

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-175-184

Рекомендации по определению минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при остром В-лимфобластном лейкозе в условиях применения CD19-направленной терапии

Е.В. Михайлова, О.И. Илларионова, М.А. Масчан, Г.А. Новичкова, А.И. Карачунский, А.М. Попов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Многоцветная проточная цитометрия широко используется в современной лабораторной практике для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеточных предшественников (ВП-ОЛЛ). Активное внедрение в лечебную практику таргетных препаратов, приводя к частичной или полной потере CD19 на поверхности опухолевых клеток, существенно осложняет мониторинг МОБ. В данной работе представлен рекомендованный подход к поиску МОБ при ВП-ОЛЛ после таргетной терапии. Данный подход учитывает возможную потерю основного таргетируемого антигена CD19, изменения в антигенном профиле опухоли и особенности нормальных клеточных популяций костного мозга при применении иммунотерапии. Разработанная панель антител и алгоритм анализа позволяют проводить мониторинг результатов терапии с высокой эффективностью, не уступающей значительно менее воспроизводимым и более дорогостоящим молекулярным методам.

Ключевые слова: острый В-лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, CD19-направленная терапия

Михайлова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (2): 175–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-175-184

Guidelines for the flow cytometric minimal residual disease monitoring in B-lineage acute lymphoblastic leukemia after CD19-directed immunotherapy

E.V. Mikhailova, O.I. Illarionova, M.A. Maschan, G.A. Novichkova, A.I. Karachunskiy, A.M. Popov

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Multicolor flow cytometry is now routinely used in laboratory practice for the minimal residual disease (MRD) monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Wide application of CD19-directed immunotherapy leads to frequent loss of CD19 expression, that hampers significantly the flow cytometric MRD detection methodology. We developed an antibody panel and data analysis algorithm for multicolor flow cytometry, which is a reliable method for MRD detection in patients with BCP-ALL treated with CD19-directed therapy. We recommend a single-tube 11-color panel for MRD detection, which is adapted for the case of possible CD19 loss. Based on patterns of antigen expression changes and the relative expansion of normal CD19-negative BCPs, guidelines for multicolored flow cytometry data analysis and interpretation are established. The recommended approach is reliable tool for therapy response monitoring displaying the same effectiveness with the more laborious and costly molecular techniques.

Key words: acute B-lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, CD19-directed therapy

Mikhailova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (2): 175–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-175-184

Многоцветная проточная цитометрия (МПЦ) широко используется в современной лабораторной практике для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) из В-клеточных предшественников (ВП-ОЛЛ) [1–3]. К преимуществам МПЦ относятся сравнительно невысокая стоимость исследования и быстрота получения

результата, возможность подсчета количества опухолевых клеток в образце, а также комплексной оценки клеточного состава костного мозга (КМ). Кроме того, проточная цитометрия позволяет определять уровень экспрессии на опухолевых клетках потенциальных мишеней для таргетного терапевтического воздействия (CD19, CD22, CD38, CD20 и др.).

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 06.04.2023

Принята к печати 27.04.2023

Контактная информация:

Михайлова Екатерина Валерьевна, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: katmikhailova1805@gmail.com

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 06.04.2023

Accepted 27.04.2023

Correspondence:

Ekaterina V. Mikhailova, MD, Leukemia Immunophenotyping Laboratory of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: katmikhailova1805@gmail.com

Методика цитометрического определения МОБ при ВП-ОЛЛ достаточно хорошо описана и гармонизована в рамках различных исследовательских групп [4–8]. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей описаны ранее [9].

В основе стандартного подхода к определению МОБ методом МПЦ лежит выявление опухолевых клеток в пуле всех CD19-позитивных клеток КМ [7, 9]. По этой причине активное внедрение в лечебную практику таргетных препаратов к CD19 (блинату-момаб, Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T)) при ВП-ОЛЛ является источником трудностей при мониторинге МОБ методом МПЦ. Данный тип терапии способен не только спровоцировать частичную или полную потерю CD19 с поверхности опухолевых клеток [10–14], но также привести к изменению экспрессии других маркеров, используемых в классических алгоритмах определения МОБ [13, 14], и даже стать причиной смены линейной принадлежности лейкоэмических клеток [15–18]. Соответственно, возникает необходимость адаптации панелей антител и алгоритмов анализа ввиду невозможности использования CD19-ориентированного подхода к поиску опухолевых клеток после таргетного воздействия.

В данной работе представлен рекомендованный подход к поиску МОБ при ВП-ОЛЛ после таргетной терапии.

Исследуемый материал, особенности взятия и транспортировки

Материалом для определения МОБ при ВП-ОЛЛ после таргетной терапии, как и в случае всех исследований по мониторингу МОБ при острых лейкозах, должен являться КМ. Правила взятия и транспортировки биоматериала также едины для всех исследований по определению МОБ методом МПЦ. Взятие КМ в объеме не менее 2 мл осуществляется в пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Предпочтительным для исследования является материал, полученный в самом начале пункции, что позволяет максимально избежать разведения КМ периферической кровью, которое может исказить результаты исследования. Все пробирки должны быть промаркированы фамилией и инициалами пациента, равно как и датой взятия материала, а в направлении на определение МОБ указываются фамилия, имя и отчество пациента, возраст, дата, время взятия материала, вариант ОЛЛ, название протокола терапии и этап лечения, дата трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (если она проводилась), тип применяемой иммунотерапии и даты ее проведения (эти данные влияют на способ проведения исследования и интерпретацию его результатов), контактные данные врача,

назначившего исследование. Для обеспечения сохранности материал предпочтительно хранить и транспортировать при постоянной температуре 4°C и доставлять в лабораторию не позднее 48 ч после взятия. При наличии видимых сгустков, гемолиза или при факте длительного хранения запрашивается повторный образец. При нарушении маркировки пробирок (несоответствие фамилии направлению, отсутствие маркировки) материал утилизируется, также запрашивается повторный образец. Фильтрация КМ проводится при наличии включений жира и мелких сгустков.

