

Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей

И.А. Новикова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Л.В. Мовчан⁴, Г.А. Цаур^{2,3}, М.В. Белевцев⁴, А.М. Попов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

³ГИАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

⁴ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»; Республика Беларусь, 223053 Минский р-н, Боровлянский сельсовет, дер. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Контакты: Александр Михайлович Попов uralcytometry@gmail.com

Введение. На сегодняшний день данные иммунофенотипирования используются для стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований по терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Необходимым условием эффективной диагностики методом проточной цитометрии является разработка единого подхода к подбору комбинаций антител, методике пробоподготовки, настройкам проточного цитометра и анализу данных. Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛЛ у детей диктует необходимость разработки единых алгоритмов цитометрической диагностики.

Цель исследования — разработка единого подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики ОЛЛ у детей.

Материалы и методы. В разработке и стандартизации подходов к цитометрическому определению минимальной остаточной болезни приняли участие 3 референсные лаборатории иммунофенотипирования группы «Москва—Берлин». Обсуждались последовательность этапов при окрашивании моноклональными антителами, выбор реагентов для иммунофенотипирования, алгоритмы настройки проточных цитометров.

Результаты. Был разработан и успешно внедрен стандартный протокол иммунофенотипирования ОЛЛ методом проточной цитометрии. Применение такого подхода позволяет получить очень высокую сопоставимость данных, получаемых в разных лабораториях. Эффективная интеграция в систему референсных лабораторий показывает высокую воспроизводимость разработанных алгоритмов диагностики ОЛЛ. Это позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по терапии ОЛЛ у детей.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, проточная цитометрия, стандартизация

Для цитирования: Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В. и др. Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. Онкогематология 2018;13(1):73–82.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-73-82

Russian-belarusian multicenter group standard guidelines for childhood acute lymphoblastic leukemia flow cytometric diagnostics

I.A. Novikova¹, T. Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, L. V. Movchan⁴, G.A. Tsaur^{2,3}, M. V. Belevtsev⁴, A.M. Popov¹

¹D. Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela St., GSP-7, 117198 Moscow, Russia;

²Pediatric Oncology/Hematology Center, Regional Children Hospital № 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., 620149 Yekaterinburg, Russia;

³Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., 620026 Yekaterinburg, Russia;

⁴Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology; 43 Frunzenskaya St., Borovlyani, 223053 Minsk region, Republic of Belarus

Background. Flow cytometry is one of the key technologies for acute lymphoblastic leukemia (ALL) diagnostics. Nevertheless lack of technological standards hampers implementation of immunophenotyping data in treatment protocols.

Objective: development of harmonized guidelines for flow cytometric diagnostics of childhood ALL.

Materials and methods. Three reference laboratories of the immunophenotyping group “Moscow—Berlin” took part in the development and standardization of approaches to the cytometric determination of the minimal residual disease. The sequence of steps for staining with monoclonal antibodies, selection of reagents for immunophenotyping, flow cytometer adjustment algorithms were discussed.

Results. We developed and implemented in multicenter setting the harmonized approach for immunophenotyping flow cytometric childhood ALL. Successful integration of this protocol in the multicenter group has shown good level of our approach reproducibility.

Conclusion. *These results will allow implementing diagnostic standards in stratification system of pediatric ALL treatment protocols of russian-belarusian multicenter group.*

Key words: *acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry, standardization*

For citation: *Novikova I., Verzhbitskaya T., Movchan L. et al. Russian-belarusian multicenter group standard guidelines for childhood acute lymphoblastic leukemia flow cytometric diagnostics. Onkogematologiya = Oncohematology 2018;13(1):73–82.*

Введение

Метод многоцветной проточной цитометрии является основным диагностическим инструментом, позволяющим определить иммунофенотип опухолевых клеток при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей и взрослых [1–3]. Диагностика острого лейкоза заключается в определении его линейной направленности (Т- или В-лимфобластный или миелоидный), установлении иммунологического варианта ОЛЛ и определении лейкозассоциированного иммунофенотипа [4], который необходим для дальнейшего мониторинга минимальной остаточной болезни.

В настоящее время для иммунологической классификации ОЛЛ используются система Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group of Immunological Markers for Leukemias, EGIL) [5] с учетом позднее внесенных изменений [6], а также классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [7, 8].

Несмотря на то, что иммунофенотипирование методом проточной цитометрии – важный метод диагностики ОЛЛ, несоответствия между различными существующими системами классификации, стандартами технологий и клиническими потребностями не всегда позволяют применять данный метод согласованно в разных исследовательских центрах. В связи с тем, что данные иммунофенотипирования используются для стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований по терапии ОЛЛ, необходим стандартный подход, включающий выбор комбинации антител, методику пробоподготовки, настройку проточного цитометра и анализ получаемых данных [9–11]. Хотя различными группами периодически публикуются примеры применения классификаций EGIL и ВОЗ [12–14], каких-либо общих подходов к проведению цитометрической диагностики ОЛЛ до настоящего времени не разработано [15]. В то же время при проведенной нами ранее внешней оценке качества диагностики ОЛЛ методом проточной цитометрии было обнаружено, что в лабораториях, проводящих иммунофенотипирование, существуют совершенно разные подходы к пробоподготовке, настройкам приборов, анализу и интерпретации полученных результатов [15, 16].

Чаще всего стандартизованные протоколы иммунофенотипирования разрабатываются в рамках крупных исследовательских групп по лечению ОЛЛ [17]. Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛЛ у детей

[18, 19] диктует необходимость разработки собственных стандартов цитометрической диагностики.

Цель исследования – разработка стандартного подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики ОЛЛ у детей в рамках российско-белорусской кооперативной группы протокола «Москва–Берлин».

