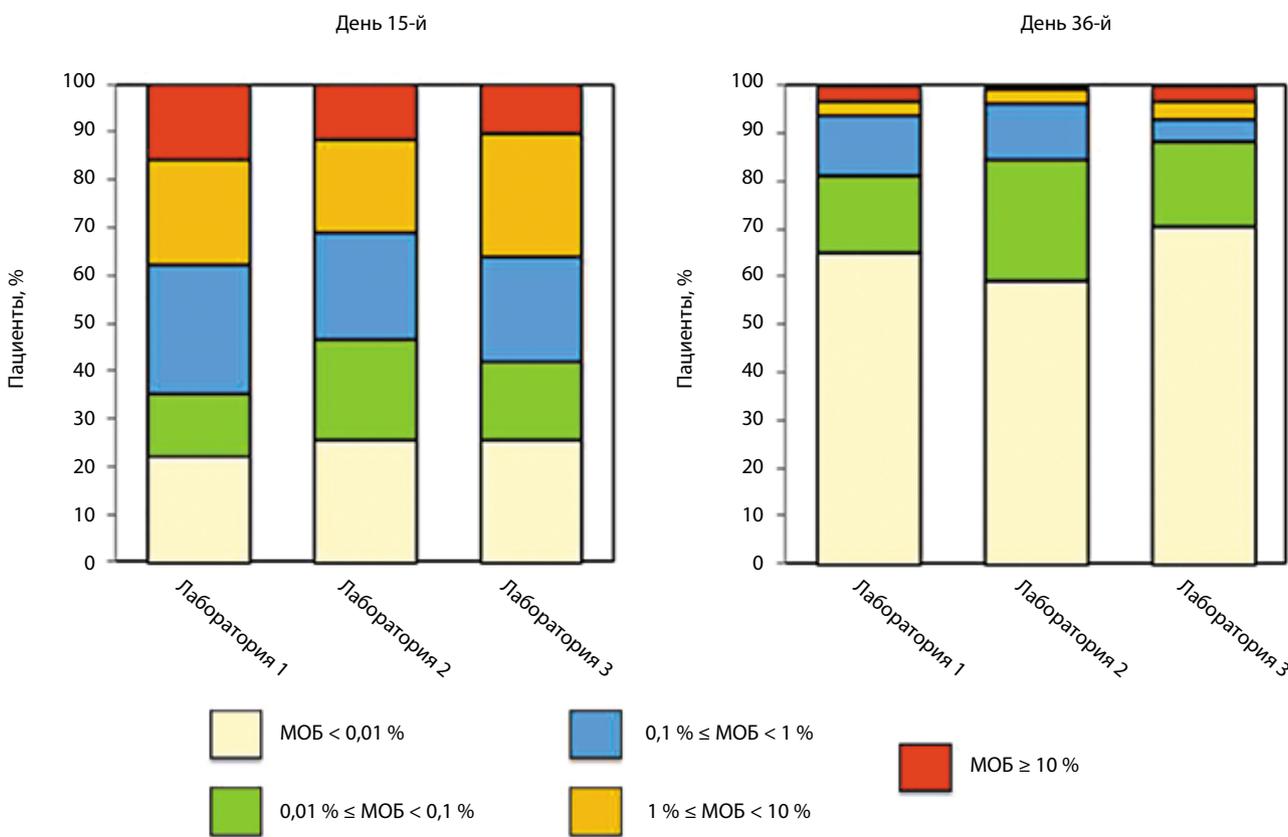


Рис. 6. Распределение по величинам минимальной остаточной болезни (МОБ) результатов, полученных в лабораториях рабочей группы при мониторинге МОБ в исследовании ALL-MB 2008

по сравнению с ее основным «соперником» – определением пациент-специфических перестроек генов тяжелых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Однако сложности применения данного варианта ПЦР определяют необходимость разработки стандартизованных протоколов определения МОБ проточной цитометрией в рамках различных терапевтических протоколов. На данный момент такие попытки проводятся группами AIEOP-BFM [16], UKALL [17], NOPHO [18]. Кроме того, высокий уровень стандартизации определения МОБ при ОЛЛ предлагает не связанная с определенными терапевтическими протоколами группа EuroFlow [14]. В российских группах по исследованию ОЛЛ применение ПЦР в реальном времени практически невозможно ввиду высокой стоимости и крайней технологической сложности данного метода [7, 8]. Поэтому стандартизация определения МОБ методом проточной цитометрии является крайне необходимой для последующего его применения в рамках многоцентровых исследований, тем более что для результатов, полученных как на 15-й,