При существенном нарушении правил взятия и транспортировки материала (неверная маркировка, наличие сгустков и гемолиза в образце, длительная доставка в лабораторию) полученный образец утилизируется и запрашивается повторно.

Используемая панель моноклональных антител

Для определения МОБ при ВП-ОЛЛ после CD19-направленной иммунотерапии критически важным является многоцветный подход к окрашиванию образцов, так как панель моноклональных антител (МкАТ), используемая в таких случаях, должна быть шире, чем для мониторинга МОБ в условиях «классических» методов терапии ВП-ОЛЛ. Помимо стандартных маркеров CD19, CD10, CD34, CD20, CD38, CD45, CD58, используемых для определения МОБ российско-белорусской кооперативной группой по иммунофенотипированию острых лейкозов в рамках протоколов группы «Москва–Берлин» [9], для детекции остаточных опухолевых клеток после иммунотерапии в панель должны быть включены также МкАТ к CD22, CD24 и цитоплазматическому CD79a (iCD79a) [19–21]. Ранние В-линейные маркеры CD22, iCD79a, CD24, CD10 (рисунки 1) служат в алгоритме в качестве замены CD19 для выделения региона В-клеток на точечных графиках, внутри которого далее ведется поиск опухолевой популяции. Для поиска опухолевых blastов только среди ядродержащих клеток (ЯСК) рекомендуется использовать ДНК-тропные красители (SYTO16 – канал FITC, SYTO41 – канал PacificBlue/BV421 проточного цитометра), позволяющие разделить на точечных графиках ЯСК и случайно зафиксированные цитометром события [9].

В связи с использованием большого набора меченых МкАТ критически важным является подбор флуорохромов к каждому маркеру в отдельности. МкАТ к антигенам, на основании уровня экспрессии которых происходит выделение региона для поиска МОБ (CD22, CD79a, CD19, CD10), должны быть мечены яркими флуорохромами с хорошим разделением позитивного и негативного сигналов флуоресценции (PE, APC, PE-CF594/ECD, BV700, BV515 и др.).

Для МкАТ к антигенам, которые экспрессируются разными клетками КМ в широком диапазоне значений (CD38, CD45, CD24), предпочтительно использовать флуорохромы с промежуточной интенсивностью флуоресценции (FITC, APC-Cy7/APC-Alexa750, BV510, PerCP) для наилучшего разделения границ популяций среди всех позитивных по антигену клеток [9].

В качестве примера в *таблице 1* приведена панель МкАТ, которая используется для мониторинга МОБ при ВП-ОЛЛ после CD19-направленной терапии в лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева [22]. Допускается использование как стандартных концентратов меченых МкАТ, которые добавляются в пробирку по отдельности, так и готовых панелей в виде фабричных пробирок, содержащих лиофилизированные МкАТ [23]. Несомненным преимуществом таких готовых к использованию пробирок является сведение к минимуму ошибок при пробоподготовке образца и возможность стандартизации методики.

Пробоподготовка

Пробоподготовка в целом повторяет методику, используемую для диагностического иммунофенотипирования [24] и мониторинга МОБ в условиях стандартной химиотерапии [9] с учетом необходимости финального анализа не менее 100 000 клеток (предпочтительно 1 000 000). Отличительной особенностью методики определения МОБ при ВП-ОЛЛ после CD19-направленной терапии [22] является использование в панели МкАТ к iCD79a [22, 25]. В связи с этим появляется необходимость использовать дополнительные этапы: фиксацию клеток после проведения инкубации образца с МкАТ к поверхностным антигенам и пермеабелизацию с добавлением CD79a для проведения процедуры внутриклеточного окрашивания. Данные процедуры должны производиться в соответствии с инструкциями фирм-производителей используемых реагентов. В связи с наличием этапа внутриклеточного окрашивания, который сопряжен с дополнительной потерей некоторого количества клеток в процессе данной процедуры, рекомендуется окрашивать большее количество клеток, чем

Рисунок 1

Изменение экспрессии антигенов при развитии В-лимфоцитов

Зеленые круги показывают яркую экспрессию антигена, светло-зеленые – слабую экспрессию. Ярко экспрессируемые на каждой стадии созревания основные В-линейные антигены показаны красным. ОЛП – общий лимфоидный предшественник; ВП – нормальные ВП; i – цитоплазматическая экспрессия антигена; slg – мембранная экспрессия иммуноглобулина

Figure 1

Changes of antigens expression during B-lineage maturation

Green circles indicate bright antigens expression, while light green ones – dim expression. Main B-lineage antigens that are brightly expressed on the each stage of development are shown in red. CLP – common lymphoid progenitor; BCP – B-cell precursors; i – intracytoplasmic staining; slg – surface immunoglobulin expression

