

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209

Определение минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе методом проточной цитометрии. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей

А.М. Попов¹, Е.В. Михайлова¹, Т.Ю. Вержбицкая², Л.В. Мовчан³, Ж.В. Пермикин², Т.В. Шман³, А.И. Карачунский¹, Г.А. Новичкова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Минздрава России, Москва

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Екатеринбург

³ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

Многоцветная проточная цитометрия широко используется в современной лабораторной практике для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). В данной работе представлены обновленные рекомендации по подходам к определению МОБ при В-линейных ОЛЛ методом проточной цитометрии российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей. Стандарт работы группы включает рекомендации по выбору панели моноклональных антител, пробоподготовке, настройке проточного цитометра, анализу и интерпретации цитометрических данных, формату заключения по результатам исследования. Разработанный подход к мониторингу МОБ позволяет эффективно применять проточную цитометрию для мониторинга В-линейных ОЛЛ у пациентов любых возрастных групп как в локальных лабораториях, так и в рамках крупных многоцентровых исследований.

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

Попов А.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 199–209. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209

Minimal residual disease monitoring in B-lineage acute lymphoblastic leukemia using flow cytometry. Guidelines of the Russian-Belarusian multicenter group for pediatric acute leukemia studies

A.M. Popov¹, E.V. Mikhailova¹, T.Yu. Verzhbitskaya², L.V. Movchan³, Zh.V. Permikin², T.V. Shman³, A.I. Karachunskiy¹, G.A. Novichkova¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Regional Children's Clinical Hospital No.1, Ekaterinburg

³The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

Multicolor flow cytometry is now routinely used in laboratory practice for minimal residual disease (MRD) monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). This article describes the methodology of MRD detection in BCP-ALL using flow cytometry as recommended by the Russian-Belarusian multicenter group for pediatric acute leukemia studies. This well-harmonized approach includes recommendations for the choice of monoclonal antibodies, sample preparation, cytometer setup, flow cytometry data analysis and interpretation as well as for reporting. These guidelines allow application of multicolor flow cytometry for MRD monitoring in BCP-ALL in children and adults both in local laboratories and in multicenter settings in prospective clinical trials.

Key words: B-cell acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry

Popov A.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 199–209. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209

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

Поступила 16.06.2023

Принята к печати 14.07.2023

Контактная информация:

Попов Александр Михайлович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией иммунофенотипирования гемобластозов ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPhO»

Received 16.06.2023

Accepted 14.07.2023

Correspondence:

Alexander M. Popov, Cand. Med. Sci., Head of Leukemia Immunophenotyping Laboratory at the 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: uralcytometry@gmail.com

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) [1–3]. К преимуществам метода 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) [4]. Несмотря на сложности полноценной стандартизации [3, 4], методика цитометрического определения МОБ при ВП-ОЛЛ относительно гармонизована в рамках различных исследовательских групп [5–9]. Прогностическое значение МОБ, определенной методом проточной цитометрии, показано для разных протоколов терапии ВП-ОЛЛ у детей и взрослых [10], кроме того, результаты этого исследования проспективно применяются для стратификации пациентов [11–14].

Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) [15–17] потребовало гармонизации методологии определения МОБ в рамках российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей [18]. Данный гармонизованный подход позволил провести анализ прогностического значения мониторинга МОБ в протоколах ОЛЛ-МБ 2008 [19–24] и MLL-Baby [25–27] и выработать рекомендации по применению результатов определения МОБ для стратификации пациентов в дальнейших версиях протоколов.

В данной работе представлены обновленные рекомендации по подходам к определению МОБ при ВП-ОЛЛ методом проточной цитометрии.

Исследуемый материал

Материалом для исследования при определении МОБ должен являться КМ. В отличие от диагностического иммунофенотипирования периферическая кровь не может быть использована для мониторинга МОБ. Результат определения остаточных опухолевых клеток в КМ редко совпадает с таковым в крови [28], особенно учитывая то, что МОБ рассчитывается как процентное содержание остаточных опухолевых клеток среди нормальных ядросодержащих клеток (ЯСК) образца, т. е. на конечный результат влияет количество как собственно остаточных бластов, так и остальных ЯСК. Взятие КМ в объеме не менее 1 мл (желательно не менее 2 мл) осуществляется в пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Так как проточная цитометрия используется для количественного определения МОБ, любое искажение клеточного состава образца КМ приводит к искажению итогового результата. Поэтому, чтобы макси-

мально избежать разведения КМ периферической кровью, предпочтительным для исследования является материал, полученный в самом начале пункции. Все пробирки должны быть промаркированы фамилией и инициалами пациента, равно как и датой взятия материала, а в направлении на иммунофенотипирование указываются фамилия, имя, отчество и возраст пациента, дата и время взятия материала, диагноз, проводимая терапия, точка наблюдения, 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, нарушении температурного режима транспортировки 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.

Используемая панель моноклональных антител

Несмотря на четкие отличия между опухолевыми и нормальными клетками в экспрессии различных антигенов [29, 30], в настоящее время не существует единственного маркера, который был бы применим для мониторинга МОБ во всех случаях ОЛЛ [31]. Поэтому для адекватного определения остаточных опухолевых клеток предпочтительно использовать многоцветные комбинации антител, включающие линейно-ассоциированные антигены, маркеры разных стадий дифференцировки клеток и антигены, экспрессия которых на опухолевых клетках часто существенно отличается от таковой на их нормальных аналогах. Попытки упростить подходы к определению МОБ путем сокращения панелей моноклональных антител могут снизить число пациентов, у которых возможно определение МОБ методом проточной цитометрии [32]. С другой стороны, необоснованное увеличение набора определяемых маркеров может приводить к сложностям в настройке приборов и усложнению анализа цитометрических данных [3]. Рекомендуется использование не менее 6-цветной цитометрии (предпочтительно 8-цветная) для мониторинга ВП-ОЛЛ. В *таблице 1* представлены рекомендованные антитела для мониторинга МОБ.