Материалы и методы

В разработке и стандартизации подходов к иммунофенотипической диагностике ОЛЛ приняли участие 3 референсные лаборатории иммунофенотипирования группы «Москва–Берлин»: НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (Москва), ОДКБ № 1 (Екатеринбург) и РНПЦ ДОГ (Минск). В 2 лабораториях диагностика ОЛЛ проводилась на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson (BD), США) (2 лазера, 6 цветов, затем 3 лазера, 8 цветов в обоих случаях), в одной – на FC 500 и Navios (оба Beckman Coulter (BC), 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;
- участие в различных системах внешнего контроля качества;
- разработка стандартного операционного протокола (СОП) для проведения диагностического иммунофенотипирования ОЛЛ.

Обсуждение технологических аспектов, разработка общих подходов и оценка результатов работы проводились на встречах рабочей группы, созданной в рамках протокола «Москва–Берлин» (руководитель – проф. А.И. Карачунский). Обсуждались последовательность этапов при окрашивании моноклональными антителами (МкАТ), 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 FACS Diva 6.1 (BD), а также СХР и Kaluza 1.5 (обе BC). Вырабатывались рекомендации для последовательного выделения на точечных графиках опухолевых клеток и дальнейшей оценки их антигенного профиля.

Результаты исследования

Были разработаны следующие рекомендации по проведению иммунофенотипирования костного мозга (КМ) с целью диагностики ОЛЛ.

Исследуемый материал

Материалом для исследования при постановке диагноза ОЛЛ и оценке иммунофенотипа должен являться КМ. Периферическая кровь может быть использована в крайне редких случаях, при низкой клеточности костного мозга, плохом его качестве и наличии массивного бластоза в крови. Забор КМ в объеме не менее 2 мл осуществляется в вакуумную пробирку, где в качестве антикоагулянта использована этилендиаминтетрауксусная кислота. Предпочтительнее для исследования материал, полученный в самом начале пункции, что позволяет максимально избежать разведения КМ периферической кровью, которое может исказить результаты исследования. Все пробирки должны быть промаркированы – указана фамилия пациента, в направлении на иммунофенотипирование указаны Ф.И.О. пациента, возраст, дата, время забора материала, предполагаемый диагноз. Для обеспечения сохранности материал хранят и транспортируют при постоянной температуре 4 °С и доставляют в лабораторию не позднее 48 ч после забора. При обнаружении крупных сгустков, гемолиза или при более длительной транспортировке запрашивается повторный образец. Фильтрация КМ проводится при наличии хлопьев жира и мелких сгустков.

Подбор комбинации моноклональных антител осуществляется в соответствии с критериями EGIL (1995) для диагностики ОЛЛ [5], а для диагностики острого лейкоза со смешанным фенотипом – согласно рекомендациям ВОЗ [7, 8]. Многоцветный подход к окрашиванию является обязательным и основывается на наличии CD45 в каждой пробирке, маркеров Т- и В-лимфоидных и миелоидной линий для идентификации бластных и контрольных клеток.

Преимущества многоцветного подхода к иммунофенотипированию заключаются в следующем [17]:

- более точное гейтирование бластных клеток;
- возможность исследования небольших по размеру, а также гетерогенных популяций бластных клеток;
- возможность включения новых маркеров или их сочетаний, актуальных для более точной классификации и/или прогнозирования исхода заболевания.

К основным маркерам могут быть добавлены антителы, применяемые для мониторинга минимальной остаточной болезни (CD38, CD58, CD99, CD123), а также ассоциированные с прогностически важными генетическими абберациями (например, CD123 при гипердиплоидии или NG2 при перестройках с участием гена *KMT2A/MLL*).

Используемые антитела для диагностики ОЛЛ у детей представлены в таблице. Выбор клонов антител

и флуорохромов обычно проводится в соответствии с опытом лабораторий. Ключевые антитела, по которым происходит первичное выделение клеток (CD45, CD19, CD7), должны быть мечены флуорохромами с хорошим разделением интересующих популяций. При составлении панели антител учитывается не только наличие определенных детекторов флуоресценции у прибора, на котором выполняется исследование, но и то, насколько пары флуорохромов возможно использовать в 1 сочетании. Например, для PE-Cy5 и APC невозможно стабильно подобрать правильное значение цифровой компенсации, поскольку лазер 635 нм активирует не только APC, но и Cy5, находящийся в составе тандемного конъюгата.

Используемые антитела для проведения иммунофенотипирования методом проточной цитометрии при остром лимфобластном лейкозе у детей

Antibodies for immunophenotyping by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia

Используемые маркеры (комбинированные с CD45 в каждой пробирке)
Used markers (combined with CD45 in each tube)

В-линейные маркеры B-linear markers	iCD22, iCD79a, iIgM, CD10, CD19, CD20; CD22, Кappa, Lambda, IgM
Т-линейные/ NK-клеточные маркеры T-linear/NK-cells markers	iCD3, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD56, ТКР $\alpha\beta$, ТКР $\gamma\delta$
Миелоидные маркеры Myeloid markers	iLysozyme, iMPO, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41a, CD61, CD64, CD65
Маркеры клеток-предшественников Cell-precursor markers	CD117, CD34, CD123, CD133, CD99
Линейно неограниченные маркеры Linearly unlimited markers	CD38, CD45, CD58, HLA-DR, NG2

Пробоподготовка

Для иммунофенотипирования острых лейкозов используется только 1 пробирка с КМ. Если в лабораторию поступило несколько пробирок, взятых из разных точек пункции, выбирается одна из них. В случае, если данному пациенту выполнялось цитологическое исследование, выбор точки для иммунофенотипирования осуществляется на основании результатов этого исследования. При этом выбирается точка с максимальным количеством бластных клеток. В случае, если цитологическое исследование в референсной лаборатории не выполнялось, выбирается пробирка с наибольшей клеточностью по данным исследования на гематологическом анализаторе.