так и на 36-й дни терапии по протоколам ALL-MB 2002 и ALL-MB 2008, показано существенное прогностическое значение [38–41]. Нами был разработан и успешно внедрен стандартизованный протокол определения МОБ методом проточной цитометрии при ВП-ОЛЛ на разных этапах терапии. Применение таких подходов позволило достичь очень высокой сопоставимости данных, получаемых в разных лабораториях. Эффективная интеграция в систему референсных лабораторий еще одной лаборатории показала высокую воспроизводимость разработанных алгоритмов определения МОБ.

Заключение

Таким образом, разработанные и представленные в данной работе стандартизованные подходы к мониторингу МОБ методом проточной цитометрии во время и по окончании индукционной терапии по протоколам группы «Москва–Берлин» позволят в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в системе референсных лабораторий в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по терапии ОЛЛ у детей.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Mörike A., Zimmermann M., Reiter A. 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(2):265–84. DOI: 10.1038/leu.2009.257. PMID: 20010625.
2. Pui C.H., Pei D., Sandlund D.T. et al. Long-term results of St. Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(2):371–82. DOI: 10.1038/leu.2009.252. PMID: 20010620.
3. Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29(5):551–65. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7405. PMID: 21220611.
4. Pui C.H., Mullighan C.G., Evans W.E., Relling M.V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120(6):1165–74. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378943. PMID: 22730540.
5. Moppett J., Burke G.A.A., Steward C.G. et al. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003;56(4):249–53. PMID: 12663634.
6. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:7–12. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.7. PMID: 21239764.
7. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:137–42. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.137. PMID: 23233572.
8. Brüggemann M., Schrauder A., Raff T. et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia* 2010;24(3):521–35. DOI: 10.1038/leu.2009.268. PMID: 20033054.
9. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691–6. PMID: 11023499.
10. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952–8. PMID: 11877265.
11. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2002;100(1):52–8. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0006. PMID: 12070008.
12. Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477–85. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837. PMID: 18388178.
13. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168–74. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8934. PMID: 19805690.
14. van Dongen J.J.M., van der Velden V.J.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015;125(26):3996–4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027. PMID: 25999452.
15. van der Velden V.J.H., Panzer-Grümayer E.R., Cazzaniga G. et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007;21(4):706–13. DOI: 10.1038/sj.leu.2404535. PMID: 17287857.
16. Dworzak M.N., Gaipa G., Ratei R. et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(6):331–40. DOI: 10.1002/cyto.b.20430. PMID: 18548617.
17. Irwing J., Jesson J., Virgo P. et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870–4. DOI: 10.3324/haematol.2008.000414. PMID: 19377076.
18. Björklund E., Matinlauri I., Tierens A. et al. Quality control of flow cytometry data analysis for evaluation of minimal residual disease in bone marrow from acute leukemia patients during treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(6):406–15. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181a1c0e8. PMID: 19648789.
19. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;(4):19–27. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Rumyantsev A.G. Optimizing of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in Russia. *Pediatriya = Pediatrics* 2009;(4):19–27. (In Russ.)].
20. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Алейникова О.В. и др. Эффективность протокола ALL-MB-2002 у детей с острым лимфобластным лейкозом. *Терапевтический архив* 2010;(7):11–20. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Aleynikova O.V. et al. The efficacy of ALL-MB-2002 treatment protocol in children with acute lymphoblastic leukemia. *Tera- pevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archives* 2010;(7):11–20. (In Russ.)].
21. Литвинов Д.В., Карелин А.Ф., Романова К.И. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. *Доктор.Ру* 2015;(10):30–7. [Litvinov D.V., Karelin A.F., Romanova K.I. et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia treatment: current options and unresolved problems. *Doctor.Ru* 2015;(10):30–7. (In Russ.)].
22. Fehina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A. Abstr 2828.
23. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Иммунология* 2010;(6):299–304. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Immunophenotype aberrations useful for minimal residual disease monitoring by flow cytometry in CD10-positive B-predecessors acute lymphoblastic leukemia. *Immunologiya = Immunology* 2010;(6):299–304. (In Russ.)].
24. Мовчан Л.В. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов. *Онкогематология* 2012;(1):22–8. [Movchan L.V. Leukemia-associated immunophenotype in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2012;(1):22–8. (In Russ.)].
25. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Изменения иммунофенотипа опухолевых бластов при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-MB-2008. *Иммунология* 2010;(2):60–4. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Changes

in tumor immunophenotype by day 15 of induction therapy according ALL-MB-2008 protocol in children with CD10-positive acute lymphoblastic leukemia. *Immunologiya = Immunology* 2010;(2):60–4. (In Russ.).