Подбор флуорохрома для каждого конкретного антитела также является критически важным. Ключевые антитела, по которым происходит выделение клеток и среди которых далее производится поиск МОБ (см. ниже), должны быть мечены яркими флуорохромами с хорошим разделением позитивного

Таблица 1

Задачи применения различных антигенов для определения МОБ при CD10⁺ и CD10⁻ ВП-ОЛЛ

Table 1

The purposes of using various antigens for minimal residual disease (MRD) detection in CD10⁺ and CD10⁻ B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)

Маркер Marker	CD10 ⁺ ВП-ОЛЛ CD10 ⁺ BCP-ALL	CD10 ⁻ ВП-ОЛЛ CD10 ⁻ BCP-ALL
CD19	Выделение всех клеток В-линии Identification of all B-lineage cells	Выделение всех клеток В-линии Identification of all B-lineage cells
CD10	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Исключение из анализа нормальных В-клеточных предшественников (ВП) Exclusion of normal B cell precursors (BCPs)
CD20	Выделение опухолевых клеток, исключение из анализа В-лимфоцитов Identification of tumor cells, exclusion of B-lymphocytes	Исключение из анализа нормальных ВП и В-лимфоцитов Exclusion of normal BCPs and B-lymphocytes
CD34	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells
CD58	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells
CD38	Дифференцирование опухолевых клеток от нормальных ВП Differentiation between tumor cells and normal BCPs	Дифференцирование опухолевых клеток от плазмочитов Differentiation between tumor cells and plasmocytes
CD45	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells

и негативного сигналов (APC, PE, PE-Cy7 и др.). 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. Возможно использование комбинаций антител, собранных в специально изготовленные пробирки [33, 34].

Применение CD19-направленной терапии приводит к изменению панели используемых антител, добавлению дополнительных В-линейных антигенов [34].

Пробоподготовка

Иммунофенотипирование ОЛЛ производится из одной пробирки с материалом. Если в лабораторию поступило несколько пробирок с КМ, взятым из разных точек пункции, используется одна из них. Выбирается пробирка с наибольшей клеточностью по данным исследования на гематологическом анализаторе.

Используется цельный КМ без дополнительного выделения мононуклеаров. 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. Однако следует помнить, что при большом объеме окрашиваемого КМ может быть затруднен лизис эритроцитов стандартным объемом лизирующего реагента. Так как для достижения достаточной чувствительности при определении МОБ рекомендуется анализировать не менее 1 000 000 ЯСК, чаще всего приходится окрашивать

относительно большой объем материала. Для уверенности в том, что в анализируемом образце находится достаточное количество клеток, желательно окрашивать такой объем материала, чтобы количество вносимых клеток существенно превышало целевое количество анализируемых клеток. Внесение материала для окрашивания рекомендуется производить после подсчета клеточности на гематологическом анализаторе и произведения расчетов необходимого объема материала. В случае недостаточной клеточности образца он должен быть использован весь.

Количество вносимых моноклональных антител напрямую зависит от количества клеток в окрашиваемом материале. Оптимальный объем раствора антитела определяется путем титрования и должен позволять получить максимально четкое распределение всех интересующих популяций. Антитела должны вноситься непосредственно из флакона производителя. Заблаговременное приготовление смесей (коктейлей) антител нецелесообразно, так как может привести к распаду относительно нестабильных tandemных флуорохромов.

Лизис эритроцитов проводится в соответствии с инструкциями фирм-производителей соответствующих реагентов. Порядок пробоподготовки определяется особенностями материала. Возможно применение предварительного лизиса эритроцитов в образце до его окрашивания моноклональными антителами раствором без дополнительного фиксатора клеток, однако чаще окрашивание предшествует лизису. Для мониторинга МОБ при ВП-ОЛЛ в отсутствие таргетной иммунотерапии пермеабилзация и внутриклеточное окрашивание не используются.

Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используе-

мого 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 их работы в референсные диапазоны. У большинства производителей проточных цитометров существуют системы калибровочных частиц, позволяющие пользователю достаточно легко контролировать работу лазеров и ФЭУ. Персонал лабораторий обязан как минимум еженедельно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к цифровой 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

Определение МОБ состоит в выявлении и количественном анализе остаточных опухолевых клеток в пределах лимита детекции проточной цитометрии. В отличие от диагностического иммунофенотипирования, когда необходимо описать и классифицировать очевидную популяцию опухолевых клеток, чаще всего представляющую собой большую часть всех ЯСК в КМ, при выявлении МОБ используется прин-

ципально иной алгоритм, основанный на анализе клеточного состава КМ и выявлении минимальных количеств опухолевых клеток среди большого количества нормальных. Такой подход базируется на двух основных принципах: выявлении клеток с изначально диагностированным иммунофенотипом и клеток, отличающихся по иммунофенотипу от нормальных клеток КМ. Каждый из этих подходов при отдельном использовании имеет существенные недостатки (таблица 2), поэтому в рутинной практике обычно применяется комбинация данных методов, по сути, представляющая собой единый комбинированный подход. При этом, учитывая возможные изменения профиля экспрессии антигенов лейкоэмическими бластами под действием противоопухолевой терапии [35–38], ключевым все же является отличие опухолевых клеток от их нормальных аналогов. Именно такие отличия учитываются прежде всего при оценке инициального иммунофенотипа, поскольку в дальнейшем эти особенности и будут использованы в поиске МОБ.

При определении МОБ при ОЛЛ методом проточной цитометрии позитивными считаются образцы, в которых на точечных графиках определяется группа из 10 клеток и более, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, соответствующие лимфоцитам/лимфобластам. Максимальная чувствительность метода (анализ 1 000 000 клеток), таким образом, составляет 0,001%. В то же время далеко не во всех случаях клеток в образце достаточно для достижения такой чувствительности. Поэтому минимально достаточной рутинной обычно принято считать чувствительность в 0,01%, для достижения которой необходим анализ 100 000 клеток. Если по тем или иным причинам не удастся собрать мини-

Таблица 2

Преимущества и недостатки двух основных подходов к выявлению остаточных опухолевых клеток

Table 2

The advantages and disadvantages of two main approaches to the identification of residual tumor cells