Количество клеток в окрашиваемом образце должно быть достаточным для цитометрического исследования,

но в то же время не быть избыточным, так как в этом случае возможен недостаток количества антител для окрашивания всех молекул антигена, что, в свою очередь, будет приводить к неадекватно слабой флуоресценции клеток. Также важно подчеркнуть, что при большом объеме окрашиваемого КМ или периферической крови может быть затруднен лизис эритроцитов стандартным объемом лизирующего реагента. При первичном иммунофенотипировании не рекомендуется анализировать более 50 000 ядросодержащих клеток. Для того чтобы быть уверенным, что после всех этапов пробоподготовки в анализируемом образце останется достаточное количество клеток, нужно брать такой объем материала, чтобы количество вносимых клеток не менее чем в 4 раза превышало целевое количество анализируемых клеток. Таким образом, окрашивание даже 200 000 клеток приведет к анализу необходимых 50 000. Однако для более быстрой записи данных проточным цитометром и более адекватного количественного соотношения антиген/антитело лучше окрашивать $1-2 \times 10^6$ ядросодержащих клеток. Превышать это количество не рекомендуется. Внесение материала для окрашивания производится только после подсчета клеточности на гематологическом анализаторе и произведения расчетов необходимого объема материала.

Количество вносимых МкАТ напрямую зависит от количества клеток в окрашиваемом материале. Оптимальный объем раствора антитела на 2×10^6 клеток определяется путем титрования. Антитела должны вноситься непосредственно из флакона. Заблаговременное приготовление смесей (коктейлей) антител нецелесообразно, так как может привести к распаду относительно нестабильных тандемных флуорохромов.

Лизис эритроцитов проводится согласно инструкции фирмы-производителя лизирующего реагента. Порядок пробоподготовки при мембранном окрашивании включает: инкубацию с МкАТ → лизис эритроцитов → отмывку фосфатно-солевым буфером (ФСБ). При комбинировании мембранного и внутриклеточного окрашивания пробоподготовка состоит из следующих этапов: инкубация с мембранными МкАТ → лизис эритроцитов → отмывка ФСБ → пермеабилитация → отмывка ФСБ → инкубация с цитоплазматическими МкАТ → отмывка ФСБ. Для пермеабилитации могут быть использованы различные современные двухкомпонентные реагенты, в которых есть 2 раствора: для фиксации клеток и собственно для пермеабилитации. При определении поверхностной или внутриклеточной экспрессии тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов перед окрашиванием проводят 3-кратную отмывку образца ФСБ.

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 лаборатории обязан как минимум еженедельно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к компенсации данных, поэтому ее настройка осуществляется одновременно с настройкой компенсации. Для настройки компенсации необходимо применять калибровочные материалы, производимые поставщиком проточного цитометра. При использовании реагентов различных производителей необходимо проводить настройку чувствительности ФЭУ и компенсации для конкретных комбинаций используемых антител.

Анализ данных

При анализе данных используют гистограммы, контурные и точечные графики, что позволяет более точно оценить экспрессию каждого маркера в отдельности и выявить все возможные коэкспрессии. Для точного выделения опухолевых клеток более предпочтительно использование точечных графиков, в то время как для оценки экспрессии каждого отдельного антигена более информативны гистограммы и контурные графики, поскольку они дают более полную информацию о распределении внутри опухолевой популяции по экспрессии антигена (рис. 1).

Последовательность действий при выделении опухолевых клеток представлена на рис. 2. На точечном графике прямого и бокового светорассеяния (forward vs side scatter, FSC/SSC) из анализа исключается дебрис (рис. 2а). Затем на графике, отображающем прямое светорассеяние в формате площади пика (FSC-A) и в формате высоты/ширины пика (FSC-H или FSC-W соответственно) выделяются синглеты (рис. 2б) и удаляются конгломераты клеток, способные давать завышенные значения флуоресценции. Опухолевые клетки выделяют на графике CD45/SSC (рис. 2в). Для исключения событий, попадающих в этот регион и не являющихся бластами (дебрис, лимфоциты, гранулоциты или моноциты), проводится дополнительное гейтирование клеток, выделенных по экспрессии CD45, на графике линейно-ассоциированный маркер/SSC (рис. 2г), если такой маркер есть в применяемой комбинации антител. В качестве линейно-ассоциированного антигена используют CD19, CD7 и CD33 для В-линейного

