

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 01.10.2023
Принята к печати 02.11.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-4-186-205

Рекомендации по применению проточной сортировки клеток в диагностике и мониторинге острых лейкозов

А.А. Семченкова, О.И. Илларионова, И.А. Дёмина, Е.В. Михайлова, Е.А. Зеркаленкова,
Е.С. Захарова, В.В. Бриллиантова, А.И. Карачунский, М.А. Масчан, Г.А. Новичкова,
А.М. Попов

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

Контактная информация:

Семченкова Александра Александровна,
научный сотрудник лаборатории
иммунофенотипирования гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: semalex94@mail.ru

Клеточная сортировка – высокотехнологичный лабораторный метод, сочетающий в себе аналитические возможности проточной цитометрии с функцией выделения чистых клеточных популяций из гетерогенного образца. Он обладает огромным потенциалом для применения не только в фундаментальных исследованиях, но и в различных областях лабораторной диагностики. В частности, сочетание сортировки клеток с последующими молекулярно-генетическими исследованиями можно использовать для уточнения неоднозначных результатов иммунофенотипирования острых лейкозов как при первичной диагностике, так и в мониторинге минимальной остаточной болезни. Данные рекомендации основаны на опыте включения сортировки в диагностический и мониторинговый процесс лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В них описаны методики, используемые для подтверждения цитометрических данных в зависимости от типа лейкоза, этапа цитометрического исследования, предшествующей терапии, а также алгоритмы применения сортировки клеток в диагностическом поиске и нюансы пробоподготовки для сортировки клеток для различных молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: острый лейкоз, проточная сортировка, иммунофенотипирование, минимальная остаточная болезнь

Семченкова А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (4): 186–205. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-4-186-205

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 01.10.2023
Accepted 02.11.2023

Guidelines for the use of flow cell sorting in diagnosis and monitoring of acute leukemia

A.A. Semchenkova, O.I. Illarionova, I.A. Demina, E.V. Mikhailova, E.A. Zerkalnikova, E.S. Zakharova,
V.V. Brilliantova, A.I. Karachunskiy, M.A. Maschan, G.A. Novichkova, A.M. Popov

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

Flow cell sorting is an advanced laboratory technique that combines the analytical capabilities of flow cytometry with the ability to isolate pure cell populations from heterogeneous samples. It has tremendous potential both for fundamental research and laboratory diagnosis. For example, the combination of cell sorting and molecular genetic studies can be used to clarify ambiguous results of acute leukemia immunophenotyping obtained both at diagnosis and during minimal residual disease monitoring. These guidelines are based on years of experience in incorporating cell sorting into the diagnostic and monitoring processes at the Leukemia Immunophenotyping Laboratory of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. They include methods used for the confirmation of flow cytometry data depending on the type of leukemia, the stage of a flow cytometry assay and previous therapy. They also describe cell sorting algorithms for disease diagnosis and the specifics of sample preparation for cell sorting in different molecular genetic studies.

Key words: acute leukemia, flow cell sorting, immunophenotyping, minimal residual disease

Semchenkova A.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 186–205.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-186-205

Сортировка клеток, основанная на принципах проточной цитометрии, предполагает физическое отделение, или очистку, определенной клеточной популяции от остальных клеток в суспензии в целях проведения с ней дальнейших экспериментальных процедур [1]. В настоящее время клеточные сортеры являются высокотехнологич-

ными приборами, способными выделять несколько клеточных популяций одновременно на основании их иммунофенотипа и некоторых физических параметров [1]. Благодаря целому ряду преимуществ перед другими методами очистки клеток – высокой скорости, производительности и чистоте итоговых популяций – проточная клеточная сортировка

стала чрезвычайно распространенной технологией в биологических исследованиях [2–8]. Однако из фундаментальных исследований клеточные сортеры постепенно переходят в область рутинной лабораторной практики. Одной из потенциальных сфер использования клеточной сортировки является лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний, в том числе острых лейкозов (ОЛ). Сочетание сортировки с различными молекулярно-генетическими исследованиями выделенных клеток позволяет получить дополнительную, зачастую клинически значимую диагностическую информацию [2, 5, 9–13].

Имунофенотипирование методом проточной цитометрии является крайне надежным методом для выявления blastов при ОЛ, установления их линейной принадлежности и мониторинга эффективности противоопухолевой терапии с помощью оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) [14]. Однако даже при условии качественного выполнения цитометрического исследования не всегда можно составить заключение об опухолевой природе той или иной клеточной популяции, основываясь исключительно на ее иммунофенотипе. Опухолевые бласты могут не обладать явными антигенными аберрациями, кроме того, анализируемый образец может быть низкого качества (например, если исследованию предшествует длительная транспортировка материала), а доля предполагаемой опухоли среди всех клеток может быть небольшой. Отдельно стоит учитывать эффект проводимой терапии, оказываемый на антигенный профиль как опухолевых, так и нормальных клеток костного мозга (КМ) [15–18]. Во всех этих случаях может потребоваться дополнительное подтверждение результатов иммунофенотипического исследования. Для того чтобы определить, является ли клеточная популяция опухолевой, ее можно выделить из образца и проанализировать при помощи одного или нескольких молекулярно-генетических методов [12]. Выбор подходящего метода будет зависеть от ряда факторов: линейной принадлежности интересующей популяции, ее количества в образце, предшествующей терапии и т. д. В данной методической работе описаны условия пробоподготовки и анализа данных для сортировки, а также отражены рекомендации по выбору методики для анализа изолированных клеточных популяций.

Условия результативного включения проточной клеточной сортировки в процесс диагностики и мониторинга острых лейкозов

Для успешного применения проточной сортировки клеток в диагностике и мониторинге ОЛ необходимо четко понимать, что данная технология является, по сути, связующим звеном между иммунофенотипированием методом проточной

цитометрии и различными цитогенетическими и молекулярно-генетическими технологиями. Поэтому только максимально точное иммунофенотипирование и квалифицированное выполнение генетических исследований делают применение сортировки целесообразным и осмысленным. Для того чтобы совокупность иммунофенотипирования, клеточной сортировки и генетических технологий позволила получить необходимый результат, должны быть выполнены следующие условия:

- правильная постановка задачи;
- адекватный подбор панели антител;
- высокая квалификация всех участников исследования;
- правильное гейтирование;
- отработанная и надежная методика анализа полученной популяции (все этапы).

Выполнение данных условий возможно только в условиях тесного взаимодействия специалистов по иммунофенотипированию, цитогенетическим и молекулярно-генетическим технологиям, а также врачей-клиницистов.

Кроме того, для точного выделения даже очень маленьких клеточных популяций должны быть выполнены и технические условия грамотного проведения сортировки:

- пробоподготовка, подходящая под целевое исследование (наличие/отсутствие фиксатора, специальный буфер и т. д.);
- гомогенный образец, свободный от клеточных конгломератов;
- подходящий диаметр сортировочной апертуры и скорость сортировки;
- правильные настройки жидкостной системы и оптимизированные параметры сортировки.

Общие принципы пробоподготовки для клеточной сортировки

Подготовка образца для сортировки включает в себя все основные этапы пробоподготовки для стандартного анализа методом проточной цитометрии: окрашивание флуоресцентно-мечеными моноклональными антителами (МкАТ), лизис эритроцитов, отмывка готового образца от клеточного дебриса [19, 20]. Для сортировки берется по возможности та же пробирка с биоматериалом, которая использовалась для иммунофенотипирования. Количество образца, забираемого из пробирки для окрашивания, подбирается индивидуально, исходя из соотношения 3 параметров:

- клеточность образца (содержание лейкоцитов);
- процентное содержание интересующей популяции среди всех клеток исследуемого образца;
- чувствительность выбранного метода анализа сортированных клеток.

При расчете количества вносимого образца также стоит учитывать неизбежные потери целевой популяции за счет выбранного режима сортировки, центрифугирования образца при отмывках и т. д. Диагностические образцы чаще всего отличаются высоким бластозом, поэтому большое количество материала для проведения сортировки не требуется. В случае с образцами, исследуемыми на наличие МОБ, процент интересующей популяции обычно низкий, поэтому рекомендуется последовательное окрашивание нескольких объемов материала, чтобы получить достаточное количество клеток.