	Выявление клеток с изначально диагностированным иммунофенотипом Identification of cells with initially diagnosed immunophenotype	Выявление клеток, отличающихся по иммунофенотипу от нормальных клеток КМ Identification of cells with immunophenotype different from that of normal bone marrow cells
Преимущества Advantages	Заранее известные aberrации иммунофенотипа Immunophenotypic aberrations are initially known Возможность применения изначально созданного шаблона анализа данных The initially created data analysis template can be used	Проведение исследования возможно без первичных данных Investigation is possible without initial data Результаты исследования не зависят от изменений иммунофенотипа Test results are not dependent on changes in immunophenotype Результаты исследования менее зависят от выбора антител и флуорохромов Test results are not as dependent on the choice of antibodies and fluorochromes
Недостатки Disadvantages	Не учитываются изменения иммунофенотипа Changes in the immunophenotype are not taken into consideration Зависит от антител и пробоподготовки The approach is dependent on antibodies and sample preparation Применение невозможно при отсутствии первичных данных Application is impossible without source data Расположение нормальных и опухолевых клеток на графиках может пересекаться Normal and tumor cells can overlap on plots	Не учитывается первичный иммунофенотип Initial immunophenotype is not taken into consideration Увеличивается субъективность анализа данных Increased subjectivity of data analysis Распределение нормальных клеток на графиках зависит от типа и этапа терапии The distribution of normal cells on plots depends on the type and stage of therapy

мально достаточное количество клеток, а опухолевые клетки не выявляются, интерпретация результатов такого исследования считается невозможной (см. раздел «Формат заключения»).

Величина МОБ при определении методом проточной цитометрии рассчитывается как процентное содержание опухолевых клеток среди всех ЯСК КМ. При этом для идентификации опухолевых клеток могут использоваться различные варианты комбинаций антител, а итоговым уровнем МОБ считается максимальное количество, полученное в одной из пробирок. Для выделения ЯСК в образце рекомендуется применение ДНК-тропного красителя, окрашивание которым позволяет четко отделить ЯСК от всех случайно зафиксированных цитометром событий. Чаще всего для этих целей используются красители SYTO16 (канал FITC проточного цитометра) или SYTO41 (канал Pacific Blue). Предпочтительным является добавление ДНК-тропного красителя прямо в пробирку, в которой проводится определение МОБ. В этом случае выделение CD19⁺-клеток производится только среди SYTO⁺. Если же такой возможности нет, рекомендуется провести дополнительное окрашивание SYTO/CD19/CD45. Однако наиболее точное выделение ЯСК возможно только при их последовательном выделении по SYTO-позитивности, «очистке» полученной клеточной популяции от видимого дедбриса по значению прямого и бокового светорассеяния (график FSC/SSC) и выделении синглетов (удаление конгломератов клеток, способных давать завышенные значения флуоресценции). Эта итоговая совокупность клеток и становится знаменателем при расчете величины МОБ. Категорически неприемлемым является выделение региона анализа по экспрессии CD45, поскольку, во-первых, это может существенно осложнить выявление CD45⁺-опухолевых клеток, а, во-вторых, исключит из количества ЯСК эритроидные предшественники, что может исказить итоговую величину МОБ при расчете.

Выделение В-клеточного региона производится по экспрессии CD19 и характерным для лимфоидных клеток значениям параметра бокового светорассеяния (SSC). В этот регион кроме собственно гипотетически присутствующих остаточных опухолевых клеток попадают зрелые В-лимфоциты, нормальные ВП (только CD19⁺, но не более ранние), плазматические клетки (ПК) и в небольшом количестве результаты неспецифического связывания антитела к CD19. При определении МОБ важно понимать, какие нормальные клетки В-линейной дифференцировки могут обнаруживаться в КМ на каждом этапе лечения [29]. Так, во время индукционной терапии нормальные ВП в КМ отсутствуют [32, 39, 40], однако к концу данного этапа уже могут обнаруживаться в видимых количествах [32, 41]. Время появления в

КМ нормальных ВП зависит в том числе и от состава индукционной терапии (перечня препаратов и режима их введения) и может различаться не только при применении протоколов с разной интенсивностью терапии, но даже в разных руках рандомизации, предусматривающих разный состав индукции [41]. На этапах консолидации/интенсификации и поддерживающей терапии нормальные ВП выявляются в подавляющем числе образцов [32, 40].

Антигенный профиль нормальных В-лимфоидных клеток КМ детально описан ранее [29, 30]. Также четко представлены типичные отличия опухолевых клеток от нормальных и возможные места расположения остаточной лейкоэмической популяции на двухпараметрических точечных графиках [29]. Тем не менее не существует какого-либо отдельного маркера, который бы во всех случаях экспрессировался аберрантно и позволял всегда отличать опухолевые клетки от всех возможных нормальных [31]. Поэтому для точного выявления и количественной оценки МОБ всегда используется анализ сочетаний нескольких маркеров, зачастую сводящийся к последовательному исключению различных популяций нормальных элементов В-клеточного развития в соответствии с особенностями их иммунофенотипа. Анализ В-линейного региона в целом имеет некоторые особенности в зависимости от инициальной экспрессии CD10 на лейкоэмических бластах [18], однако всегда достаточно индивидуален. Его принципиальная схема показана на *рисунке 1*. Проводится анализ точечных графиков, которые наиболее четко отражают возможные различия опухолевых и нормальных клеток, в том числе и регенераторных (например, отображающих экспрессию CD10 и какого-либо другого антигена), однако в итоге выбирается та последовательность анализа экспрессии антигенов, которая позволяет наиболее четко отделить всю остаточную опухолевую популяцию от всех нормальных клеток в В-клеточном регионе. Пример выявления остаточных опухолевых клеток на фоне выраженной регенерации В-линейной составляющей КМ представлен на *рисунке 2*. Необходимость в первую очередь оценки экспрессии CD10 в сочетании с другими антигенами не вызывает сомнений. Пример важности такого алгоритма анализа представлен на *рисунке 3*.