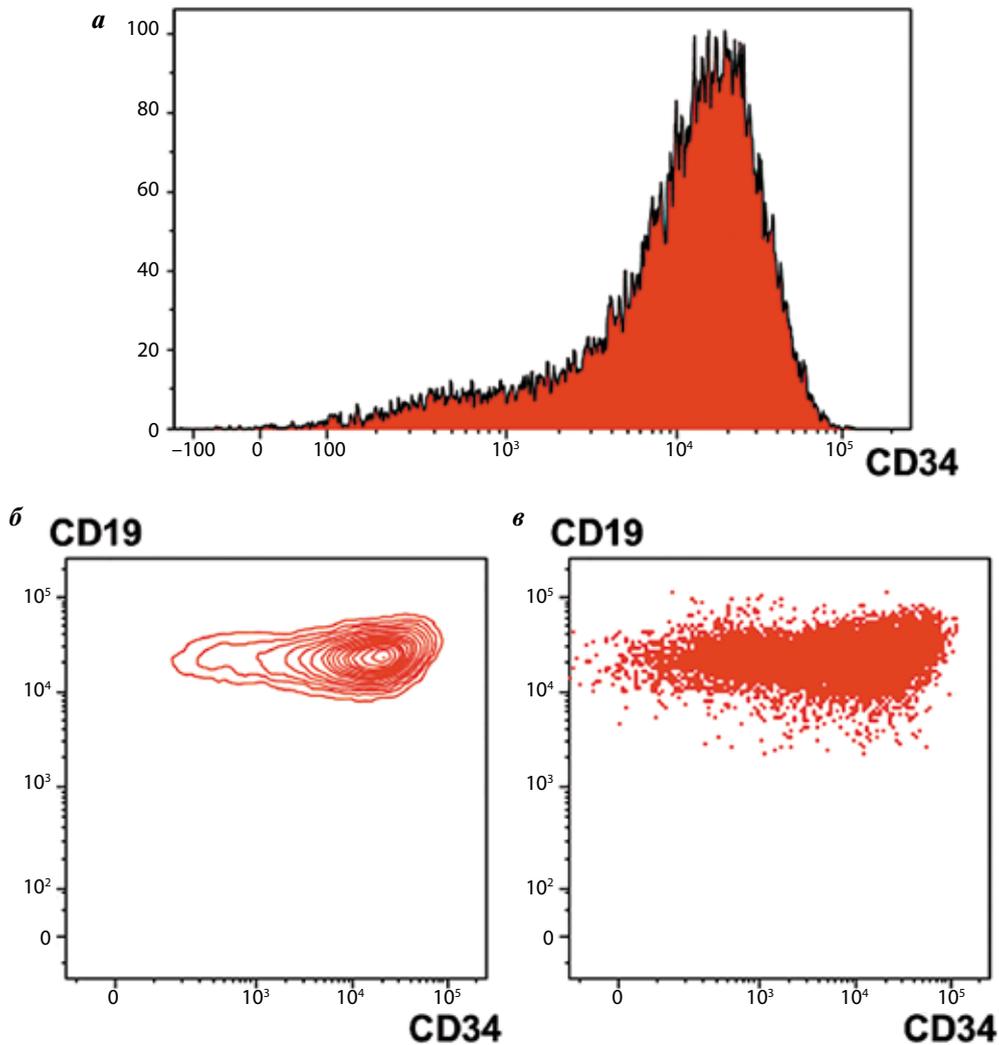


Рис. 1. Оценка экспрессии антигенов опухолевыми клетками на разных типах графиков. Гистограмма (а) и контурный график (б) дают больше информации о распределении клеток внутри опухолевой популяции по экспрессии CD34, чем точечный график (в)

Fig. 1. Evaluation of antigen expression by tumor cells on the different types of graphs. The histogram (a) and the contour graph (b) provide more information about cell distribution within the tumor population by CD34 expression than the dotted graph (c)

ОЛЛ, Т-линейного ОЛЛ и острого миелоидного лейкоза соответственно. Допустимо проводить гейтирование и в обратном порядке, т. е. сначала выделять клетки по линейно-ассоциированному антигену (рис. 2а), а потом уже среди этих клеток выделять blasts по низкой экспрессии CD45 и соответствующим значениям SSC (рис. 2б). Если возникают сложности в выделении blastов при помощи только указанных антигенов, для этой цели допустимо использование любых антигенов, входящих в используемую комбинацию, однако сниженная экспрессия CD45 всегда является основным критерием blastной популяции.

Применение изотипического контроля считается нецелесообразным, так как в каждом образце присутствуют клетки, представляющие собой как положительный, так и отрицательный контроль для антигенов, экспрессируемых blastами. Например, для определения экспрессии CD19 положительным контролем являются нормальные В-лимфоциты, практически

всегда присутствующие в образце, а отрицательным — Т-лимфоциты или гранулоциты, которые также почти всегда хотя бы в небольшом количестве присутствуют в исследуемом материале. Необходимо учитывать, что с повышением значения SSC может повышаться аутофлуоресценция клеток и по каналам флуоресценции. Поэтому в качестве отрицательного контроля, если есть такая возможность, предпочтительно использовать клетки, имеющие сходное значение SSC с исследуемой популяцией. Ширина пика отрицательной контрольной популяции не является постоянной величиной и зависит от конкретного антитела, используемого флуорохрома, настроек прибора и особенностей клеток данного пациента.

Популяция считается позитивной по какому-либо антигену, если более 20 % клеток при мембранном окрашивании или более 10 % клеток при внутриклеточном окрашивании находятся правее правого края контрольной популяции [5]. В то же время, если