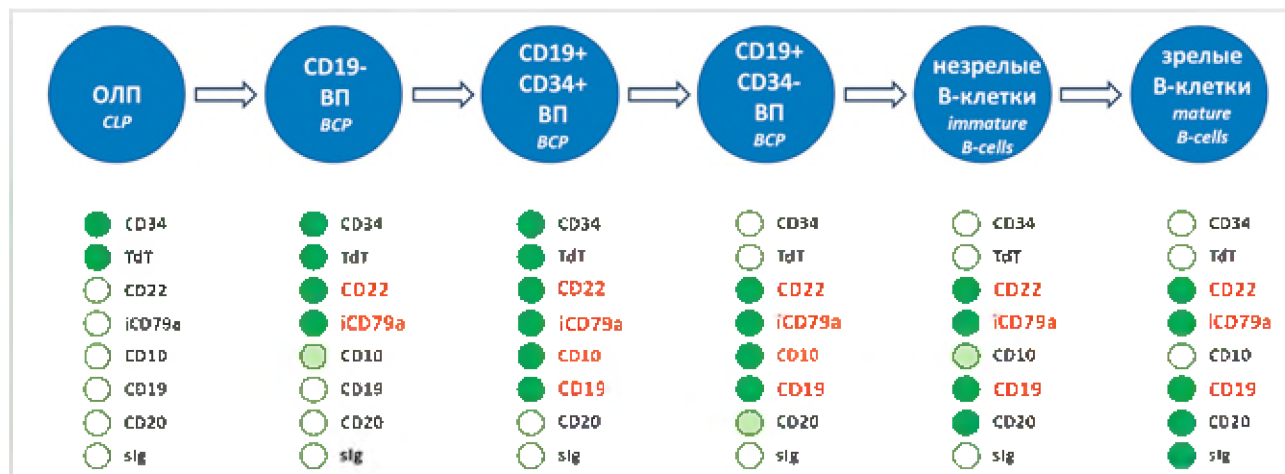


Таблица 1

Одиннадцатичетная панель антител для определения МОБ методом МПЦ при ВП-ОЛЛ после CD19-направленной иммунотерапии с информацией о клонах и флуоресцентных метках

Table 1

Eleven-color antibodies panel for minimal residual disease (MRD) monitoring by multicolored flow cytometry in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) patient after CD19-directed therapy with information about clones and fluorochromes

Показатель Parameter	Антитела Antibodies										
	FITC	PE	PE-CF594	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	A700	APC-Cy7	SYTO 41	BV510	BV768
МкАТ Monoclonal AB	CD58	CD22	CD10	CD20	CD19	iCD79a	CD34	CD45		CD38	CD24
Клон Clone	1C3 (AICD58.6)	S-HCL-1	HI10a	L27	SJ25C1	HM47	8G12	2D1		HIT2	ML5

это требуется для стандартной схемы мониторинга МОБ, т. е. приблизительно в 4–5 раз больше количества клеток, которое планируется включить в анализ.

Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используемого проточного цитометра. Рекомендации по настройке отдельных компонентов прибора ранее сформулированы и подробно описаны российско-белорусской группой по диагностике острых лейкозов [24].

Анализ и интерпретация данных

Общая схема поиска опухолевых клеток на точечных графиках с использованием описанной выше панели антител представлена на *рисунке 2*. Ключевым отличием анализа цитометрических данных при определении МОБ при ВП-ОЛЛ после таргетной терапии от мониторинга при стандартных схемах лечения является способ выделения В-клеточного региона на точечных графиках, среди клеток которого и производится поиск опухолевых клеток. Ввиду невозможности использования для выделения В-клеток экспрессии CD19 (может утрачиваться в процессе терапии) основной альтернативой было выбрано сочетание экспрессии маркеров CD22 и iCD79a [19–21]. В зависимости от экспрессии данных маркеров опухолевыми клетками до начала проведения таргетной терапии предлагается использовать либо последовательное выделение позитивных по данным маркерам регионов (при яркой экспрессии CD22 и iCD79) (*рисунок 2*, последовательность выделена красными стрелками), либо применять для выделения один из них (при гетерогенной экспрессии или ее отсутствии одного из маркеров) (*рисунок 2*, последовательность выделена синими стрелками). Если оба маркера плохо экспрессировались опухолевыми клетками перед проведением таргетной терапии, для выделения В-клеточного региона могут быть использованы маркеры CD10 или CD24

(*рисунок 2*, последовательность выделена черными стрелками). Следует отметить, что для 80% детей с ВП-ОЛЛ может быть использовано последовательное выделение В-клеток по CD22 и iCD79a ввиду яркой и гомогенной экспрессии обоих антигенов на клетках опухоли в подавляющем большинстве случаев [19].

Поиск опухолевых клеток в выделенном В-клеточном регионе предполагает использование сразу 2 подходов [2, 26]: идентификацию клеток с фенотипом, выявленным до начала иммунотерапии, и клеток, которые отличаются по иммунофенотипу от нормальных клеток КМ (*рисунок 2*). В связи с тем, что CD19-направленная терапия может стать причиной изменения экспрессии на опухолевых бластах не только CD19, но и других антигенов, антитела к которым составляют панель для определения МОБ [13, 14], более предпочтительным подходом к выявлению лейкоэмических бластов является поиск клеток, отличных от нормальных.

Следует отметить, что в зависимости от того, как был выделен В-клеточный регион, схема расположения «пустых мест» на точечных графиках будет в некоторой степени различаться [27], так как в регион будет попадать разный набор нормальных популяций клеток КМ (*таблица 2*). Наибольшее количество нормальных клеток попадает в В-клеточный регион при выделении его по CD22 без дальнейшей «очистки» по iCD79a: помимо всех возможных CD22⁺ клеток В-линейного звена гемопоэза (ранние CD19⁺ и более поздние CD19⁺ В-клеточные предшественники (ВП), зрелые В-лимфоциты) в регионе могут содержаться базофилы и плазматоидные дендритные клетки, экспрессирующие CD22 (*рисунок 3*) [28–30]. Проблема с наличием в исследуемом регионе не В-клеток отсутствует при использовании iCD79a, при этом выделение В-региона по экспрессии данного антигена добавляет в область анализа плазматические клетки (*рисунок 4*). Базофилы, плазматоидные дендритные клетки и плазматические клетки требуют особого внимания в случае поиска

Таблица 2

Перечень нормальных клеточных популяций КМ в В-клеточном регионе в зависимости от способа его выделения на точечных графиках при определении МОБ методом МПЦ

Table 2

Number of normal cell populations in the B-cell gate according to the gating strategy of MRD monitoring by flow cytometry