Выделенные по соответствующему антигенному профилю опухолевые клетки должны быть проанализированы при помощи так называемого обратного гейтирования, т. е. проверки правомочности включения всех выделенных клеток как в регион CD19⁺-клеток, так и вообще в совокупность клеток, не находящихся в апоптозе. Это делается на графиках CD19/SSC и FSC/SSC соответственно. Примеры полного анализа цитометрических данных для выяв-

Рисунок 1

Принципиальный алгоритм анализа данных проточной цитометрии для мониторинга МОБ при CD10⁺- и CD10⁻-вариантах ВП-ОЛЛ

Figure 1

An algorithm for the analysis of flow cytometry data for MRD monitoring in CD10⁺ and CD10⁻ BCP-ALL

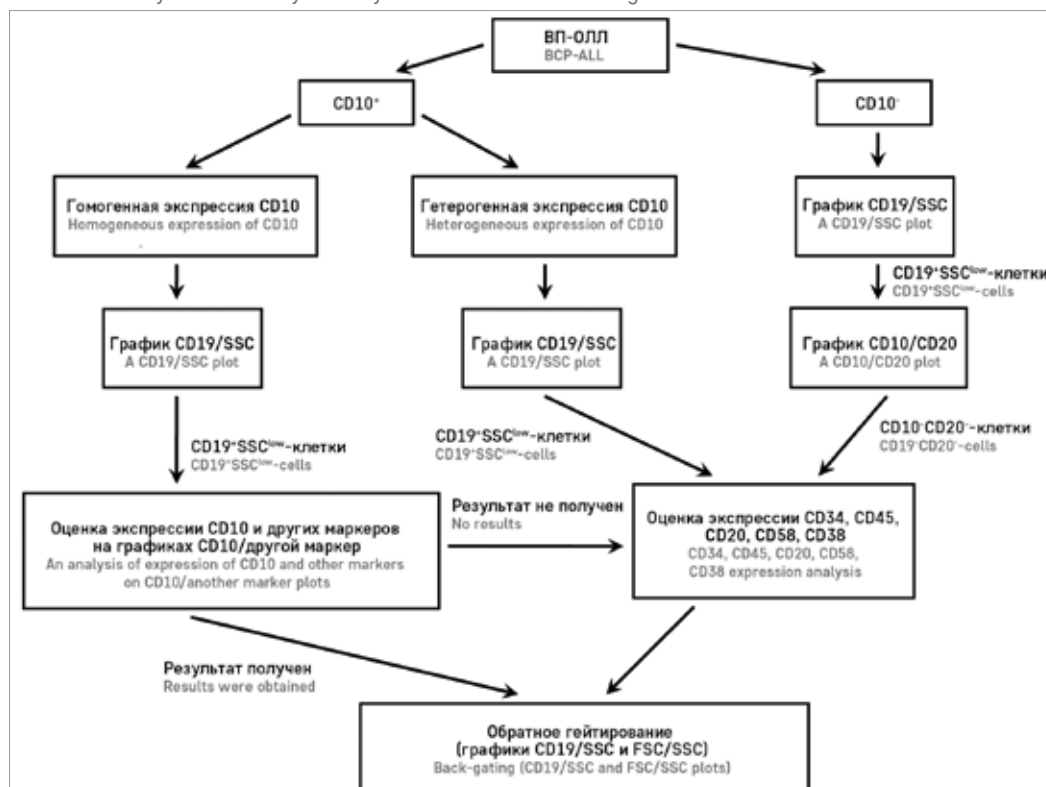


Рисунок 2

Пример выявления остаточных опухолевых клеток на фоне выраженной В-линейной регенерации, основанно-го на четких различиях антигенного профиля нормальных и опухолевых ВП

Figure 2

Identification of residual tumor cells during active B-cell regeneration based on clear-cut differences in the antigenic profiles of normal and neoplastic BCPs