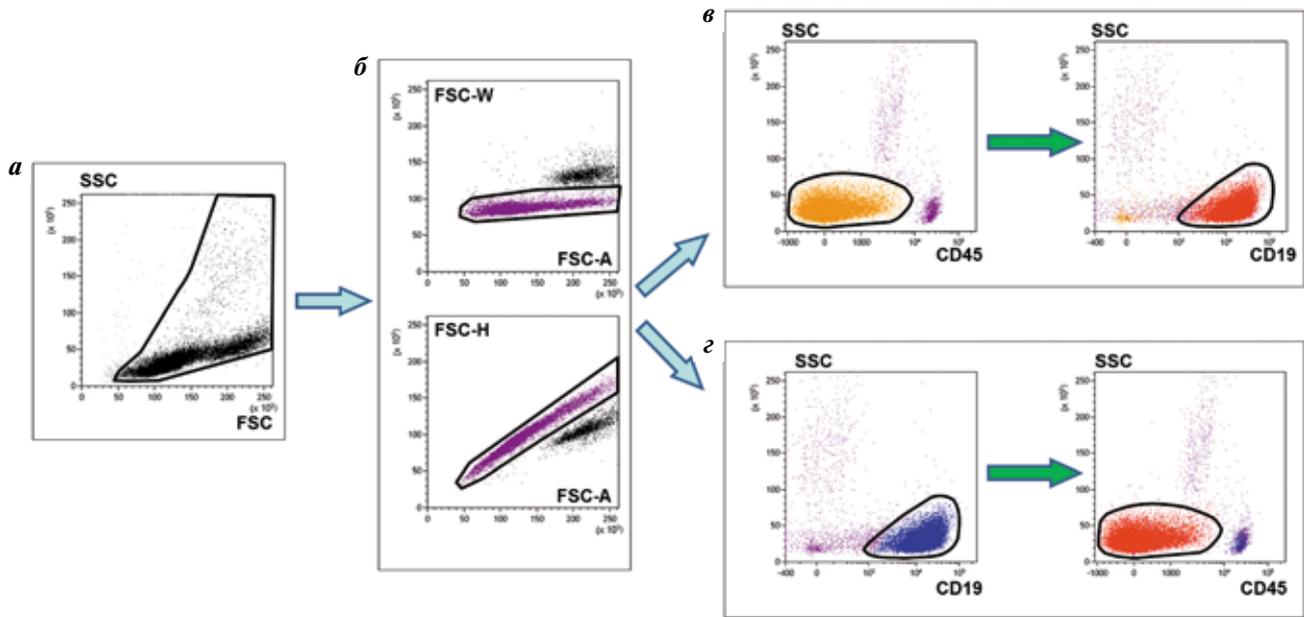


Рис. 2. Последовательность выделения опухолевых клеток для дальнейшей оценки иммунофенотипа: удаление из анализа разрушенных и мертвых клеток (а), исключение конгломератов клеток (б) и выделение бластных клеток (в, г). Опухолевая популяция показана красным. Пояснения в тексте
Fig. 2. Sequence of tumor cells isolation for further immunophenotype evaluation: removal of destroyed and dead cells (a), exclusion of cells conglomerates (б) and isolation of blast cells (в, г). Tumor population is shown in red. Explanations in the text

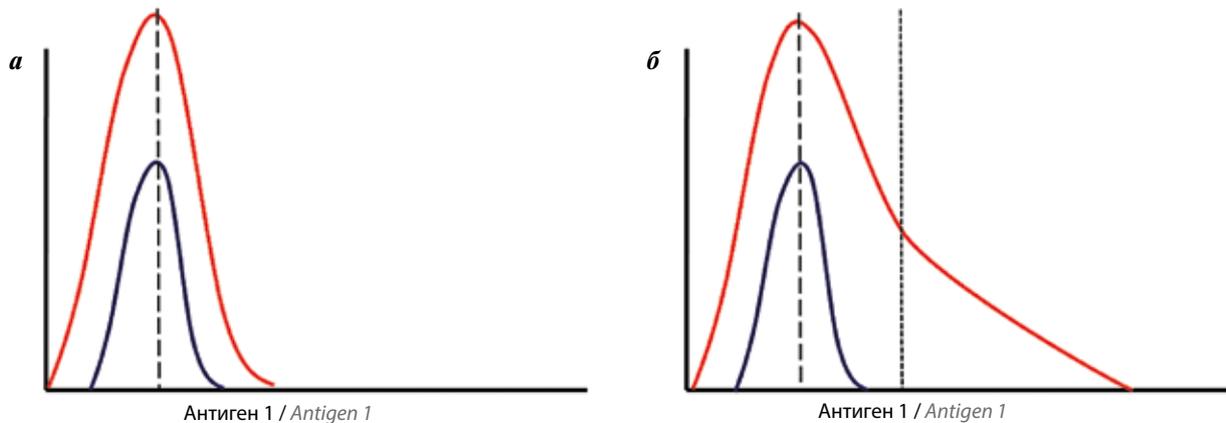


Рис. 3. Оценка экспрессии антигенов при большей вариации аутофлуоресценции опухолевой популяции (красная кривая) по сравнению с контрольными клетками (синяя кривая): отрицательный результат (а), и положительный на части клеток (б). Пояснения в тексте
Fig. 3. Evaluation of antigens expression with a greater autofluorescence variation of tumor population (red curve), compared to the control cells (blue curve): negative result (a), and positive on part of the cells (б). Explanations in the text

центры исследуемой и контрольной популяций совпадают, а флуоресценция в исследуемой популяции распределена нормально (кривая Гаусса на гистограмме, левый край левее левого края контрольной популяции настолько же, насколько правый край выступает за правый край популяции контрольных клеток), то популяция считается негативной (рис. 3а). Если центры исследуемой и контрольной популяций совпадают, опухолевая популяция может считаться позитивной только при ненормальном распределении флуоресценции внутри популяции и размере «плеча» более 20 или 10 % соответственно (рис. 3б).

Правой границей «негативной зоны» при определении экспрессии CD45 является левый край популяции нормальных гранулоцитов (рис. 4). Экспрессия

CD45 определяется как положительная, если выявляется существенное перекрытие (более 20 %) пиков опухолевой популяции и нормальных гранулоцитов [17].