Как правило, при иммунофенотипировании ОЛ используются широкие панели антител. В диагностике это обусловлено тем, что кроме маркеров, необходимых для определения линейной принадлежности опухолевых бластов, в исследование включаются маркеры для подробной классификации ОЛ, а также многоцветные комбинации, применяемые в последующем мониторинге МОБ [19]. Для сортировки клеток столь многоцветное окрашивание в подавляющем большинстве случаев избыточно. Для выделения интересующей популяции обычно требуется от 2 до 4 маркеров. В более редких случаях, когда нужные клетки четко могут быть выделены только на основании анализа экспрессии множества антигенов или необходимо выделить сразу несколько популяций клеток, допустимо использовать многоцветную панель MkAT и для сортировки. Однако в таком случае точная настройка напряжений и компенсаций прибора принципиально важна, поскольку графики, получа-

емые на цитометре и сортере, должны быть максимально сравнимы. По той же причине приветствуется использование одинаковых флуоресцентно-меченых MkAT при выполнении 2 данных исследований.

Лизис эритроцитов может быть осуществлен как до окрашивания, так и после. Однако на данном этапе важно учитывать тип молекулярно-генетического исследования, следующего за сортировкой (таблица), так как некоторые из них исключают использование фиксаторов (например, параформальдегида) в пробоподготовке. Многие коммерческие лизирующие буферы, используемые в проточной цитометрии, содержат фиксирующий агент. То же касается пермеабилизирующих наборов для проведения внутриклеточного окрашивания – большинство из них предусматривают этап фиксации, что может помешать анализу клеток.

Все отмывки и итоговое ресуспендирование клеточного осадка осуществляются в фосфатно-солевом буфере или бессывороточной культуральной среде с низким содержанием ионов кальция и магния для предотвращения клеточной адгезии.

Результативная сортировка клеток может быть проведена только из образца, свободного от клеточных конгломератов, высвободившейся ДНК, большого количества клеточного дебриса и т. д. Непосредственно перед сортировкой готовый образец всегда необходимо пропускать через клеточный фильтр с порами 70–100 мкм. Это предотвратит засорение прибора во время сортировки.

Таблица

Молекулярно-генетические методы, используемые в комбинации с проточной клеточной сортировкой для подтверждения опухолевой природы клеток, определенных с помощью проточной цитометрии

Table

Molecular genetic methods applied in combination with flow cell sorting for the confirmation of the malignant nature of cells identified by flow cytometry

Метод Method	Тип ОЛ Type of AL	Тип исследования Type of investigation	Минимальное количество клеток Minimum number of cells	Фиксация при пробоподготовке Fixation during sample preparation
FISH	ОЛЛ ОМЛ ОЛСФ ALL AML MPAL	Диагностика* Мониторинг МОБ Diagnosis* MRD monitoring	10 000	Допустимо Acceptable
ПЦР химерного транскрипта PCR of fusion gene transcripts	ОЛЛ ОМЛ ОЛСФ ALL AML MPAL	Диагностика* Мониторинг МОБ Diagnosis* MRD monitoring	100 000	Недопустимо Not acceptable
Анализ клональных перестроек генов IG/TCR Analysis of clonal IG/TCR gene rearrangements	ОЛЛ ОЛСФ ALL MPAL	Диагностика Мониторинг МОБ Diagnosis MRD monitoring	600	Недопустимо Not acceptable
Анализ гемопоэтического химеризма Analysis of hematopoietic chimerism	ОЛЛ ОМЛ ОЛСФ ALL AML MPAL	Мониторинг МОБ** MRD monitoring**	500	Недопустимо Not acceptable

Примечание. FISH – флуоресцентная in situ гибридизация; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ОЛСФ – ОЛ смешанного фенотипа. * – выполнимо при условии известных хромосомных перестроек; ** – только для пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК)
Notes. FISH – fluorescence in situ hybridization; AL – acute leukemia; PCR – polymerase chain reaction; ALL – acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia; MPAL – mixed-phenotype acute leukemia; MRD – minimal residual disease. * – is feasible in case of known chromosomal rearrangements; ** – only for patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)

Особенности пробоподготовки для конкретных типов исследований описаны в соответствующих разделах.

Настройка проточного клеточного сортера

Существует несколько критически важных этапов настройки для адекватной работы клеточного сортера. Настройка аналитической составляющей данного прибора выполняется в соответствии с процедурами, предписанными для настройки проточных цитометров. Она включает в себя периодическую оценку стабильности оптической системы при помощи калибровочных частиц, а также регулировку чувствительности детекторов флуоресценции и цифровой компенсации свечения флуорохромов. Основные аспекты настройки проточных цитометров были подробно описаны ранее [19]. Несмотря на то, что клеточный сортер, как правило, не используется в качестве прибора для непосредственного анализа образцов, качественная настройка чувствительности детекторов и компенсации необходима для максимальной сопоставимости графиков, получаемых на сортере и проточном цитометре. При многоцветном окрашивании этот этап становится критически важным, так как напрямую влияет на точность выделения интересующей клеточной популяции.

Есть также ряд специфичных для сортеров параметров, требующих регулярной настройки перед началом сортировки. Главный из них – параметр задержки отрыва капли. Он отражает время между пересечением клеткой лазерного луча и ее отделением от основного потока в составе капли. Опираясь на это значение, прибор придает электрический заряд капле с нужной клеткой, чтобы, проходя через электростатическое поле, она могла отклониться в пробирку. Данный параметр имеет решающее значение для обеспечения сортировки правильных капель и, следовательно, правильных клеток. Для его настройки требуются флуоресцентно-меченые частицы от фирмы-производителя самого прибора. В большинстве клеточных сортеров данный шаг полностью или практически полностью автоматизирован.

Также пользователю необходимо настроить степень отклонения заряженных капель для того, чтобы они попадали ровно в центр принимающей пробирки или в нужный участок предметного стекла. Критичность этого шага обусловлена быстрым испарением капель в случае попадания на сухой участок. В некоторых приборах угол отклонения зафиксирован и не требует настройки.

Для каждого образца выбирается подходящий режим сортировки. Существует 2 основных режима,

универсальных для большинства приборов, – обогащение и точность. Первый режим обеспечивает сортировку любых капель, содержащих интересные клетки, независимо от того, присутствуют ли в них посторонние клетки. Режим обогащения обеспечивает высокий клеточный выход, но несколько сниженную итоговую чистоту выделенной популяции. Режим точности обеспечивает максимальную чистоту (более 99%) за счет того, что сортируются капли, гарантированно содержащие только интересующие клетки. Существуют также «промежуточные» режимы сортировки. Выбор режима сортировки зависит в первую очередь от требований к степени чистоты, обусловленной дальнейшим молекулярно-генетическим исследованием, и во вторую – содержанием клеток в образце и необходимым выходом. Во время сортировки также нужно следить за показателем эффективности, подразумевающим, какой процент от детектированных прибором клеток был в действительности отсортирован, и не допускать его падения ниже 80% во избежание значительных потерь в количестве клеток.

От размера сортируемых клеток зависит диаметр форсунки, через которую проходит поток образца (сортировочной апертуры). Форсунки могут быть сменными. Диаметр должен в 4–5 раз превышать размер сортируемых клеток. Следует помнить, что с увеличением диаметра значительно падают частота генерации капель и давление проточной жидкости, а значит, и скорость сортировки.

Анализ образцов и гейтирование клеточной популяции для сортировки

Последовательность действий при выделении интересующей популяции клеток аналогична последовательности, применяемой для цитометрического анализа [19–21]. Сначала на двухпараметрическом точечном графике прямого и бокового светорассеяния (англ. forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC)) из анализа исключается клеточный дебрис. Затем на графике, отображающем FSC в формате площади пика (FSC-A) и в формате высоты (FSC-H) или ширины (FSC-W) пика, исключаются конгломераты клеток [1]. Далее выделение нужного региона и его уточнение происходят по аналогии с предыдущим анализом того же образца на проточном цитометре. Особенность гейтирования для сортировки заключается в том, что регион для выделения интересующей популяции должен по возможности включать только ее середину, чтобы исключить попадание посторонних клеток. В случае, когда требуется сортировать клетки из одной популяции, но с разной степенью экспрессии какого-либо маркера, необходимо расположить регионы как можно дальше друг от друга, чтобы избежать перекрестной контаминации.