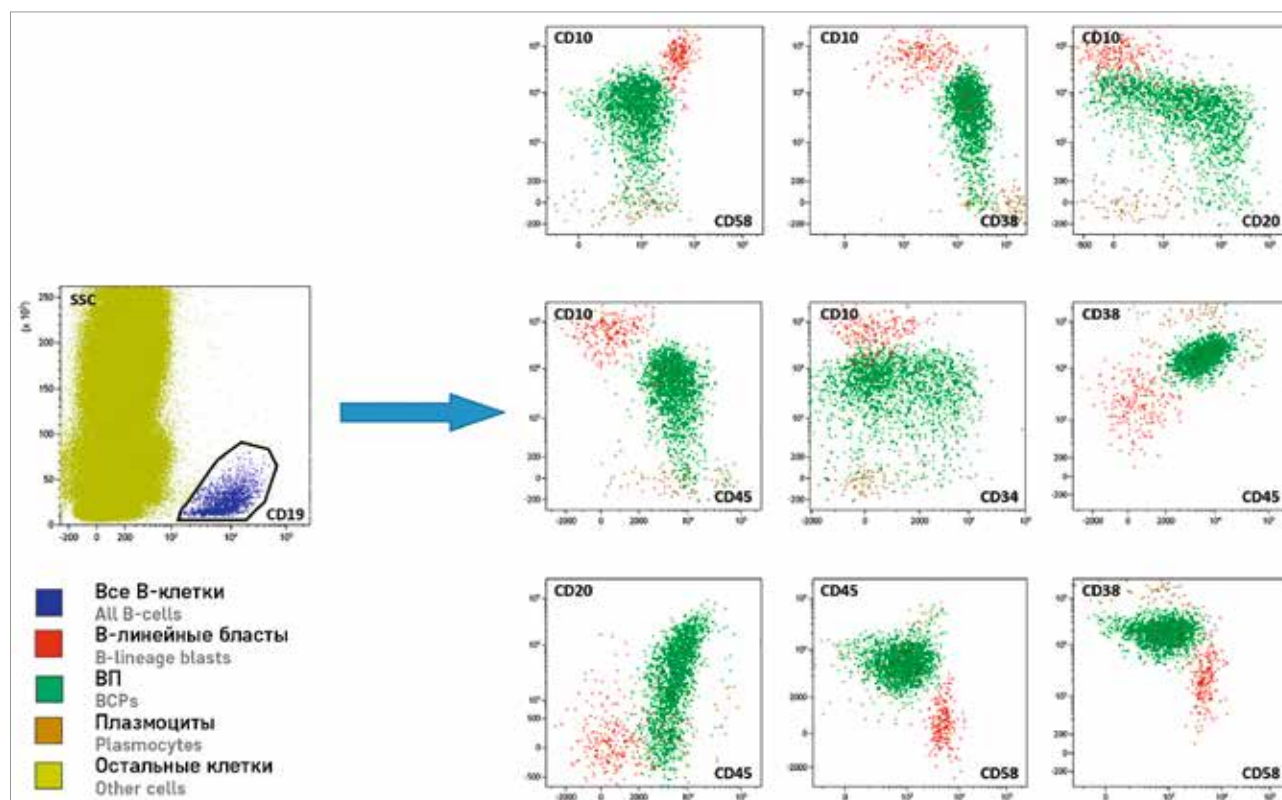
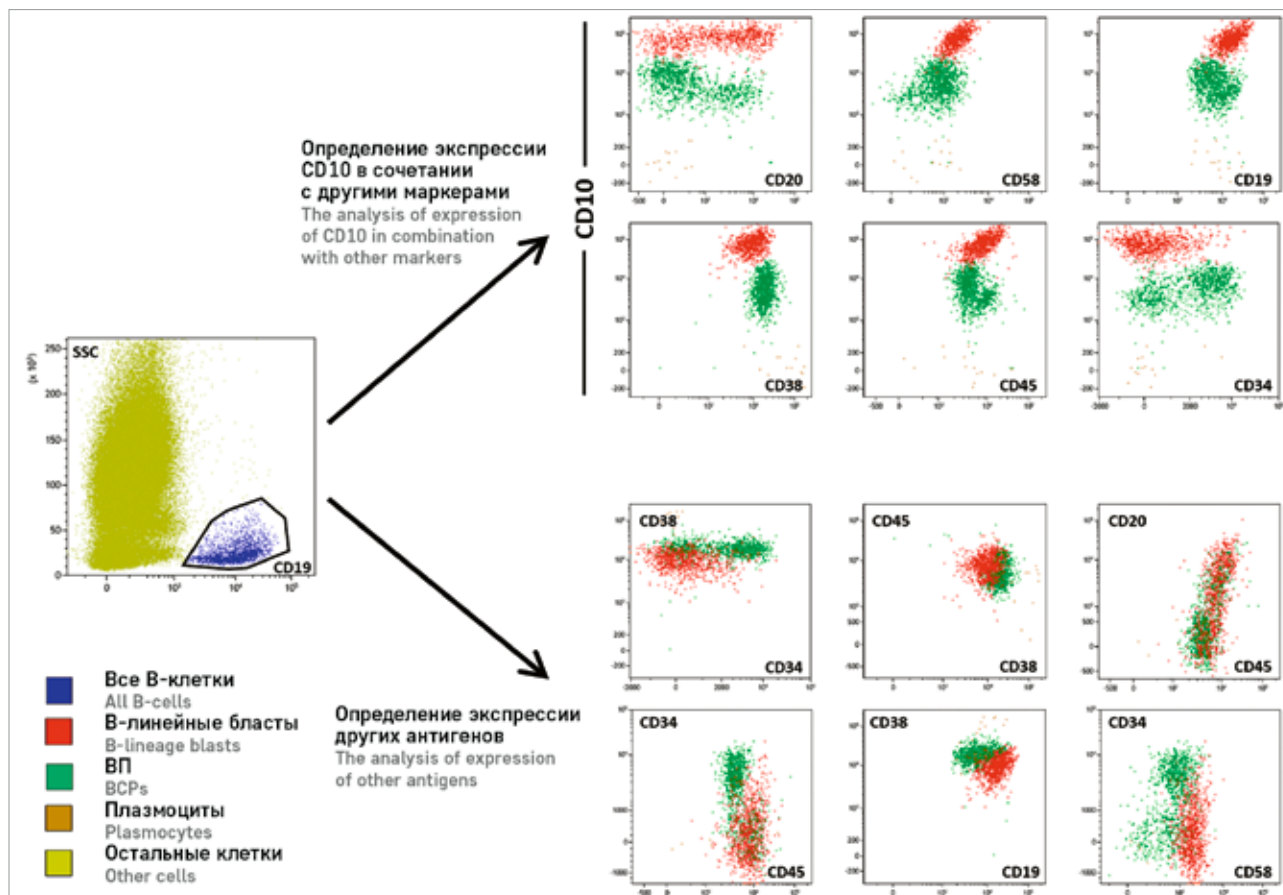


Рисунок 3

Пример выявления остаточных опухолевых клеток на фоне выраженной В-линейной регенерации, демонстрирующий возможность четкого выделения МОБ именно на основе экспрессии CD10, в то время как различия в экспрессии сочетаний других антигенов не столь очевидны

Figure 3

Identification of residual tumor cells during active B-cell regeneration. Here, it is shown that accurate MRD detection is possible based specifically on CD10 expression, while differences in the expression of combinations of other antigens are not so obvious



ления МОБ на 36-й день терапии (окончание индукционной терапии протокола ОЛЛ-МБ 2015) у детей с CD10⁺ и CD10 ВП-ОЛЛ представлены на *рисунке 4* и *рисунке 5* соответственно.

Клиническая интерпретация результатов определения МОБ может быть проведена только по совокупности всех клинических и лабораторных данных, а также с учетом используемого протокола терапии и возможностей дальнейшей модификации лечения. Обычно она производится даже не напрямую лечащим врачом, а в рамках коллегиального обсуждения клинических и лабораторных специалистов, а также представителей мультицентровой кооперативной группы того протокола, по которому пациент получает лечение. Продолжительность мониторинга МОБ целиком определяется правилами протокола терапии и научного исследования, в рамках которых проводится ее определение. Пример долгого сохранения МОБ на фоне химиотерапии с дальнейшим достижением МОБ-негативности после применения CD19-направленной иммунотерапии показан на *рисунке 6*.