Способ выделения В-клеточного региона B-cell gating type	Нормальные клеточные популяции КМ Normal bone marrow cell populations
CD19-ориентированный CD19-based	CD19 ⁺ ВП, плазматические клетки, В-лимфоциты CD19 ⁺ B-cell precursors, plasma cells, mature B cells
CD22+iCD79a-ориентированный CD22+iCD79a-based	CD19 ⁺ ВП, CD19 ⁺ ВП, В-лимфоциты CD19 ⁺ B-cell precursors, CD19 ⁺ B-cell precursors, mature B cells
CD22-ориентированный CD22-based	CD19 ⁺ ВП, CD19 ⁺ ВП, В-лимфоциты, базофилы, плазматоидные дендритные клетки CD19 ⁺ B-cell precursors, CD19 ⁺ B-cell precursors, mature B cells, basophils, plasmacytoid dendritic cells
iCD79a-ориентированный iCD79a-based	CD19 ⁺ ВП, CD19 ⁺ ВП, плазматические клетки, В-лимфоциты CD19 ⁺ B-cell precursors, CD19 ⁺ B-cell precursors, plasma cells, mature B cells
CD10-ориентированный CD10-based	CD19 ⁺ ВП, CD19 ⁺ ВП CD19 ⁺ B-cell precursors, CD19 ⁺ B-cell precursors
CD24-ориентированный CD24-based	CD19 ⁺ ВП, В-лимфоциты CD19 ⁺ B-cell precursors, mature B cells

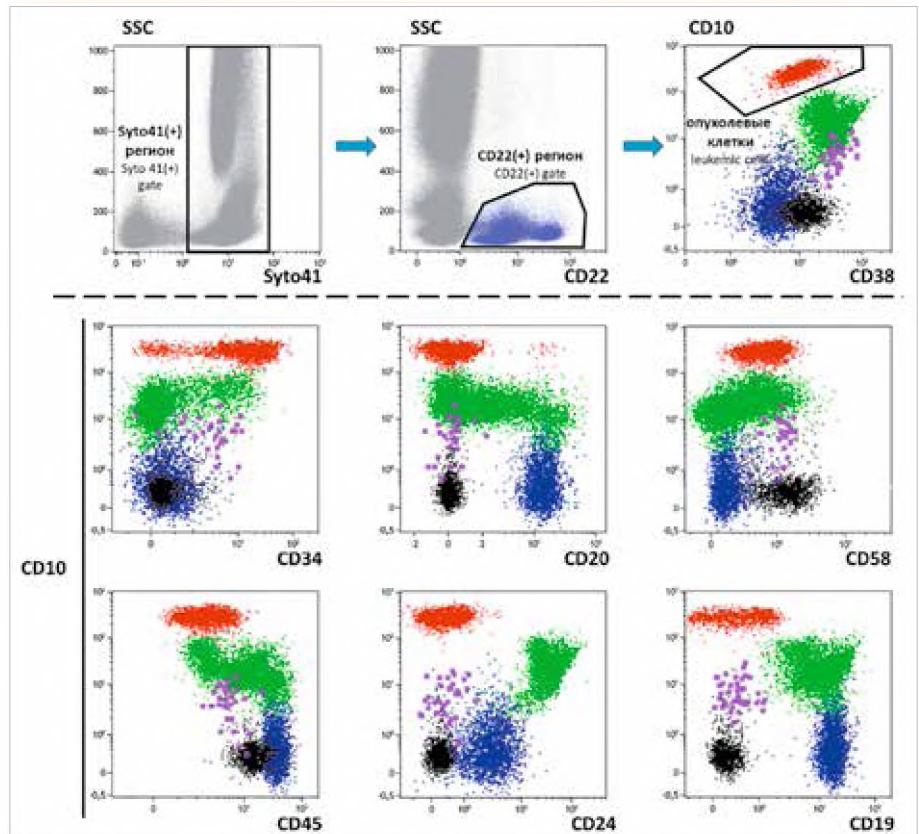
Рисунок 3

Пример определения МОБ с использованием CD22 для выделения В-клеток. Первая строка содержит последовательность поиска опухолевых клеток на точечных графиках, вторая и третья строки демонстрируют расположение клеток CD22⁺ на точечных графиках. Светло-синий – клетки В-клеточного региона; красный – опухолевые бласты; зеленый – CD19⁺ ВП; фиолетовый – CD19⁻ ВП; темно-синий – зрелые В-лимфоциты; черный – CD22⁻-нормальные миелоидные клетки; серый – другие ЯСК

Figure 3

Example of MRD data analysis using CD22 as marker for B-cell gating

First row contains sequence of the search for leukemic cells on dot plots, second and third rows demonstrate localization of CD22⁺ cells on dot plots. Blue – cells in B-cell gate; red – leukemic cells; green – CD19⁺ BCPs; purple – CD19⁻ BCPs; black – CD22⁻ normal myeloid cells; dark blue – mature B-cells; grey – other cells

**Рисунок 4**

Пример определения МОБ iCD79a для выделения В-клеток

Первая строка содержит последовательность поиска опухолевых клеток на точечных графиках, вторая и третья строки демонстрируют расположение клеток iCD79a⁺ на точечных графиках. Светло-синий – клетки В-клеточного региона; красный – опухолевые бласты; зеленый – CD19⁺ ВП; фиолетовый – CD19⁻ ВП; оранжевый – плазматические клетки; серый – другие ЯСК

Figure 4

Example of MRD data analysis using iCD79a as marker for B-cell gating

First row contains sequence of the search for leukemic cells on dot plots, second and third rows demonstrate localization of iCD79a⁺ cells on dot plots. Blue – cells in B-cell gate; red – leukemic cells; green – CD19⁺ BCPs; purple – CD19⁻ BCPs; orange – plasma cells; grey – other cells