Молекулярно-генетические методы, используемые для подтверждения результатов диагностического и мониторингового иммунофенотипирования острых лейкозов

Рассмотрим методики, применимые для подтверждения лейкомической природы сортированных клеточных популяций, а также соответствующие особенности пробоподготовки и условия сортировки. Большинство описанных в данной работе методов входят в стандартную лабораторную диагностику ОЛ и мониторинг пациентов в процессе терапии [22]. При работе с сортированными клетками пробоподготовка может несколько отличаться от стандартной. Выбор подходящей методики должен проводиться только среди технологий, отработанных в данной лаборатории для применения именно в сортированных клетках. При сомнении в эффективности любой из методик именно для данного материала следует выбирать из более надежных технологий.

Анализ специфических хромосомных aberrаций методом FISH

Суть метода. Данная методика наряду со стандартным кариотипированием применяется для установления характерных хромосомных перестроек на этапе диагностики пациентов с ОЛ. При необходимости поиск специфичных для пациента aberrаций можно провести в изолированных клеточных популяциях КМ. Данный метод подходит для исследования сортированных клеток при ОЛ любого типа (ОЛЛ или ОМЛ) и на любом этапе терапии. Кроме того, FISH является самым специфичным методом для подтверждения опухолевого происхождения клеток.

Особенности пробоподготовки. Подбор МкАТ в условиях сортировки клеток для данной методики является самым критичным этапом пробоподготовки. Яркие и стабильные флуорофоры, излучающие в том же диапазоне свечения, что и флуорофоры гибридационных ДНК-зондов, могут помешать интерпретации результатов FISH. Использование фиксирующих агентов в процессе лизиса эритроцитов или пермеабилзации клеточной мембраны для внутриклеточного окрашивания допустимо. Отмывки и итоговое ресуспендирование клеточного осадка проводятся в бессывороточной культуральной среде. Сама сортировка может осуществляться и непосредственно на предметные стекла при наличии такой опции, однако предпочтительно – в пробирки с культуральной средой, которые затем центрифугируются для осаждения клеток, после чего осадок переносится на предметное стекло. Последний способ предпочтительнее, потому что позволяет равномернее распределить клетки по стеклу и избе-

жать преждевременного высыхания капли в процессе сортировки. Сортировку каждой популяции рекомендовано проводить в 2 повторях. Стекла необходимо высушивать на свету в течение 48 ч для выцветания флуорофоров.

Ограничения метода. Существенных ограничений в применении данного метода нет. В условиях анализа изолированной клеточной популяции FISH обладает высокой чувствительностью и способностью детектировать наличие хромосомных перестроек даже в единичных клетках. Учитывая специфику подготовки стекол для исследования, для получения надежного результата желательно выделять, по крайней мере, 10 тыс. клеток интересующей популяции. Тем не менее, если выход клеток ожидается ниже указанного, метод FISH все еще может быть информативен.

Анализ экспрессии химерного гена методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Суть метода. Количественный анализ химерного транскрипта, образующегося в результате специфической хромосомной перестройки, стандартно выполняется при диагностике ОЛ и является одной из распространенных технологий мониторинга МОБ [23–26]. По аналогии с методом FISH может быть выполнен в изолированных клеточных популяциях. Подходит для исследования сортированных клеток при ОЛ любого типа и на любом этапе терапии.

Особенности пробоподготовки. Единственным обязательным условием подготовки образцов к сортировке для данного типа исследования является отсутствие фиксирующих растворов. Отмывки и итоговое ресуспендирование проводятся в фосфатно-солевом буфере. Сортировка осуществляется также в фосфатно-солевой буфер или в буфер, подходящий для последующего выделения РНК.

Ограничения метода. Сортировка должна быть проведена не позднее чем через 48 ч после взятия образца, так как длительное хранение биоматериала способствует деградации РНК. Наряду с технологией FISH ПЦР химерного транскрипта является самым специфичным методом для анализа сортированных популяций. Однако его чувствительность является самой низкой среди представленных методов – минимальное количество клеток, достаточное для прохождения реакции, составляет приблизительно 100 тыс.

Анализ клональных реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов

Суть метода. Реаранжировки генов иммуноглобулинов (IG) и Т-клеточных рецепторов (TCR) происходят на ранней стадии развития лимфоцитов, приводя к появлению уникального набора перестроек для каждой из клеток. Их оценка в отдельно взятой

лимфоидной популяции может дать информацию о количестве содержащихся в ней клонов – потомков одной клетки. При исследовании клональности В- и Т-лимфоцитов определяют реаранжировки генов тяжелых (*IGH*) и легких (*IGK*, *IGL*) цепей иммуноглобулинов и генов бета (*TCRB*)-, гамма (*TCRG*)- и дельта (*TCRD*)-цепей Т-клеточных рецепторов. Исследование осуществляется при помощи мультиплексной ПЦР в сочетании с фрагментным анализом ДНК на капиллярных секвенаторах либо с вовлечением секвенирования следующего поколения. Оба подхода были стандартизованы и подробно описаны консорциумом EuroClonality (BIOMED-2) [27, 28]. Метод применим для установления природы клеток как на этапе диагностики, так и на любом этапе терапии.

Особенности пробоподготовки. Обязательным условием пробоподготовки к сортировке для данного типа исследования является отсутствие фиксирующих растворов. Отмывки и итоговое ресуспендирование проводятся в фосфатно-солевом буфере. Сортировка осуществляется также в фосфатно-солевой буфер или в буфер, подходящий для последующего выделения ДНК.

Ограничения метода. Метод подходит для исследования сортированных клеток только при ОЛЛ и ОЛСФ. Следует также учитывать, что клональная экспансия лимфоцитов может быть следствием реактивных процессов иммунного или аутоиммунного генеза, поэтому при интерпретации результатов данного исследования важно учитывать все имеющиеся данные, в том числе анамнестические. Для данного метода 600 клеток является нижним пределом чувствительности [11].

Анализ гемопоэтического химеризма

Суть метода. Для образцов, полученных от пациентов, перенесших аллогенную ТГСК, доступна оценка донорского химеризма в изолированной клеточной популяции. Мониторинг донорского химеризма в цельном КМ (либо в некоторых субпопуляциях) для оценки приживления трансплантата входит в стандарт наблюдения пациентов после аллогенной ТГСК. В основе данного анализа лежит, как правило, оценка участков ДНК с высоким полиморфизмом либо оценка биаллельных полиморфизмов InDel (инсерции-делеции) методом ПЦР [29]. Исследование химеризма в популяции, очищенной на клеточном сортере, дает дополнительную информацию о ее происхождении (от донора или самого пациента), что в совокупности с иммунофенотипическими признаками либо с результатами других методов исследования (например, определением клональности) может служить свидетельством ее лейкемической природы. Подходит для исследования сортированных клеток при ОЛ любого типа.

Особенности пробоподготовки. Обязательным условием пробоподготовки к сортировке для данного типа исследования является отсутствие фиксирующих растворов. Отмывки и итоговое ресуспендирование проводятся в фосфатно-солевом буфере. Сортировка осуществляется также в фосфатно-солевой буфер или в буфер, подходящий для последующего выделения ДНК.

Ограничения метода. Данный тип исследования подходит для верификации результатов оценки МОБ исключительно у пациентов после аллогенной ТГСК. Достоверные результаты были получены при анализе 500 выделенных клеток [10].

Особенности всех описанных методов суммированы в таблице.