Формат заключения

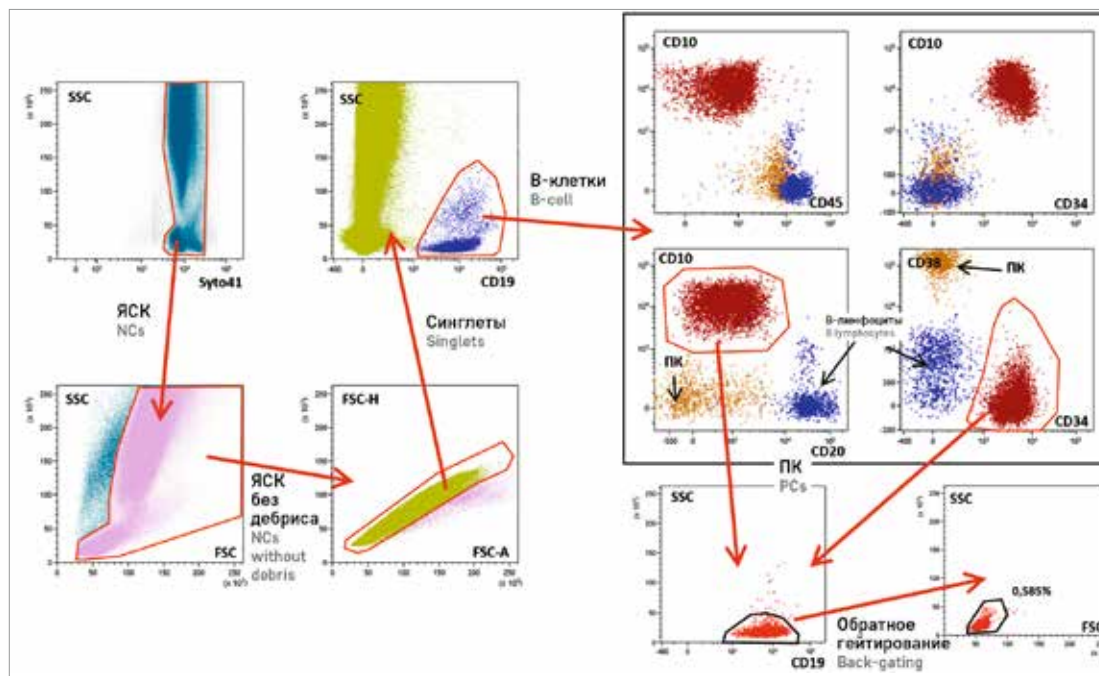
Заключение, выдаваемое по результатам проведенного исследования, кроме стандартных данных пациента должно также содержать информацию о проводимой терапии и этапе лечения. Как и при первичном иммунофенотипировании, заключение должно быть максимально кратким и информативным и не содержать ни ненужной для клинической интерпретации количественной информации, ни каких-либо текстовых рассуждений описательного характера. Помимо процентного содержания опухолевых клеток в заключении также рекомендуется указывать процентное содержание нормальных ВП в образце для исключения подозрения на рецидив на основании данных миелограммы в случае накопления в КМ большого количества регенераторных бластных клеток. Не рекомендуется отдельно указывать индивидуальную чувствительность определения МОБ в данном образце, поскольку это не несет никакой содержательной клинической информации, однако может вызывать дополнительные сложности при интерпретации заключения лечащим доктором.

Рисунок 4

Пример полного анализа цитометрических данных для выявления МОБ на 36-й день терапии (окончание индукционной терапии по протоколу ОЛЛ-МБ 2015) у пациента с CD10⁺ ВП-ОЛЛ
Популяции клеток при последовательном выделении обозначены разными цветами, финальная опухолевая популяция показана красным. Отдельно цветами показаны зрелые В-лимфоциты и ПК

Figure 4

A complete analysis of flow cytometry data for MRD detection on Day 36 of treatment (the end of induction therapy in accordance with the ALL-MB-2015 protocol) in a patient with CD10⁺ BCP-ALL
Sequentially identified cell populations are represented by different colors, the final tumor population is shown in red. Mature B-lymphocytes and plasma cells (PCs) are represented by separate colors. NCs – nucleated cells

**Рисунок 5**

Пример полного анализа цитометрических данных для выявления МОБ на 36-й день терапии (окончание индукционной терапии протокола ОЛЛ-МБ 2015) у пациента с CD10⁻ ВП-ОЛЛ
Популяции клеток при последовательном выделении показаны разными цветами, финальная опухолевая популяция обозначена красным. Отдельно цветом показаны ПК. НС – результаты неспецифического связывания антител

Figure 5

A complete analysis of flow cytometry data for MRD detection on Day 36 of treatment (the end of induction therapy in accordance with the ALL-MB-2015 protocol) in a patient with CD10⁻ BCP-ALL
Sequentially identified cell populations are represented by different colors, the final tumor population is shown in red. PCs are represented by a separate color. NSB – the results of non-specific binding of antibodies