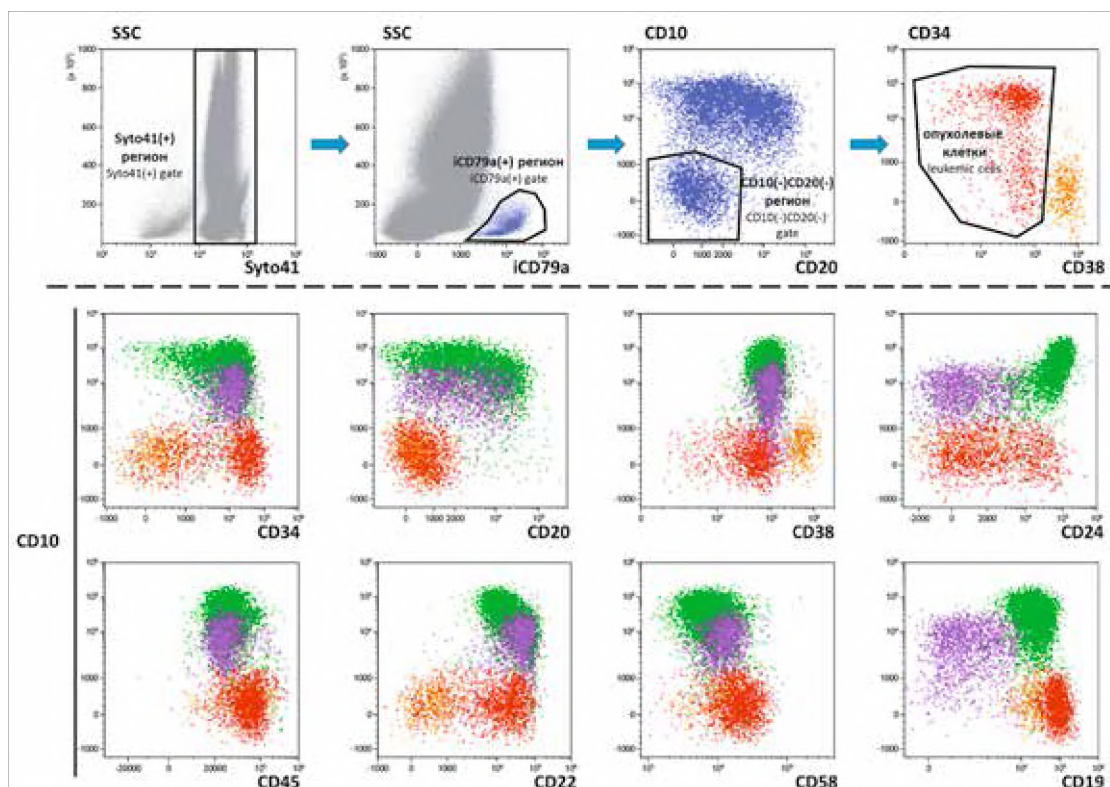
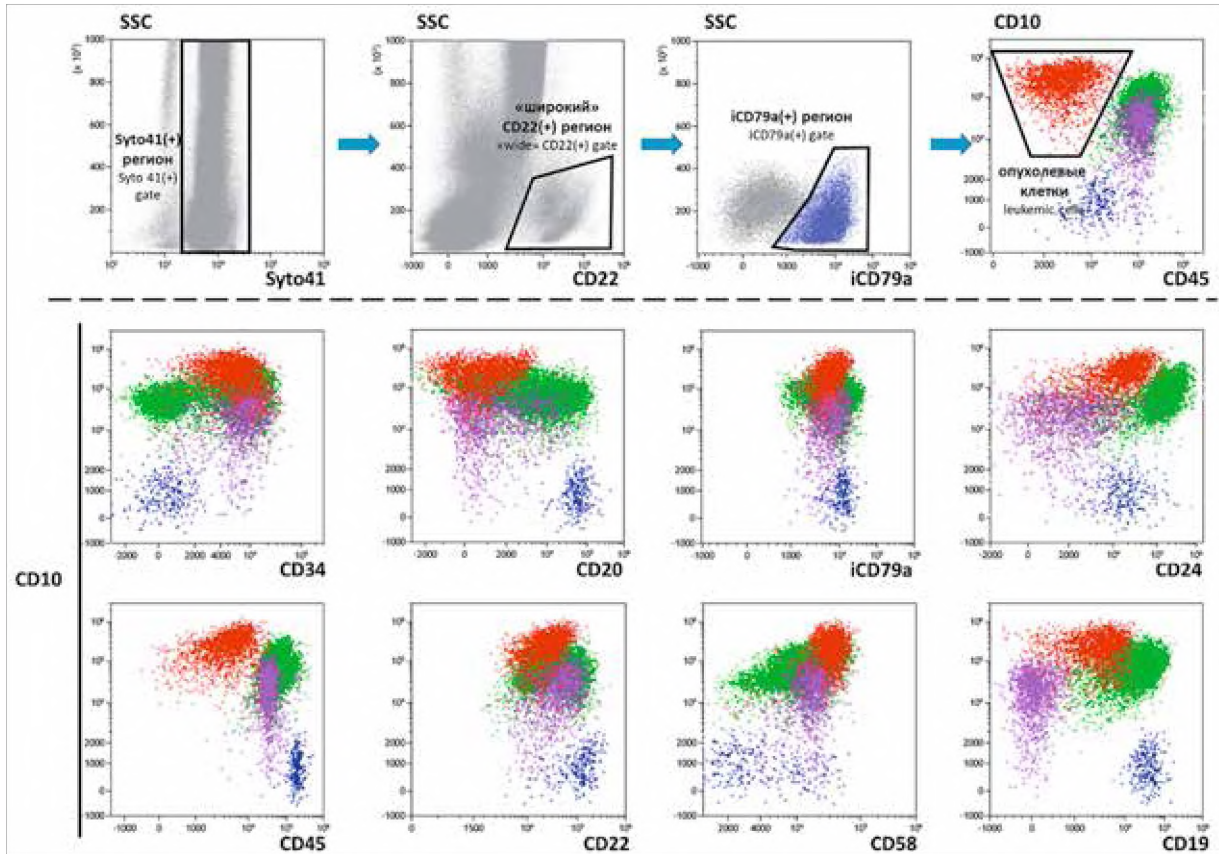


Рисунок 5

Пример определения МОБ с использованием комбинации CD22 и iCD79a для выделения В-клеток
Первая строка содержит последовательность поиска опухолевых клеток на точечных графиках, вторая и третья строки демонстрируют расположение клеток CD22⁺iCD79a⁺ на точечных графиках. Светло-синий – клетки В-клеточного региона; красный – опухолевые бласты; зеленый – CD19⁺ ВП; фиолетовый – CD19⁻ ВП; темно-синий – зрелые В-лимфоциты; серый – другие ЯСК

Figure 5

Example of MRD data analysis using combination of CD22 and iCD79a for B-cell gating
First row contains sequence of the search for leukemic cells on dot plots, second and third rows demonstrate localization of CD22⁺iCD79a⁺ cells on dot plots. Blue – cells in B-cell gate; red – leukemic cells; green – CD19⁺ BCPs; purple – CD19⁻ BCPs; dark blue – mature B-cells; grey – other cells



только CD19⁺ ВП и зрелые В-лимфоциты (рисунок 6), так как плазматические клетки и CD19⁻ ВП не экспрессируют данный маркер. Выделение В-клеточного региона по CD10 включает в анализ только ВП, как CD19⁺, так и CD19⁻, и не позволяет проводить поиск CD10⁻опухолевых клеток.