Интерпретация данных

В-линейный ОЛЛ диагностируется в том случае, когда опухолевые бласты экспрессируют CD19, iCD79a, CD22. При этом они также могут экспрессировать другие В-линейные маркеры, такие как CD10, CD20, мембранные или цитоплазматические легкие или тяжелые (μ) цепи иммуноглобулинов. Для постановки диагноза достаточным является наличие экспрессии одного из линейно-специфических маркеров, если отсутствуют специфические маркеры других линий. При В-линейных ОЛЛ возможна коэкспрессия любых

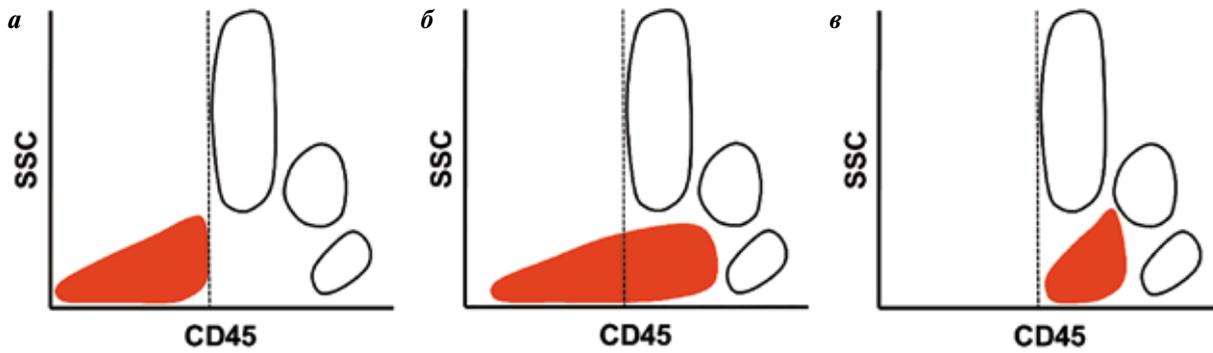


Рис. 4. Оценка экспрессии CD45 опухолевыми клетками (показаны красным): примеры расположения популяции при CD45-негативном (а), частичной экспрессии CD45 (б) и CD45-позитивном ОЛЛ (в)
 Fig. 4. Evaluation of CD45 expression by tumor cells (shown in red): examples population location with CD45-negative (a), CD45 partial expression (б) and CD45-positive ALL (в)

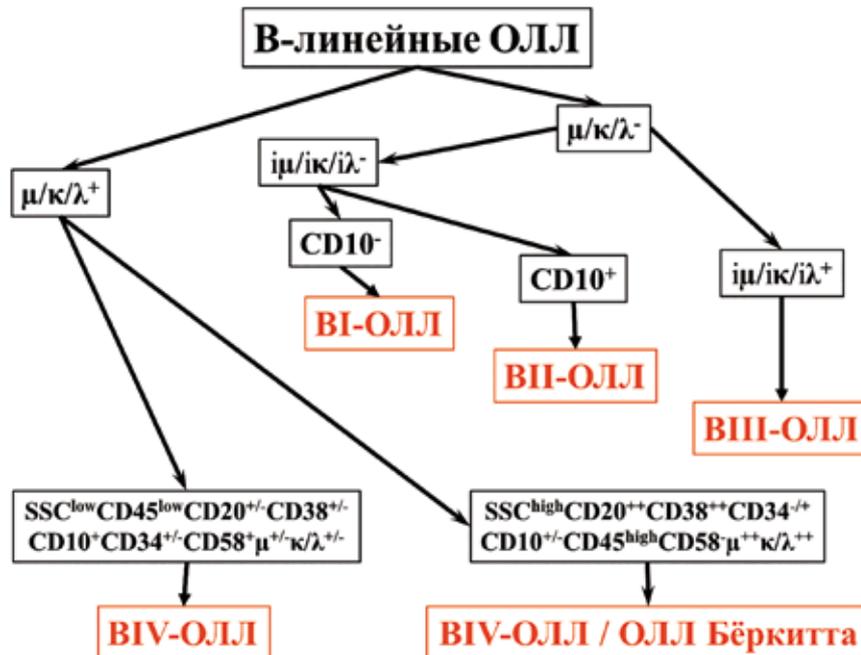


Рис. 5. Алгоритм дифференциальной диагностики В-линейных ОЛЛ согласно классификации EGIL [5] с учетом гетерогенности варианта BIV [22]
 Fig. 5. The algorithm of B-linear ALL differential diagnosis, according to EGIL classification [5], taking into account the BIV-variant heterogeneity [22]

миелоидных антигенов (CD13, CD33, CD15, CD65, CD117) и их сочетаний, что не отменяет диагноз В-линейного ОЛЛ.

Т-линейный ОЛЛ диагностируется в том случае, если бласты экспрессируют CD7, а также цитоплазматический CD3. Эти клетки также могут экспрессировать CD2, CD5, CD3, CD1a, Т-клеточные рецепторы. Также при Т-ОЛЛ могут экспрессироваться В-линейные маркеры, такие как iCD79a и CD10, но не CD19 или CD22.

Острый миелоидный лейкоз диагностируется в том случае, если бласты экспрессируют миелоидные маркеры (CD13, CD33, CD15, CD65, CD117, iMPO) и не экспрессируют специфические лимфоидные.

Острый лейкоз со смешанным фенотипом диагностируется в тех случаях, когда бластные клетки экспрессируют одновременно специфические маркеры миелоидной и одной из лимфоидных линий [7, 8] либо

определяются 2 опухолевые популяции с разной линейной принадлежностью.

Среди как В-, так и Т-линейных ОЛЛ выделяют несколько вариантов, различающихся степенью «зрелости» опухолевых клеток (BI–BIV и TI–TIV) [5], а также отдельную группу ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ETP-ОЛЛ) [20, 21].

Для В-линейных ОЛЛ степень зрелости определяется по наличию CD10, а также мембранных и цитоплазматических легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов [5]. Остальные маркеры, такие как CD20, CD34, TdT, CD58, имеют лишь вспомогательное значение и не являются основой для постановки диагноза. Алгоритм диагностики В-линейных ОЛЛ представлен на рис. 5. Варианты BI, BII и BIII относятся к ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ).

В части случаев возможна экспрессия iIgM при отсутствии CD10, что не отменяет диагноза BIII-ОЛЛ.