Применение сортировки в диагностике острых лейкозов

Применение клеточной сортировки может существенно помочь в диагностике ОЛ, проводимой методом проточной цитометрии. Цитогенетический и/или молекулярно-генетический анализ выделенной клеточной популяции при диагностике ОЛ позволяет с высокой долей вероятности решить следующие задачи:

- уточнение наличия ОЛЛ;
- подтверждение наличия нескольких опухолевых популяций разной линейной дифференцировки;
- дифференциальная диагностика первичного Ph-позитивного ОЛЛ (Ph⁺ ОЛЛ) и бластного криза хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ);
- подтверждение рецидива ОЛ;
- дифференциальная диагностика рецидива ОЛ и развития второй гемопоэтической опухоли;
- выделение чистой опухолевой популяции при «малопрцентном» ОЛ для точной диагностики цитогенетического варианта ОЛ.

Уточнение наличия ОЛЛ

Сортировка в сочетании с молекулярно-генетическим анализом может помочь при подозрении на ОЛЛ в отсутствие очевидной опухолевой популяции или низком процентном содержании опухолевых клеток. Лейкемические бласты могут не иметь существенных иммунофенотипических отличий от аналогичной им популяции нормальных клеток. Например, клетки, в отношении которых возникают сомнения, могут не нести характерных антигенных aberrаций, а их распределение на цитометрических графиках – практически полностью совпадать с распределением нормальной клеточной популяции того же типа. Тем не менее незначительные отклонения от нормального антигенного профиля все же могут присутствовать, не позволяя вынести однозначного заключения о происхождении этих клеток. В таком случае вызы-

вающие подозрение клетки должны быть выделены при помощи клеточного сортера для исследования клональных реаранжировок генов *IG* и/или *TCR*. При этом можно выделить не только популяцию, в которой есть сомнения, но и нормальные клетки той же линейной принадлежности в качестве «негативного» поликлонального контроля. Пример такого исследования представлен на *рисунке 1*.

Обнаружение нескольких потенциально опухолевых популяций

Во время диагностического иммунофенотипирования наряду с очевидно опухолевыми клетками в образце может обнаруживаться популяция другой линейности, отличающаяся от нормальных

Рисунок 1

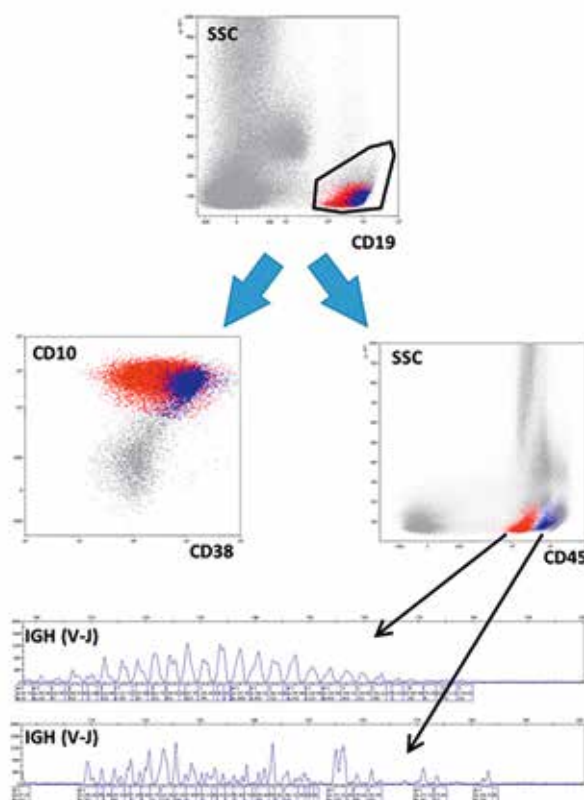
Уточнение диагноза ОЛЛ с помощью сортировки и анализа клональности

При обзорном иммунофенотипировании КМ обнаружена популяция В-клеток, имевшая незначительные отличия от нормального распределения В-линейных предшественников. Для уточнения клональной структуры эта популяция была выделена наряду с очевидными нормальными В-линейными предшественниками. Обе популяции оказались поликлональными. Красный цвет – предположительно опухолевые В-лимфобласты; синий цвет – нормальные В-линейные предшественники; серый цвет – остальные клетки

Figure 1

The clarification of ALL diagnosis using flow cell sorting and clonality analysis

General immunophenotyping of the bone marrow (BM) revealed a population of B cells whose distribution slightly differed from the normal distribution of B cell precursors. To clarify clonal structure, this cell population was isolated along with evidently normal B cell precursors. Both populations turned out to be polyclonal. Red color represents presumably malignant B lymphoblasts; blue color represents normal B cell precursors; grey color represents all other cells



клеток того же типа. Она может слабо и гетерогенно экспрессировать антигены основной опухоли либо иметь другие незначительные отклонения в антигенном профиле, также она может быть представлена в существенно меньшем количестве по сравнению с основной опухолью [12].

В таком случае из образца необходимо выделить обе популяции. Далее имеется выбор из 2 технологий: определение клональных перестроек либо хромосомных aberrаций при помощи FISH. Для первого необходимо, чтобы хотя бы одна из популяций имела черты лимфоидного происхождения. Нередко в результате исследования обе популяции (даже если одна из них имеет миелоидный иммунофенотип) показывают полностью идентичный набор клональных перестроек либо имеют одну или несколько общих перестроек, что свидетельствует об их развитии из одного лейкоемического предшественника. Второй подход (FISH) может быть использован, если особенности иммунофенотипа основной опухолевой популяции позволяют предположить наличие какой-либо хромосомной перестройки. После того как в цельном материале наличие aberrации будет подтверждено, можно провести исследование на изолированных ранее популяциях [30]. Пример сортировки клеток при диагностике ОЛСФ представлен на *рисунке 2*.

Дифференциальная диагностика Ph^+ ОЛЛ и бластного криза ХМЛ

При диагностике первичного Ph^+ ОЛЛ всегда существует необходимость дифференцировать его с бластным кризом ХМЛ [31]. В первом случае все клетки миелоидного ряда (в том числе и зрелые) наряду с опухолевыми клетками несут характерную транслокацию $t(9;22)(q34;q11)$ с образованием химерного гена *BCR::ABL1*, в то время как в случае Ph^+ ОЛЛ такая хромосомная aberrация может быть обнаружена исключительно в опухолевых лимфобластах [32, 33]. Поиск указанной транслокации в цельном диагностическом материале осуществляется стандартным кариотипированием и методом FISH, однако точно дифференцировать с их помощью 2 нозологии довольно затруднительно.

Поиск специфической транслокации $t(9;22)(q34;q11)$ осуществляют одновременно в нескольких изолированных клеточных популяциях. Из образца параллельно выделяют одну или несколько миелоидных популяций (как правило, нейтрофилы и моноциты) и опухолевые бласты. Если опухолевые клетки при этом показывают деление на миелоидную и лимфоидную части, можно (хоть и не обязательно) таким же образом разделить их между собой при сортировке. Пример такого исследования представлен на *рисунке 3*.