Важно отметить, что, несмотря на применение таргетной терапии, CD19 остается важным маркером для мониторинга МОБ методом МПЦ [13], так как существенная часть рецидивов представлена CD19⁺-опухолевыми клетками [13, 14]: в некоторых случаях экспрессия CD19 может служить критерием aberrantности иммунофенотипа подозрительной популяции (например, в случае дифференциации опухолевых клеток от CD19⁻ ВП [27, 31]).

Ввиду существования вероятности смены линейной принадлежности опухолевых клеток под влиянием таргетных препаратов [18] алгоритм предусматривает использование таких графиков как CD45/SSC, CD38/SSC, CD34/SSC, CD24/SSC для визу-

ального поиска «подозрительных» миелоидных популяций среди всех ЯСК.

В случае сомнительного результата определения МОБ из-за серьезных изменений иммунофенотипа нормальных и опухолевых клеток КМ рекомендуется проведение проточной сортировки клеток с последующим подтверждением их опухолевой природы при помощи различных молекулярно-генетических технологий [27, 32, 33].

Описание результатов определения минимальной остаточной болезни

Как и в случае определения МОБ при ОЛП в условиях стандартной терапии [9], за МОБ после таргетной терапии принимается 10 точек и более на графике, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип и «лимфоидные» значения параметров светорассеяния. Величина МОБ рассчитывается как процентное содержание опухолевых клеток среди всех ЯСК (т. е. SYTO⁺-клеток) [9]. Помимо указания процентного содержания опухолевых клеток в заключении также рекомендуется указывать процентное содер-

Рисунок 6

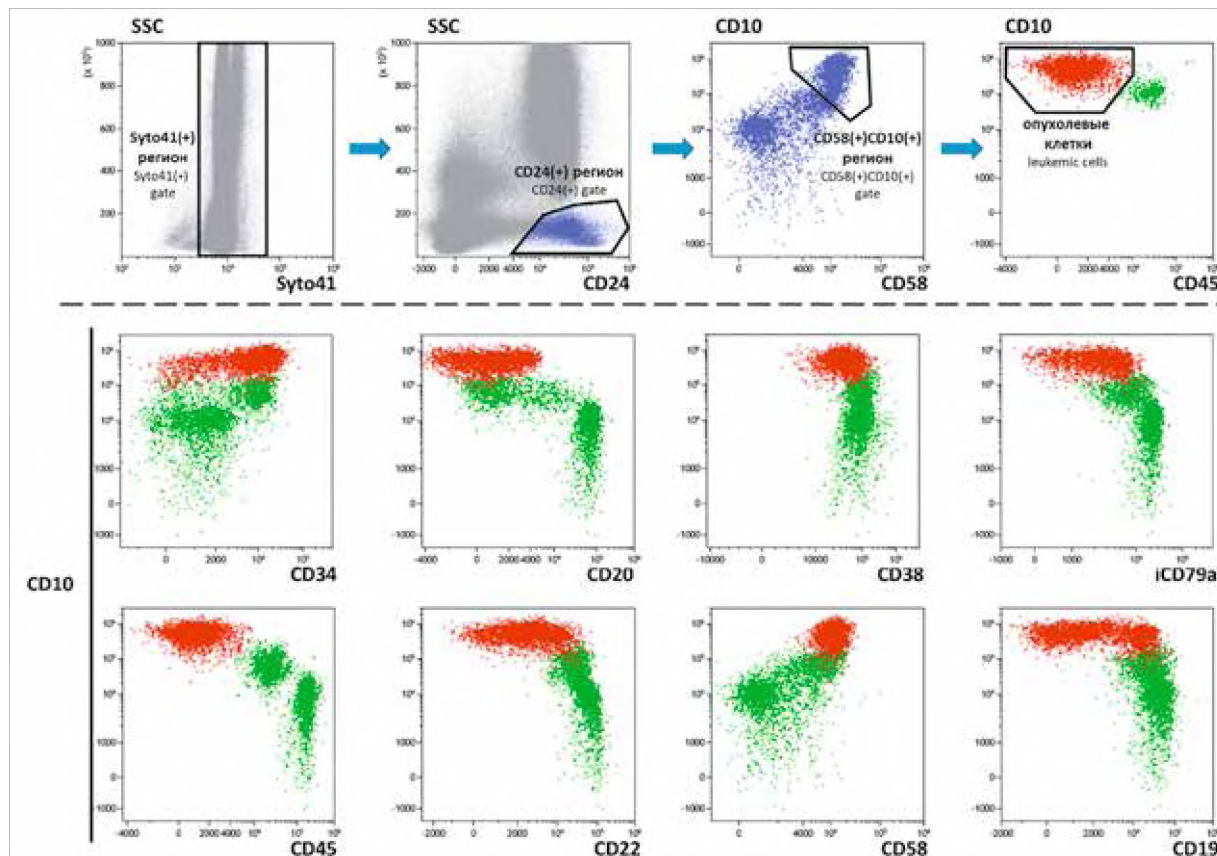
Пример определения МОБ с использованием CD24 для выделения В-клеток

Первая строка содержит последовательность поиска опухолевых клеток на точечных графиках, вторая и третья строки демонстрируют расположение клеток CD24⁺ на точечных графиках. Светло-синий – клетки В-клеточного региона; красный – опухолевые бласты; зеленый – CD19⁺ ВП; серый – другие ЯСК

Figure 6

Example of MRD data analysis using CD24 as marker for B-cell gating

First row contains sequence of the search for leukemic cells on dot plots, second and third rows demonstrate localization of CD24⁺ cells on dot plots. Blue – cells in B-cell gate; red – leukemic cells; green – CD19⁺ BCPs; grey – other cells



жание ВП в образце для исключения подозрения на рецидив на основании данных миелограммы в случае накопления в КМ большого количества регенераторных бластных клеток.