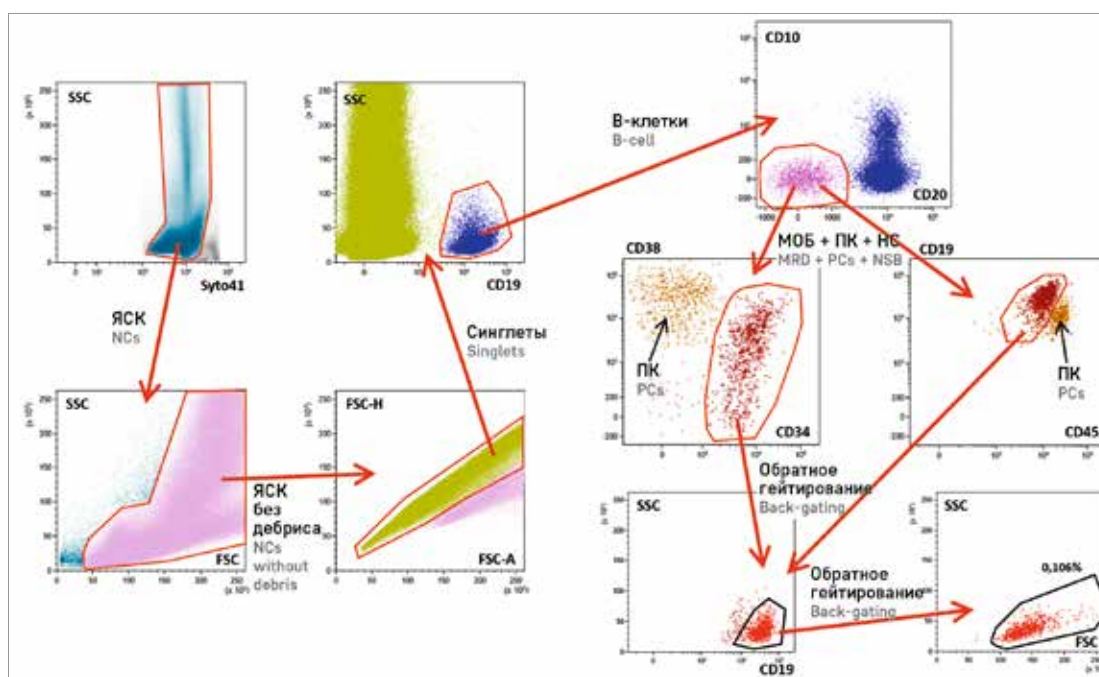
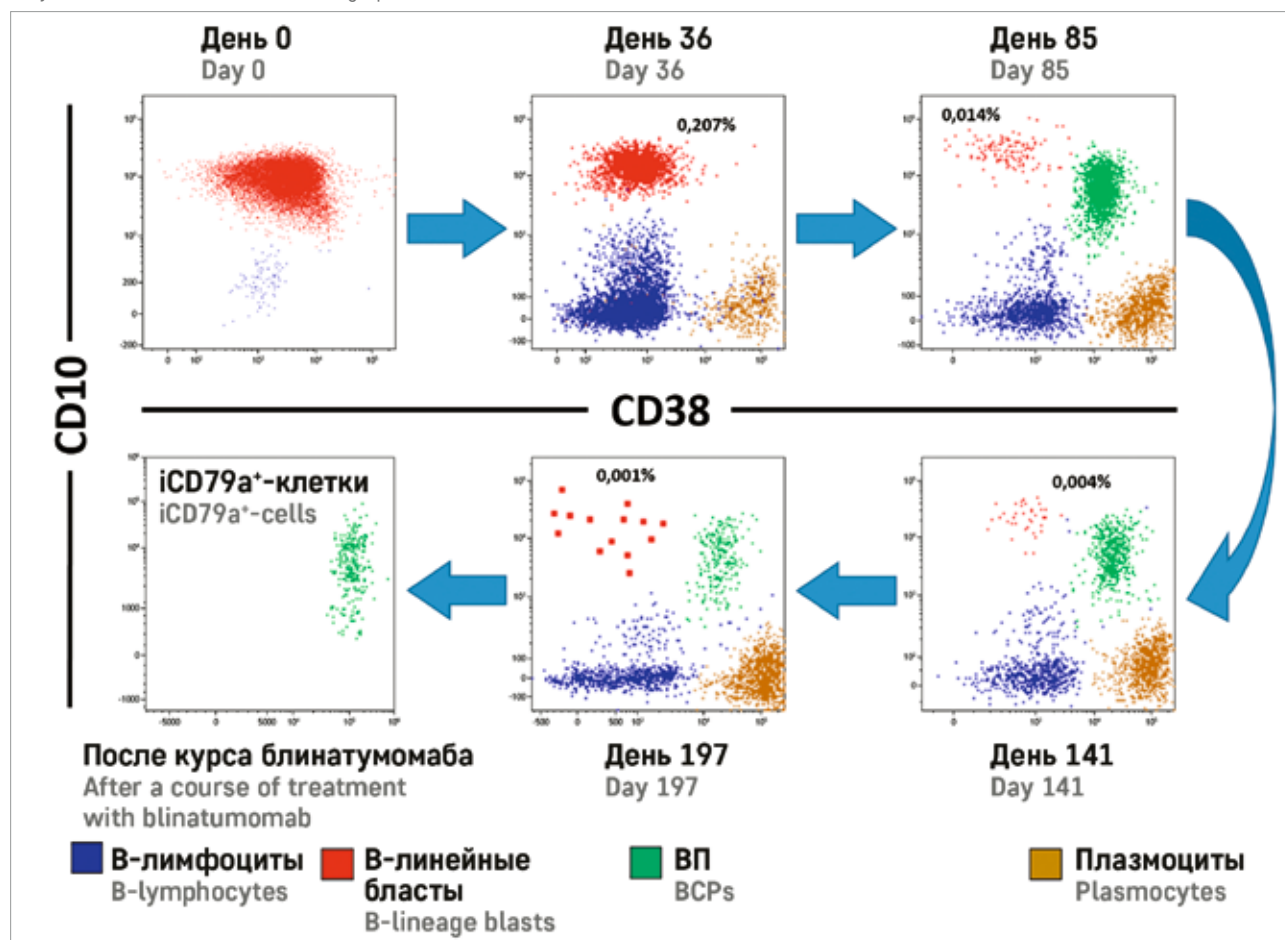


Рисунок 6

Пример долгого сохранения МОБ на фоне химиотерапии (протокол ОЛЛ-МБ 2015) с дальнейшим достижением МОБ-негативности после применения CD19-направленной иммунотерапии (блинатумомаб)
Отображены только CD19⁺-клетки (на последнем графике – iCD79a⁺-клетки)

Figure 6

Long-term persistence of MRD during chemotherapy (according to the ALL-MB-2015 protocol) with eventual achievement of MRD negativity following CD19-targeted immunotherapy (blinatumomab)
Only CD19⁺-cells are shown (the last graph shows iCD79a⁺-cells)



Подразумевается, что минимальная чувствительность достигнута для МОБ-негативного результата и не имеет значения для МОБ-позитивного (см. выше). В случае недостаточной клеточности образца и, как следствие, невозможности достичь необходимой чувствительности при негативном результате исследования данная недостаточная чувствительность должна быть отражена в комментариях к заключению. В случае, если дальнейшим этапом терапии для пациента предполагается использование таргетных препаратов, экспрессия потенциальных терапевтических мишеней также должна быть указана в заключении в необходимом формате (процентное содержание позитивных клеток или среднее количество молекул на клетку). Клиническая интерпретация результатов определения МОБ в рамках заключения по проведению исследования недопустима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в данной работе подходы к мониторингу МОБ позволяют эффективно применять проточную цитометрию для оценки ВП-ОЛЛ у пациентов любых возрастных групп как в локальных лабораториях, так и в рамках крупных многоцентровых исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