Рисунок 2

Подтверждение наличия 2 опухолевых популяций разной линейности с помощью сортировки, анализа кло-нальности и FISH

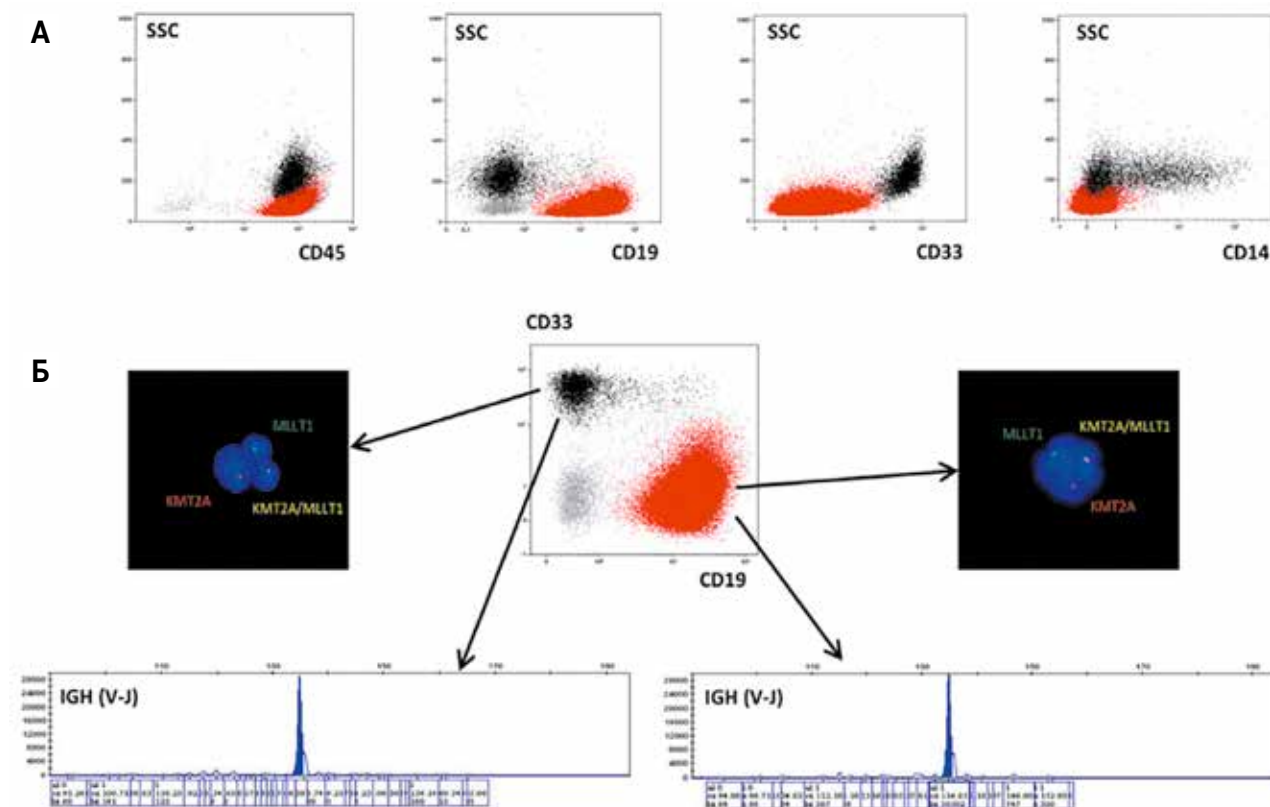
А – иммунофенотип опухолевых В-лимфобластов (красный цвет) и предположительно опухолевых клеток миелоидного ряда (черный цвет); Б – результаты анализа клональных реаранжировок и FISH $t(11;19)(q23;p13)$ в сортированных фракциях клеток. Серый цвет – остальные клетки

Figure 2

Confirmation of the presence of 2 tumor cell populations of different lineages using flow cell sorting, clonality analysis and FISH

A – immunophenotype of malignant B lymphoblasts (red color) and presumably malignant cells of myeloid lineage (black color);

B – the results of clonal rearrangement analysis and FISH for $t(11;19)(q23;p13)$ in the sorted cell fractions. Grey color represents all other cells

**Подтверждение рецидива ОЛ**

Сортировку при необходимости можно также включать в диагностику рецидива ОЛ. В случае выраженной регенерации в КМ, как при В-линейных ОЛЛ, так и при ОМЛ, особенно после проведения ТГСК, иммунофенотип части нормальных клеток в КМ может иметь черты, схожие с опухолевыми бластами [34], в том числе и с изначально диагностированной опухолью [10]. С другой стороны, развитие рецидива может быть обнаружено на этапе низкого относительного количества бластов, в том числе и по причине выраженного восстановления КМ. В этих случаях для исследования отсортированных «подозрительных» клеток могут быть применены все основные типы молекулярно-генетических исследований, в зависимости от того, проводилась ли ТГСК и определялись ли изначально специфические хромосомные перестройки. Пример исключения рецидива ОЛЛ после ТГСК при помощи оценки донорского химеризма в выделенной популяции В-линейных предшественников показан на рисунке 4.

Дифференциальная диагностика рецидива ОЛ и развития второй гемопэтической опухоли

В некоторых случаях рецидива ОЛ опухолевые бласты показывают существенные иммунофенотипические отличия от инициальных данных (вплоть до смены линейной направленности дифференцировки) и необходимо убедиться в том, что произошел рецидив первоначального ОЛ, а не развитие второй опухоли [35–37]. При условии, что при первичном исследовании у пациента были найдены специфические хромосомные перестройки, в рецидиве можно изолировать опухолевые клетки для поиска тех же перестроек методом FISH, и/или ПЦР. Точно так же может быть применено и определение клональных реаранжировок генов *IG* и/или *TCR* с последующим сравнением спектра перестроек в инициальном и рецидивном образцах. Поскольку доля опухолевых клеток при развитии рецидива может быть небольшой, сортировка в целом помогает дополнительно очистить опухолевую популяцию и облегчить поиск молекулярных маркеров

в рецидиве. Пример такого исследования показан на рисунке 5.

Выделение чистой опухолевой популяции при «малопроцентном» ОЛ для точной диагностики его цитогенетического варианта

При отсутствии видимых при стандартном кариотипировании или FISH-исследовании наиболее часто встречаемых хромосомных aberrаций окончательный генетический вариант ОЛ может быть диагностирован при применении более сложных технологий, таких как исследование экзона или генома при помощи высокопроизводительного секвенирования или определение патогенных мутаций в определенных генах при помощи секвенирования по Сэнгеру [22]. Для этого, особенно при относительно низком количестве опухолевых клеток, бластная популяция должна быть очищена при помощи проточной сортировки. Кроме того, высокотехнологичные генетические методы исследования

являются достаточно требовательными к количеству анализируемых клеток, поэтому для полноценного генетического исследования может потребоваться дополнительный генетический материал. Так как начало индукционной терапии чаще всего достаточно быстро приводит к существенному снижению blastоза, цельный КМ, взятый даже на относительно ранних этапах лечения, может быть не пригоден для углубленного генетического исследования. В то же время при сохранении остаточной опухолевой популяции она может быть выделена как дополнительный клеточный материал для генетического исследования. Пример такого исследования показан на рисунке 6.

Применение сортировки в мониторинге минимальной остаточной болезни

Описанные методики могут быть использованы для подтверждения результатов оценки МОБ [10, 11, 38]. На этом этапе в той или иной степени подходят