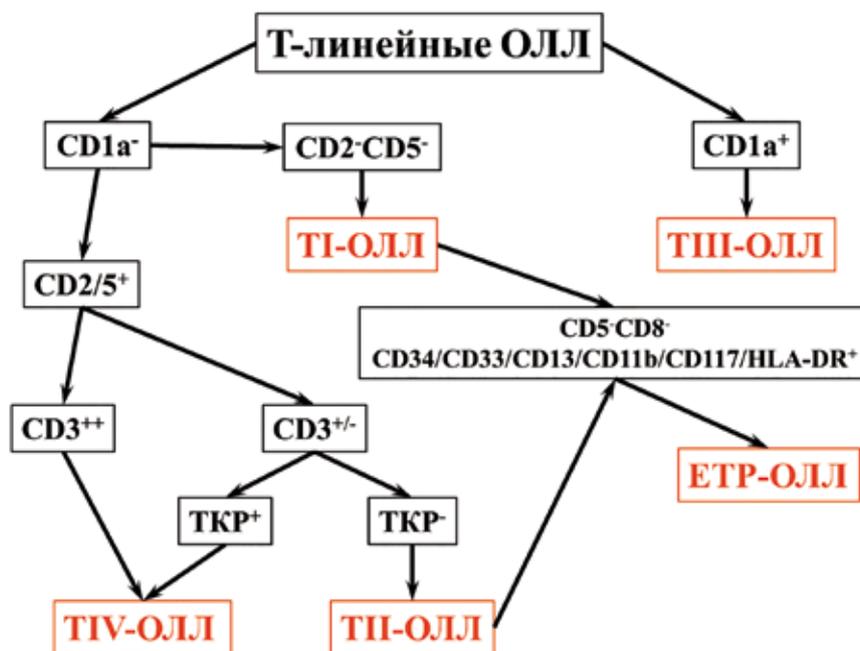


Рис. 6. Алгоритм дифференциальной диагностики Т-линейных ОЛЛ согласно классификации EGIL [5] с учетом отдельной группы ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ETP-ОЛЛ) [20, 21]

Fig. 6. The algorithm of T-linear ALL differential diagnosis, according to the EGIL classification [5], taking into account a separate group of ALL from early T-linear precursors (ETP-ALL) [20, 21]

Если экспрессия CD10 при ВП-ОЛЛ составляет более 20 %, но менее 50 %, то такие случаи следует обозначать как VI/ВП-ОЛЛ. Если внутриклеточная экспрессия IgM обнаруживается только в 1 субпопуляции бластов (10–50 %), заключение может быть сформулировано как ВП/III. Некоторые случаи при частичной экспрессии iIgM могут быть классифицированы как VI/III. Редкие случаи ВП-ОЛЛ с поверхностной экспрессией легких цепей иммуноглобулина (на поверхности или в цитоплазме) не имеют других признаков лимфомы/лейкоза Беркитта (морфология L3 по классификации FAB, перестройки гена *MYC*, высокая скорость пролиферации) [17, 22]. Такие случаи относятся к ВIV [17], но включают в общепринятое лечение ОЛЛ. Зачастую у таких пациентов выявляются перестройки гена *KMT2A* [17, 22].

При Т-линейных ОЛЛ степень зрелости определяется по наличию CD2, CD5, CD1a, CD4 или CD8, мембранному CD3, а также Т-клеточным рецепторам (ТКР) [5]. Алгоритм диагностики Т-линейных ОЛЛ представлен на рис. 6. Экспрессия CD3 на поверхности клеток встречается уже на достаточно ранних стадиях зрелости, а не только на стадии ТIV [17]. Экспрессия CD1a независимо от других маркеров позволяет поставить диагноз ТIII-ОЛЛ [5]. При частичной экспрессии CD1a при ТIII-ОЛЛ заключение должно быть сформулировано как ТII/ТIII-ОЛЛ.

При ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ETP-ОЛЛ) бласты экспрессируют CD3 внутриклеточно, также для них характерны низкая (менее 75 %) экспрессия CD5, отсутствие экспрессии CD1a и CD8, экспрессия хотя бы одного из миелоидных

антигенов (CD13, CD33, CD11b, CD117) или маркеров клеток-предшественников [20, 21].

Формат заключения

При формулировании итогового заключения необходимо придерживаться общепринятой терминологии согласно критериям диагностики того или иного варианта ОЛЛ. В заключении отражается полная картина иммунофенотипирования, в которую входят идентификационные данные о больном, данные об экспрессии отдельных маркеров, характеристика преобладающего ростка, наличие и описание дополнительных опухолевых популяций, а также процентное содержание бластов в образце.

Имунофенотип ОЛЛ определяется, когда популяцию бластов удастся четко отличить от нормальных клеток, независимо от численного порогового процентного содержания бластов. Учитываются фенотипически aberrantные популяции, дающие основание предполагать ОЛЛ, даже в случаях, когда процент бластов слишком мал для формальной постановки диагноза лейкоза.

В заключении указывается вариант острого лейкоза, а также коэкспрессия маркеров других линий (если есть).

Заключение

Таким образом, разработанный и представленный в данной работе стандартизованный подход к иммунофенотипированию ОЛЛ методом проточной цитометрии позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в системе референсных лабораторий в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по лечению ОЛЛ у детей.