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

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

Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>

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

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

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., 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.
- Brüggemann M., Schrauder A., Raff T., Pfeifer H., Dworzak M., Ottmann O.G., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Berry D.A., Zhou S., Higley H., Mukundan L., Fu S., Reaman G.H., et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017; 3 (7): e170580.
- Pui C.H., Pei D., Coustan-Smith E., Jeha S., Cheng C., Bowman W.P., et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. *Lancet Oncol* 2015; 16 (4): 465–74.
- Borowitz M.J., Wood B.L., Devidas M., Loh M.L., Raetz E.A., Salzer W.L., et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 2015; 126 (8): 964–71.
- Modvig S., Hallbook H., Madsen H.O., Siitonen S., Rosthøj S., Tierens A., et al. Value of flow cytometry for MRD-based relapse prediction in B-cell precursor ALL in a multicenter setting. *Leukemia* 2021; 35 (7): 1894–906.
- Toft N., Birgens H., Abrahamson J., Giskevicius L., Hallbook H., Heyman M., et al. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1–45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2018; 32 (3): 606–15.
- Румянцев А.Г., Карачунский А.И. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2009; 88 (4): 19–27.
- Паровичникова Е.Н., Алешина О.А., Троицкая В.В., Чабаяева Ю.А., Соколов А.Н., Исинова Г.А. и др. Сравнение результатов лечения взрослых больных острыми Ph-негативными лимфобластными лейкозами по протоколам Российских многоцентровых исследований «ОЛЛ-2009» и «ОЛЛ-2016». *Гематология и трансфузиология* 2022; 67 (4): 460–77.
- Цаур Г.А., Ригер Т.О., Попов А.М., Кустанович А.М., Ольшанская Ю.В., Наседкина Т.В. и др. Прогностическая роль различных перестроек 11q23/KMT2A у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2021; 20 (1): 27–39.
- Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Верзбицкая Т.Ю., Мовчан Е.В., Фадеева М.И. и др. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с B-линейным острым лимфобластным лейкозом. *Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы. Онкогематология* 2016; 11 (4): 64–73.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. One-point flow cytometric MRD measurement to identify children with excellent outcome after intermediate-risk BCP-ALL: results of the ALL-MB 2008 study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023; 149 (8): 4629–37.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. A single flow cytometric MRD measurement in children with B-lineage acute lymphocytic leukemia and hyperleukocytosis redefines the requirements of high-risk treatment: Results of the study ALL-MB 2008. *Leuk Res* 2022; 123: 106982.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. A simple algorithm with one flow cytometric MRD measurement identifies more than 40% of children with ALL who can be cured with low-intensity therapy. The ALL-MB 2008 trial results. *Leukemia* 2022; 36 (5): 1382–5.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Verzhbitskaya T., Boyakova E., et al. Flow cytometric MRD at the end of consolidation in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia has significant prognostic value but limited clinical implications.

- tions: Results of study ALL-MB 2008. *Leuk Res* 2022; 125: 106998.
23. Popov A., Henze G., Roumiantseva Y., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. Low-intensity therapy cures over 40% of children with rapid Flow-MRD responding ALL: the ALL-MB 2008 trial results. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (2): 95–104.
 24. Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. A simple procedure to identify children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia who can be successfully treated with low or moderate intensity: Sequential versus single-point minimal residual disease measurement. *Pediatr Blood Cancer* 2023; 70 (6): e30295.
 25. Popov A., Buldini B., De Lorenzo P., Disaro S., Verzhbitskaya T., Movchan L., et al. Prognostic value of minimal residual disease measured by flow-cytometry in two cohorts of infants with acute lymphoblastic leukemia treated according to either MLL-Baby or Interfant protocols. *Leukemia* 2020; 34 (11): 3042–6.
 26. 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* 2023; 201 (3): 510–9.
 27. Popov A., Tsaur G., Permikin Z., Henze G., Verzhbitskaya T., Plekhanova O., et al. Genetic characteristics and treatment outcome in infants with *KMT2A* germline B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results of MLL-Baby protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2023; 70 (4): e30204.
 28. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L., Razzouk B.I., Ribeiro R.C., Rivera G.K., et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100 (7): 2399–402.
 29. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г., Шестопалов А.В., Плясунова С.А. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология* 2016; 9 (3): 302–13.
 30. Lucio P., Parreira A., van den Beemd M.W., van Lochem E.G., van Wering E.R., Baars E., et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13 (3): 419–27.
 31. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Савельев Л.И., Фечина Л.Г. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Иммунология* 2010; 31 (6): 299–303.
 32. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Цвиренко С.В., Савельев Л.И. 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.
 33. 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.
 34. Михайлова Е.В., Илларионова О.И., Масчан М.А., Новичкова Г.А., Карачунский А.И., Попов А.М. Рекомендации по определению минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при остром В-лимфобластном лейкозе в условиях применения CD19-направленной терапии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (2): 175–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-175-184
 35. Gaipa G., Basso G., Maglia O., Leoni V., Faini A., Cazzaniga G., et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005; 19 (1): 49–56.
 36. Gaipa G., Basso G., Aliprandi S., Migliaiavacca M., Vallinoto C., Maglia O., et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74 (3): 150–5.
 37. Dworzak M.N., Gaipa G., Schumich A., Maglia O., Ratei R., Veltroni M., et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78 (3): 147–53.
 38. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Савельев Л.И., Фечина Л.Г. 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; 31 (2): 60–4.
 39. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P., Zhou Y., Pui C.H., Rivera G.K., 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.
 40. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D., Mann G., Potschger U., Muhlegger N., et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99 (6): 1952–8.
 41. Михайлова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Румянцева Ю.В., Илларионова О.И., Семченкова А.А., Фечина Л.Г. и др. Влияние режима приема дексаметазона на выявление нормальных В-клеточных предшественников в костном мозге у детей с острым лимфобластным лейкозом на момент окончания индукционной терапии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (1): 53–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57