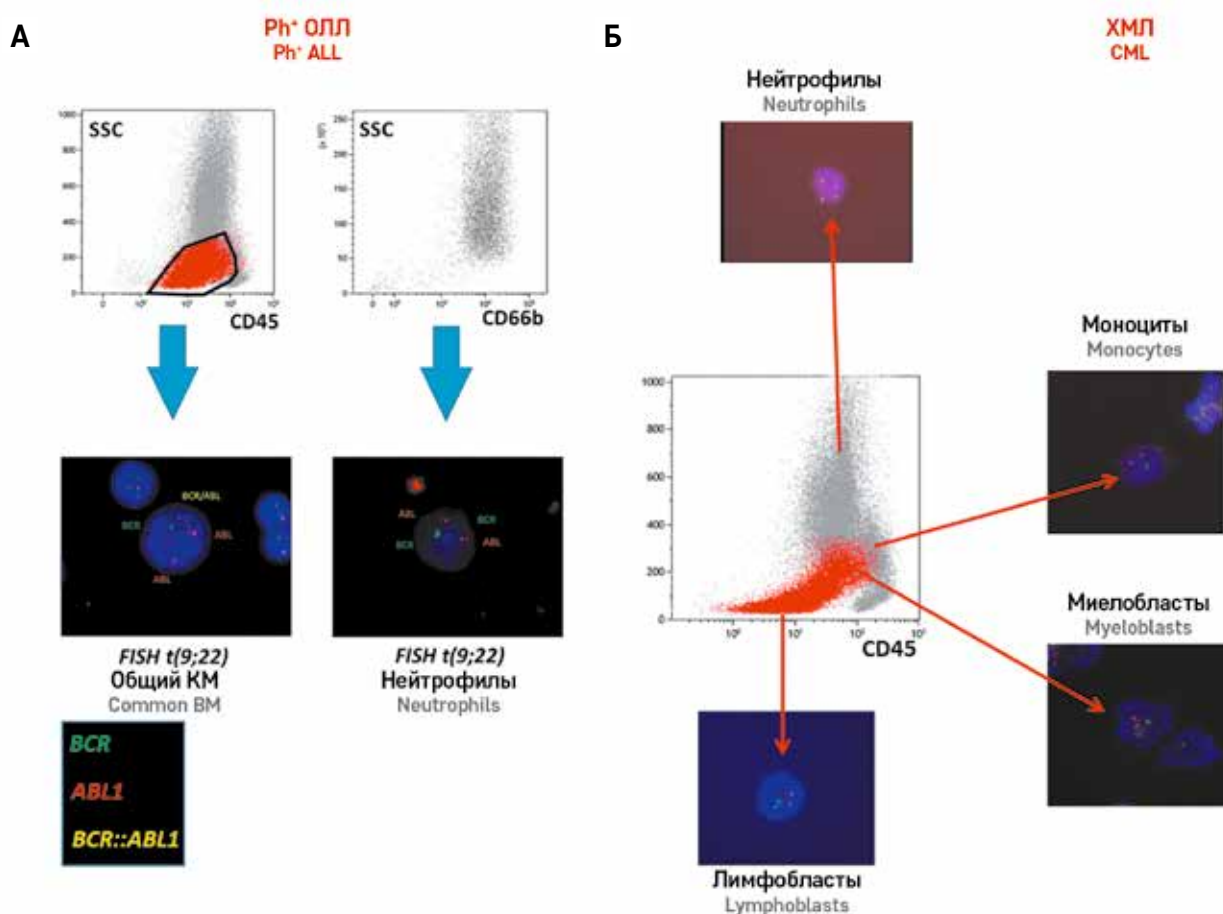
Рисунок 3

Дифференциальная диагностика между Ph⁺ ОЛЛ и бластным кризом ХМЛ при помощи индивидуального анализа разных клеточных популяций, выделенных на клеточном сортере, на наличие транслокации t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1

При Ph⁺ ОЛЛ химерный ген обнаруживается в бластах, но не в миелоидных клетках (А), в то время как при бластном кризе ХМЛ – во всех исследованных клеточных популяциях (Б)

Figure 3

Differential diagnosis between Ph⁺ ALL and blast crisis of chronic myeloid leukemia (CML) by means of separate analysis of different cell populations isolated using a cell sorter for the presence of t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1 translocation. In Ph⁺ ALL, a fusion gene is detected in blasts but not in myeloid cells (A), while in blast crisis of CML, it is detected in all cell populations studied (B).



все ранее озвученные способы. Выбор оптимальной методики зависит от множества факторов: типа лейкоза, наличия или отсутствия пациент-специфических хромосомных перестроек, наличия предшествующей аллогенной ТГСК. По сравнению с этапом первичной диагностики на этапе мониторинга МОБ уже чаще всего известны результаты всех генети-

ческих исследований, поэтому выбор используемых генетических технологий может быть максимально широк. С другой стороны, при определении остаточной опухоли чаще всего достаточно сложно выделить для дальнейших исследований существенное количество клеток, что заставляет выбирать основную применяемую генетическую технологию.

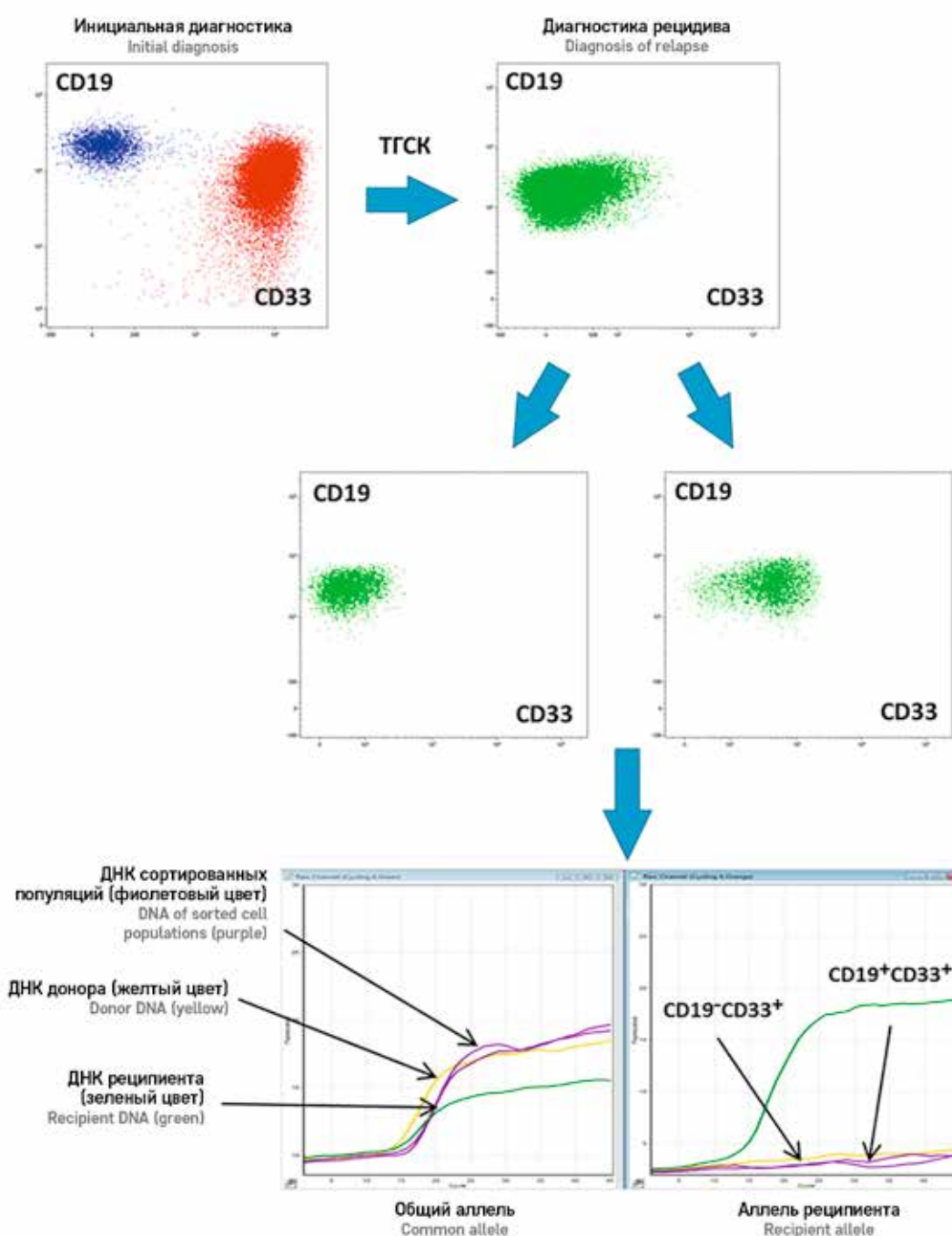
Рисунок 4

Исключение рецидива у пациента с В-линейным ОЛЛ с коэкспрессией CD33 на фоне выраженной экспансии ранних В-линейных предшественников (со слабой гетерогенной CD33-позитивностью) после аллогенной ТГСК. Анализ химеризма в CD33⁺ и CD33⁻ В-клетках подтвердил их донорское происхождение и исключил рецидив ОЛЛ

Figure 4

Ruling out a relapse in a patient with B cell ALL with CD33 co-expression in the presence of the marked expansion of early B cell precursors (with weak heterogeneous positivity for CD33) after allogeneic HSCT

The analysis of chimerism in CD33⁺ and CD33⁻ B cells confirmed their donor origin and ruled out the relapse of ALL



Поскольку FISH является самой специфичной методикой и универсальной для любого типа ОЛ, то при наличии хромосомных перестроек свой выбор следует остановить на ней. Несмотря на то, что для ее проведения рекомендуется выделять порядка 10 тыс. клеток, данная методика показала неплохие результаты и на меньшем количестве клеток. Тем не менее, если прогнозируемый выход клеток критически мал (до 1000), рекомендуется по возможности дополнить исследование одним из