При выявлении МОБ-позитивности после проведения CD19-направленной терапии зачастую встает вопрос о дальнейшей тактике лечения пациента. В этих обстоятельствах крайне важную роль играет информация об экспрессии на опухолевых клетках молекул для последующего таргетного воздействия (при ВП-ОЛП это прежде всего касается CD19 и CD22), которая может дополнительно указываться в заключении к исследованию. При обнаружении от 100 опухолевых клеток в образце экспрессия маркеров может быть указана в форме процентного содержания позитивных клеток в популяции, при обнаружении менее 100 клеток рекомендуется давать качественную оценку о наличии или отсутствии антигена на опухолевой популяции. Оценка экспрессии CD22, представляющего собой альтернативную мишень для иммунобиологической терапии при ВП-ОЛП [34–37], также желательно производить в формате количественной оценки плот-

ности экспрессии на поверхности опухолевых клеток [36, 38, 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанный и представленный в данной работе подход к мониторингу МОБ при ВП-ОЛП позволяет применять проточную цитометрию для пациентов после CD19-направленной терапии с высокой диагностической эффективностью [22, 34, 40, 41].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Mikhailova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3450-0498>

Illarionova O.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2685-674X>

Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Karachunskiy A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9300-5198>

Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

- DiGiuseppe J.A., Wood B.L. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96 (4):256–65.
- Chen X., Wood B.L. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: Treatment and prognosis? *Best Pract Res Clin Haematol* 2017; 30 (3): 237–48.
- Van Dongen J.J., van der Velden V.H., Bruggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125 (26):3 996–4009.
- Keeney M., Wood B.L., Hedley B.D., DiGiuseppe J.A., Stetler-Stevenson M., Paietta E., et al. A QA Program for MRD Testing Demonstrates That Systematic Education Can Reduce Discordance Among Experienced Interpreters. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (2): 239–49. DOI: 10.1002/cyto.b.21528
- Maurer-Granofszky M., Schumich A., Buldini B., Gaipa G., Kappelmayer J., Mejstrikova E., et al. An Extensive Quality Control and Quality Assurance (QC/QA) Program Significantly Improves Inter-Laboratory Concordance Rates of Flow-Cytometric Minimal Residual Disease Assessment in Acute Lymphoblastic Leukemia: An I-BFM-FLOW-Network Report. *Cancers (Basel)* 2021; 13 (23): 6148. DOI: 10.3390/cancers13236148
- Theunissen P., Mejstrikova E., Sedek L., van der Sluijs-Gelling A.J., Gaipa G., Bartels M., et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017; 129 (3): 347–57.
- Dworzak M.N., Gaipa G., Ratei R., Veltroni M., Schumich A., Maglia O., 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.
- Borowitz M.J., Wood B.L., Keeney M., Hedley B.D. Measurable Residual Disease Detection in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: The Children's Oncology Group (COG) Method. *Curr Protoc* 2022; 2 (3): e383.
- Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Е.В., Фадеева М.И. и др. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы. *Онкогематология* 2016; 11 (4): 64–73.
- Libert D., Yuan C.M., Masih K.E., Galera P., Salem D., Shalabi H., et al. Serial evaluation of CD19 surface expression in pediatric B-cell malignancies following CD19-targeted therapy. *Leukemia* 2020; 34 (11): 3064–9. DOI: 10.1038/s41375-020-0760-x
- Mejstrikova E., Hrusak O., Borowitz M.J., Whitlock J.A., Brethon B., Trippett T.M., et al. CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer J* 2017; 7 (12): 659.
- Mejstrikova E., Klinger M., Markovic A., Zugmaier G., Locatelli F. CD19 expression in pediatric patients with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia pre- and post-treatment with blinatumomab. *Pediatr Blood Cancer* 2021; 68 (12): e29323.
- Mikhailova E., Gluhanyuk E., Illarionova O., Zerkalenkova E., Kashpor S., Miakova N., et al. Immunophenotypic changes of leukemic blasts in children with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, who have been treated with Blinatumomab. *Haematologica* 2021; 106 (7): 2009–12.
- Mikhailova E., Illarionova O., Shelihova L., Zerkalenkova E., Molos-tova O., Olshanskaya Y., et al. Immunophenotypic changes in leukemic blasts in children with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia after treatment with CD19-directed chimeric antigen receptor (CAR)- expressing T cells. *Haematologica* 2022; 107 (4): 970–4.
- Jacoby E., Nguyen S.M., Fountaine T.J., Welp K., Gryder B., Qin H., et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun* 2016; 7: 12320.
- Gardner R., Wu D., Cherian S., Fang M., Hanafi L.A., Finney O., et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* 2016; 127(20): 2406–10.
- Oberley M.J., Gaynon P.S., Bhojwani D., Pulsipher M.A., Gardner R.A., Hiemenz M.C., et al. Myeloid lineage switch following chimeric antigen receptor T-cell therapy in a patient with TCF3-ZNF384 fusion-positive B-lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2018; 65 (9): e27265
- Semchenkova A., Mikhailova E., Komkov A., Gaskova M., Abasov R., Matveev E., et al. Lineage Conversion in Pediatric B-Cell Precursor Acute Leukemia under Blinatumomab Therapy. *Int J Mol Sci* 2022 ;23 (7): 4019. DOI: 10.3390/ijms23074019
- Mikhailova E., Itov A., Zerkalenkova E., Roumiantseva J., Olshanskaya Y., Karachunskiy A., et al. B-lineage antigens that are useful to substitute CD19 for minimal residual disease monitoring in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia after CD19 targeting. *Cytometry B Clin Cytom* 2022; 102 (5): 353–9. DOI: 10.1002/cyto.b.22088
- Cherian S., Miller V., McCullough V., Dougherty K., Fromm J.R., Wood B.L. A novel flow cytometric assay for detection of residual disease in