26. Мовчан Л.В., Шман Т.В., Белевцев М.В. и др. Изменение иммунофенотипа лейкоэмических клеток на этапах индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза у предшественников В-лимфоцитов у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2011;(1):21–6. [Movchan L.V., Shman T.V., Belevtsev M.V. et al. Changing of leukemic cells immunophenotype during induction therapy in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics* 2011;(1):21–6. (In Russ.).]

27. Karachunskiy A., Herold R., von Stackelberg A. et al. Results of the first randomized multicentre trial on childhood acute lymphoblastic leukaemia in Russia. *Leukemia* 2008;22(6):1144–53. DOI: 10.1038/leu.2008.63. PMID: 18368070.

28. McKenna R. W., Washington L. T., Aquino D. B. et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001;98(8):2498–507. PMID: 11588048.

29. van Lochem E. G., van der Velden V. H., Wind H. K. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60(1):1–13. DOI: 10.1002/cyto.b.20008. PMID: 15221864.

30. Sędek Ł., Bulsa J., Sonsala A. et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? *Cytometry B Clin Cytom* 2014;86(5):329–39. DOI: 10.1002/cyto.b.21176. PMID: 24845957.

31. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухлевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология* 2016;(3):302–13. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Fechina L.G. et al. Acute leukemia: differences in immunophenotype of blast cells and their non-neoplastic counterparts in the bone marrow. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2016;(3):302–13. (In Russ.).]

32. Coustan-Smith E., Ribeiro R. C., Stow P. et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97–102. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0066. PMID: 16537802.

33. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Ограниченная возможность применения упрощенного подхода для определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. *Клиническая лабораторная диагностика* 2011;(3):25–9. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Limited possibility of simplified approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in children with B-predecessors acute lymphoblastic leukemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2011;(3):25–9. (In Russ.).]

34. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2012;(5):31–5. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Algorithm of minimal residual disease monitoring by flow cytometry in CD10-negative B-precursors acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostics in Pediatrics* 2012;(5):31–5. (In Russ.).]

35. Цаур Г.А., Попов А.М., Фечина Л.Г., Румянцев С.А. Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2016;(1):62–74. [Tsaur G.A., Popov A.M., Fechina L.G., Rumyantsev S.A. Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;(1):62–74. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-62-74.

36. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Особенности мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах методом проточной цитометрии у детей первого года жизни. *Детская онкология* 2008;(2):32–5. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Yu. et al. Monitoring of minimal residual disease by flow cytometry in infants with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Detskaya onkologiya = Pediatric Oncology* 2008;(2):32–5. (In Russ.).]

37. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Возможности применения NG2 для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей 1-го года жизни, больных острым лимфобластным лейкозом, ассоциированным с реаранжировками гена MLL. *Гематология и трансфузиология* 2009;(6):19–22. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Use of NG2 for minimum residual disease monitoring by flow cytometry in infants with MLL rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2009;(6):19–22. (In Russ.).]

38. Савва Н.Н., Красько О.В., Белевцев М.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ). *Онкогематология* 2009;(2):17–21. [Savva N.N., Kras'ko O. V., Belevtsev M.V. et al. The prognostic value of minimal residual disease for relapse-free survival in children with acute lymphoblastic leukemia treating according to ALL-MB-2002 protocol (univariate and multivariate analysis). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2009;(2):17–21. (In Russ.).]

39. Meleshko A. N., Savva N. N., Fedasenka U. U. et al. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk Res* 2011;35(10):1312–20. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.04.013. PMID: 21596436.

40. Мигаль Н.В., Белевцев М.В., Мовчан Л.В. и др. Прогностическое значение минимальной резидуальной болезни у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;(1):50–7. [Migal' N.V., Belevtsev M.V., Movchan L.V. et al. The prognostic value of minimal residual disease in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics* 2015;(1):50–7. (In Russ.).]

41. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Применение проточной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколам со сниженной интенсивностью. *Онкогематология* 2015;10(4):44–55. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Yu. et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia treated by regimens with reduced intensity. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(4):44–55. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-44-55.