методов, показавших достоверные результаты на малых популяциях [10, 11]: для пациентов с ОЛЛ – анализ клоальности, для пациентов, перенесших аллогенную ТГСК, – анализ химеризма. В условиях отсутствия известных хромосомных перестроек для пациентов с ОЛЛ при любом выходе клеток рекомендовано определение клоальности, а при наличии проведенной аллогенной ТГСК этот анализ и определение гемопоэтического химеризма будут являться равнозначными методами подтверждения. Для паци-

Рисунок 5

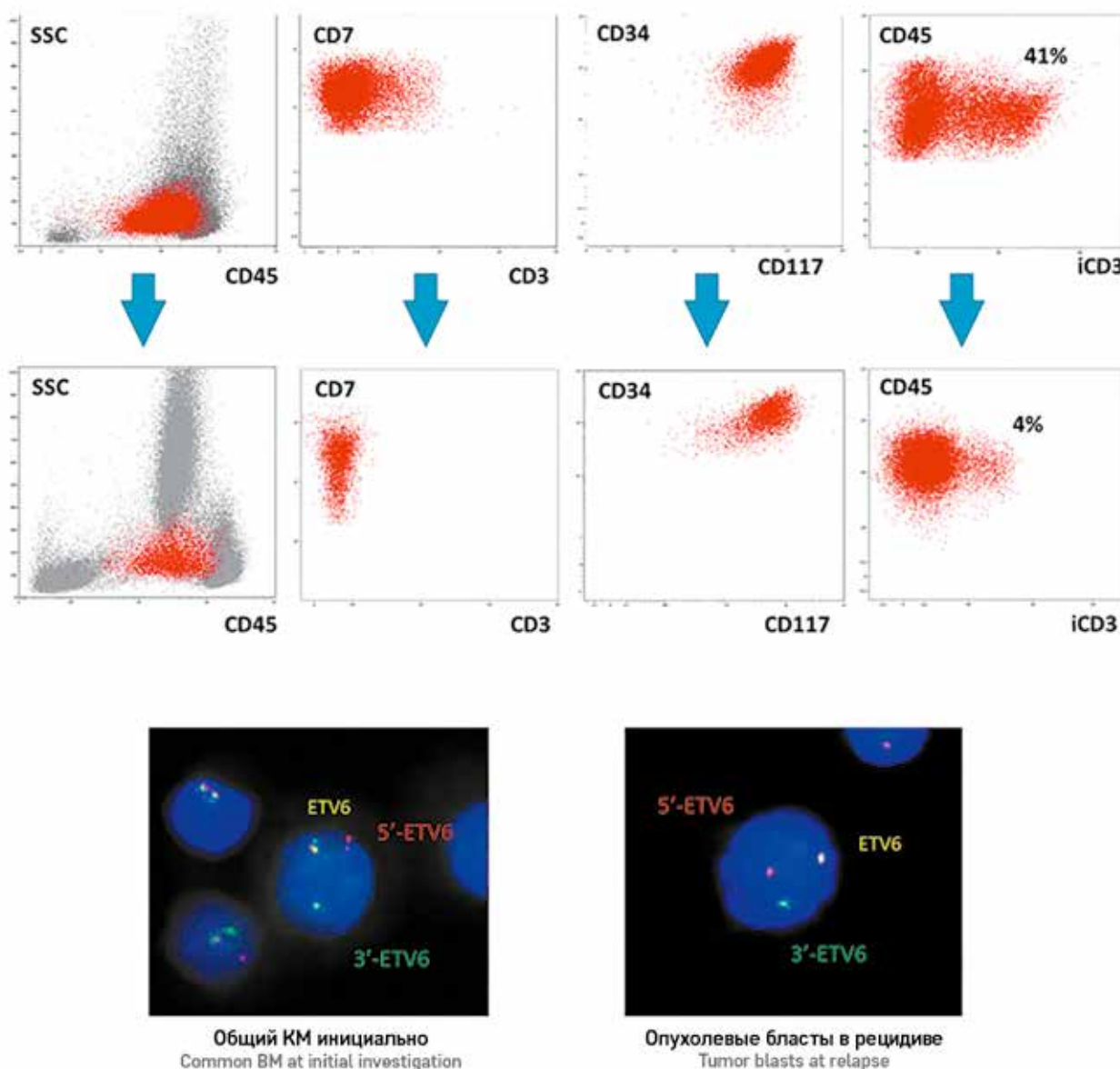
Подтверждение рецидива инициального ОЛ при помощи сортировки и FISH

Иммунофенотип опухолевых клеток при инициальном исследовании соответствовал критериям ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников (А, верхний ряд), а в рецидиве из-за потери внутриклеточной экспрессии CD3 был диагностирован ОМЛ (А, нижний ряд). Опухолевые бласты при диагностике рецидива были выделены при помощи проточной сортировки, а затем методом FISH подтверждена инициально обнаруженная перестройка гена *ETV6* и в этой сортированной популяции (Б). i – внутриклеточная экспрессия; красный цвет – опухолевые клетки; серый цвет – остальные клетки

Figure 5

Confirmation of a relapse of initial AL using flow cell sorting and FISH

The immunophenotype of tumor cells at baseline had been consistent with the criteria for early T cell precursor ALL (A, upper row), but at relapse, because of the loss of intracellular expression of CD3, AML was diagnosed (A, lower row). At the diagnosis of the relapse, tumor blasts were isolated using a flow sorting technique and then the initially detected rearrangement in the *ETV6* gene was also confirmed in this sorted cell population using FISH (B). i – intracellular expression; red color – tumor cells; grey color – all other cells



ента с ОМЛ без специфических генетических перестроек сортировка может помочь только при наличии предшествующей трансплантации. ПЦР химерного транскрипта может быть применена в отдельных

случаях, однако анализ при помощи FISH предпочтительнее за счет меньшего количества клеток, наглядности исследования и более быстрого процесса сортировки.

Рисунок 6

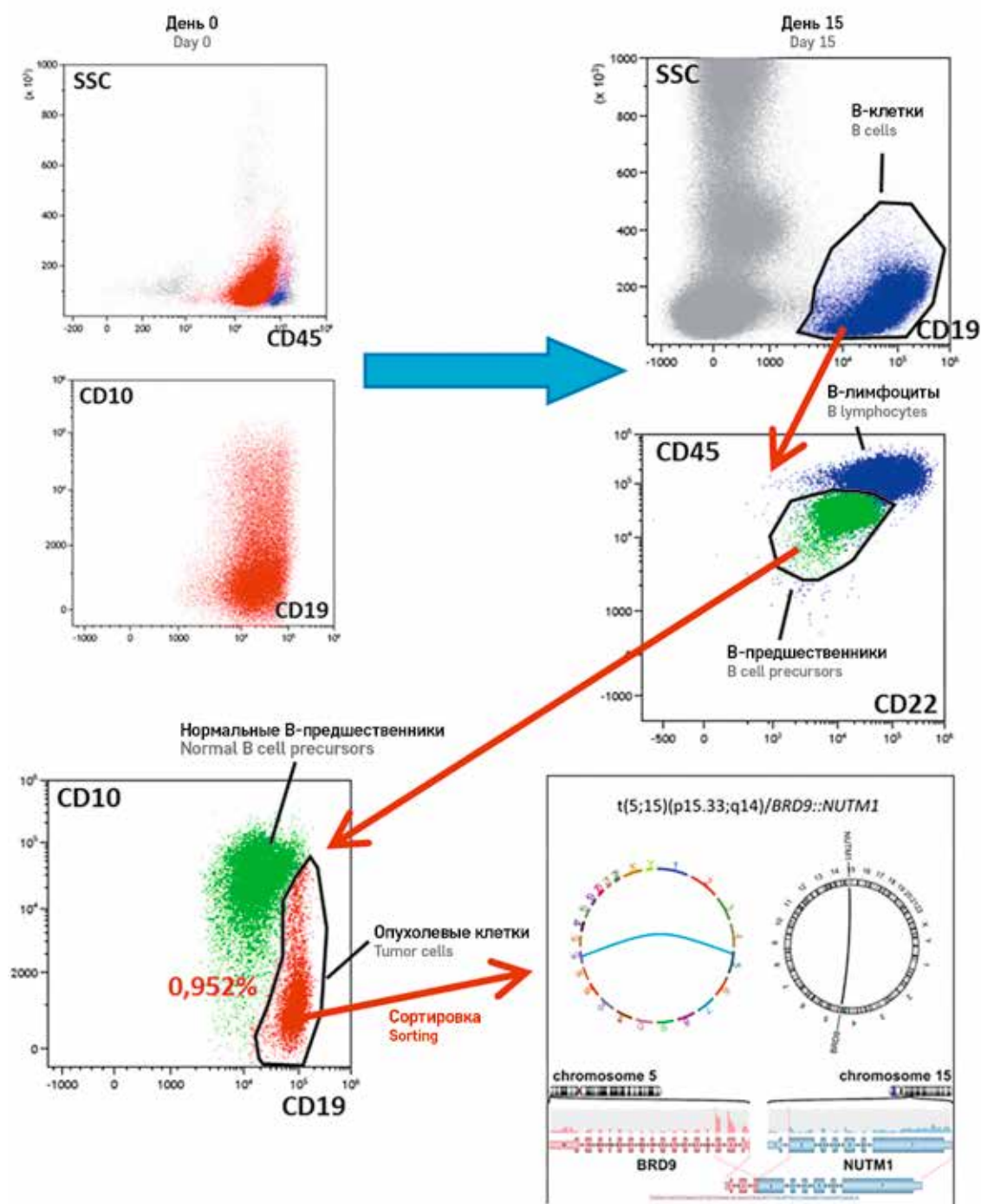
Точная молекулярно-генетическая диагностика ОЛЛ