- patients with B-lymphoblastic leukemia/lymphoma post anti-CD19 therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (1): 112–20.
21. Cherian S., Stetler-Stevenson M. Flow Cytometric Monitoring for Residual Disease in B Lymphoblastic Leukemia Post T Cell Engaging Targeted Therapies. *Curr Protoc Cytom* 2018; 86 (1): e44.
 22. Mikhailova E., Illarionova O., Komkov A., Zerkalenkova E., Mamedov I., Shelikhova L., et al. Reliable Flow-Cytometric Approach for Minimal Residual Disease Monitoring in Patients with B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia after CD19-Targeted Therapy. *Cancers (Basel)* 2022; 14 (21): 5445. DOI: 10.3390/cancers14215445.
 23. Bouriche L., Bernot D., Nivaggioni V., Arnoux I., Loosveld M. Detection of Minimal Residual Disease in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Using an Eight-Color Tube with Dried Antibody Reagents. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96 (2): 158–63.
 24. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Дёмина И.А., Михайлова Е.В., Семченкова А.А. и др. Диагностическое иммунофенотипирование острых лейкозов. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (1): 165–77. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-165-177
 25. Chen M., Fu M., Wang A., Wu X., Zhen J., Gong M., et al. Cytoplasmic CD79a is a promising biomarker for B lymphoblastic leukemia follow up post CD19 CAR-T therapy. *Leuk Lymphoma* 2022; 63 (2): 426–34. DOI: 10.1080/10428194.2021.1980214
 26. Chen X., Wood B.L. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev* 2017; 31 (2): 63–75.
 27. Mikhailova E., Semchenkova A., Illarionova O., Kashpor S., Brilliantova V., Zakharova E., et al. Relative expansion of CD19-negative very-early normal B-cell precursors in children with acute lymphoblastic leukaemia after CD19 targeting by blinatumomab and CAR-T cell therapy: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2021; 193 (3): 602–12.
 28. Han K., Kim Y., Lee J., Lim J., Lee K.Y., Kang C.S., et al. Human basophils express CD22 without expression of CD19. *Cytometry* 1999; 37 (3): 178–83.
 29. Toba K., Hanawa H., Fuse I., Sakaue M., Watanabe K., Uesugi Y., et al. Difference in CD22 molecules in human B cells and basophils. *Exp Hematol* 2002; 30 (3): 205–11.
 30. Reineks E.Z., Osei E.S., Rosenberg A., Auletta J., Meyerson H.J. CD22 expression on blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms and reactivity of anti-CD22 antibodies to peripheral blood dendritic cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76 (4): 237–48.
 31. Mikhailova E., Roumiantseva J., Illarionova O., Lagoyko S., Miakova N., Zerkalenkova E., et al. Strong expansion of normal CD19-negative B-cell precursors after the use of blinatumomab in the first-line therapy of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Br J Haematol* 2022; 196 (1): e6–9.
 32. Semchenkova A., Zhogov V., Zakharova E., Mikhailova E., Illarionova O., Larin S., et al. Flow cell sorting followed by PCR-based clonality testing may assist in questionable diagnosis and monitoring of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2023.
 33. Semchenkova A., Brilliantova V., Shelikhova L., Zhogov V., Illarionova O., Mikhailova E., et al. Chimerism evaluation in measurable residual disease-suspected cells isolated by flow cell sorting as a reliable tool for measurable residual disease verification in acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom* 2020.
 34. Литвинов Д.В., Тесаков И.П., Шелихова Л.Н., Хачатрян Л.А., Зеркаленкова Е.А., Ольшанская Ю.В. и др. Острый лимфобластный лейкоз с транслокацией t(17;19): надежда появилась! Описание случая мультимодальной иммунотерапии у ребенка 3 лет с рефрактерным течением заболевания. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (3): 100–14. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-100-114
 35. Bhojwani D., Sposto R., Shah N.N., Rodriguez V., Yuan C., Stetler-Stevenson M., et al. Inotuzumab ozogamicin in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2019; 33 (4): 884–92.
 36. Shah N.N., Stevenson M.S., Yuan C.M., Richards K., Delbrook C., Kreitman R.J., et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62 (6): 964–9.
 37. Viardot A., Locatelli F., Stieglmaier J., Zaman F., Jabbour E. Concepts in immuno-oncology: tackling B cell malignancies with CD19-directed bispecific T cell engager therapies. *Ann Hematol* 2020; 99 (10): 2215–29.
 38. Pannu K.K., Joe E.T., Iyer S.B. Performance evaluation of QuantiBRITE phycoerythrin beads. *Cytometry* 2001; 45 (4): 250–8.
 39. Jasper G.A., Arun I., Venzon D., Kreitman R.J., Wayne A.S., Yuan C.M., et al. Variables affecting the quantitation of CD22 in neoplastic B cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80 (2): 83–90.
 40. Popov A., Fominikh V., Mikhailova E., Shelikhova L., Tsaur G., Abugova Y., et al. Blinatumomab following hematopoietic stem cell transplantation – a novel approach for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia in infants. *Br J Haematol* 2021; 194 (1): 174–8.
 41. Popov A., Tsaur G., Verzhbitskaya T., Riger T., Permikin Z., Demina A., et al. Comparison of minimal residual disease measurement by multi-colour flow cytometry and PCR for fusion gene transcripts in infants with acute lymphoblastic leukaemia with *KMT2A* gene rearrangements. *Br J Haematol* 2021.