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

- 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.
- 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):1165–1174. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378943. PMID: 22730540
- Faderl S., O'Brien S., Pui C.H. et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 2010;116(5):1165–76. DOI: 10.1002/cncr.24862. PMID: 20101737.
- Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):302–13. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Fechina L.G. et al. Acute leukemias: Immunophenotyping differences between blast cells and their nonneoplastic analogues in bone marrow. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2016;9(3):302–13. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-302-313.
- Bene M.C., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6. PMID: 7564526.
- Bene M.C., Bernier M., Casasnovas R.O. et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998;92(2):596–9. PMID: 9657760.
- Vardiman J., Thiele J., Arber D. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937–51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262. PMID: 17357394.
- Arber D., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544. PMID: 27069254.
- Wood B.L., Arroz M., Barnett D. et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(Suppl. 1):S14–22. DOI: 10.1002/cyto.b.20363. PMID: 17803189.
- Van Dongen J.J.M., Orfao A. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* 2012;26(9):1899–907. DOI: 10.1038/leu.2012.121. PMID: 22948488.
- Kalina T., Flores-Montero J., Lecrevisse Q. et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010–2013) quality assurance rounds. *Cytometry A* 2015;87(2):145–56. DOI: 10.1002/cyto.a.22581. PMID: 25345353.
- Зуева Е.Е., Афанасьев Б.В., Тотолян А.А. Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика* 2004; (7):25–32. [Zueva E.E., Afanasiev B.V., Totolyan A.A. Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukemia (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics* 2004;(7):25–32 (In Russ.)].
- Луговская С.А., Почтарь М.Е., Туписин Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. Тверь: ООО Издательство «Триада», 2005. 168 с. [Lugovskaya S.A., Pochtar M.E., Tupitsin N.N. Immunophenotyping in the hemoblastosis diagnosis. Tver: Triada, 2005. 186 p. (In Russ.)].
- Антипова А.С., Баранова О.Ю., Френкель М.А. и др. Острые лейкозы со смешанным фенотипом: клинико-лабораторные особенности и прогноз. *Клиническая онкогематология* 2015; 8(2):136–50. [Antipova A.S., Baranova O.Yu., Frenkel M.A. et al. Mixed Phenotype Acute Leukemia: Clinical and Laboratory Features, and Prognosis. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2015;8(2):136–50 (In Russ.)].
- Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Зуева Е.Е. и др. Результаты внешнего контроля качества диагностики острого лимфобластного лейкоза методом проточной цитометрии. *Онкогематология* 2016;11(3):68–75. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-3-68-75. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Zueva E.E. et al. Results of external quality control study in flow cytometric acute lymphoblastic leukemia diagnostics. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(3):68–75 (In Russ.)].
- Попов А.М., Лагойко С.Н., Румянцев Ю.В. и др. Проблемы иммунофенотипирования в России: опыт работы референс-центра кооперированной клинической группы «Москва–Берлин». *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;14(1):58–61. [Popov A.M., Lagoiko S.N., Roumiantseva J.V. et al. Problems of flow cytometry immunophenotyping in Russia: Experience gained by the Reference Center of Moscow – Berlin Cooperative Clinical Group. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015;14(1):58–61 (In Russ.)].
- Dworzak M., Buldini B., Gaipa G. et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytometry* 2018;94(1):82–93. DOI: 10.1002/cyto.b.21518. PMID: 28187514.
- Fechina L., Shorikov E., Tsaug 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.
- Румянцев Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;87(4):19–27. [Roumiantseva J.V., Karachunskiy A.I., Rummyantsev A.G. Optimization of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy in Russia. *Pediatriya = Pediatrics* 2009;87(4):19–27. (In Russ.)].
- Coustan-Smith E., Mullighan C.G., Onciu M. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009;10:147–156. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70314-0. PMID: 19147408.
- Бойченко Э.Г., Попов А.М., Макарова Т.А. и др. Острый лимфобластный лейкоз из ранних предшественников Т-клеток (обзор литературы и собственные клинические наблюдения). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;14(1):38–45. [Boychenko E.G., Popov A.M., Makarova T.A. et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (Review of literature and clinical case reports). *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015;14(1):38–45 (In Russ.)].
- Дёмина И.А., Вержбицкая Т.Ю., Кашпор С.А. и др. Гетерогенность В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (BIV-иммуновариант) у детей. *Онкогематология* 2017;12(4):34–40. [Demina I.A., Verzhbitskaya T.Yu., Kashpor S.A. et al. Heterogeneity of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia (EGIL subtype BIV). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2017;12(4):34–40 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-34-40.

Вклад авторов

Новикова И.А.: концепция, дизайн и написание статьи;
Вержбицкая Т.Ю.: анализ результатов иммунофенотипирования, написание статьи;
Мовчан Л.В.: анализ результатов иммунофенотипирования, написание статьи;
Цаур Г.А.: концепция и дизайн;
Белевцев М.В.: концепция и дизайн;
Попов А.М.: концепция, дизайн исследования, написание статьи, правка статьи.

Authors' contributions

Novikova I.A.: concept, design and paper text writing;
Verzhbitskaya T.Yu.: flow cytometry data analysis, paper text writing;
Movchan L.V.: flow cytometry data analysis, paper text writing;
Tsaur G.A.: paper concept and design;
Belevtsev M.V.: paper concept and design;
Popov A.M.: study design, paper concept, paper text writing and editing.

ORCID авторов

И.А. Новикова: <https://orcid.org/0000-0001-6689-5861>
Т.Ю. Вержбицкая: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>
Л.В. Мовчан: <https://orcid.org/0000-0002-0441-0109>
Г.А. Цаур: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>
М.В. Белевцев: <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>
А.М. Попов: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

ORCID of authors

I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0001-6689-5861>
T.Yu. Verzhbitskaya: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>
L.V. Movchan: <https://orcid.org/0000-0002-0441-0109>
G.A. Tsaur: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>
M.V. Belevtsev: <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>
A.M. Popov: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 15.01.2018. **Принята к публикации:** 09.03.2018

Article received: 15.01.2018. **Accepted for publication:** 09.03.2018