При инициальном генетическом исследовании количество клеточного материала оказалось недостаточным для определения всех возможных хромосомных aberrаций, однако дополнительный клеточный материал, полученный при сортировке остаточных опухолевых клеток на 15-й день терапии, позволил провести анализ транскриптома и выявить транслокацию $t(5;15)(p15;q14)/BRD9::NUTM1$

Figure 6

Accurate molecular genetic diagnosis of ALL

At initial genetic study, the amount of cell material was insufficient for the identification of all possible chromosomal aberrations. Additional cell material obtained after sorting of residual tumor cells on Day 15 of treatment enabled us to perform a transcriptome analysis and detect the $t(5;15)(p15;q14)/BRD9::NUTM1$ translocation



Рекомендуемый нами алгоритм выбора подходящей методики приведен на *рисунке 7*. Необходимо еще раз отметить, что выбирать следует только из технологий, технически отработанных для применения в сортированных клетках. При сомнении в эффективности любой из методик именно для данного материала следует выбирать из более надежных технологий.

Цитогенетический и/или молекулярно-генетический анализ выделенной клеточной популяции при мониторинге ОЛ позволяет с высокой долей вероятности решить следующие задачи:

- подтверждение МОБ-позитивности при существенных изменениях иммунофенотипа опухолевых клеток;
- подтверждение МОБ-негативности при существенных изменениях иммунофенотипа нормальных клеток;
- подтверждение МОБ-позитивности при сходе иммунофенотипа опухолевых клеток с антигенным профилем нормальных клеток;
- подтверждение или исключение ранней смены линейности ОЛ;
- подтверждение МОБ-рецидива при критической клинической значимости результата определения МОБ;
- уточнение причин расхождения результатов определения МОБ разными методами.

Подтверждение или исключение МОБ-позитивности при существенных изменениях иммунофенотипа опухолевых и нормальных клеток

Известно, что проводимая терапия влияет на иммунофенотип опухолевых и даже нормальных клеток КМ [15, 16, 18, 39, 40]. Модуляции экспрессии антигенов происходят как при стандартной химиотерапии, так и при использовании новейших подходов с применением иммунобиологических препаратов, направленных на антигены опухолевых клеток (CD19, CD22, CD20 и т. д.) [17, 18, 38, 40]. В последнем случае в отличие от стандартной химиотерапии изменение экспрессии таргетируемых молекул является прямым следствием терапевтического воздействия [18, 40–42]. В таких условиях поиск остаточных опухолевых бластов существенно усложняется, а подходы к анализу данных существенно изменяются [43–45]. Это, в свою очередь, может приводить к включению в анализ дополнительных популяций нормальных клеток, что может усложнять точную идентификацию МОБ [38, 43]. Но несмотря на совершенствование стратегий мониторинга остается потребность в дополнительной верификации результатов, особенно в случае, когда они могут привести к незамедлительной смене тактики терапии пациента. Пример такого исследования показан на *рисунке 8*.

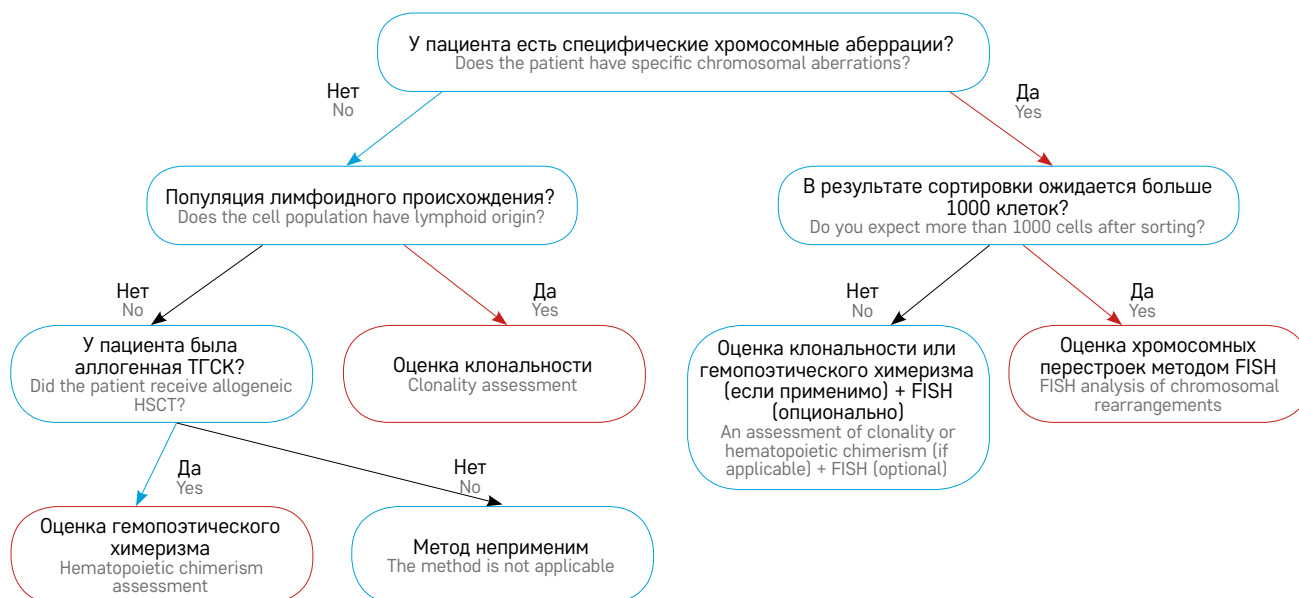
Рисунок 7

Предлагаемый алгоритм выбора подходящего молекулярно-генетического метода для уточнения происхождения клеток, выделенных при помощи клеточного сортера, в рамках подтверждения результатов иммунофенотипической оценки МОБ

Важно помнить, что даже такой всесторонний клеточный анализ не всегда может дать прямой ответ на вопрос об опухолевой природе отдельно взятой популяции, но в большинстве случаев существенно упрощает интерпретацию цитометрических данных

Figure 7

An algorithm that we suggest for the selection of an optimal molecular genetic method necessary to determine the origin of cells isolated with a cell sorter, in order to confirm results of an immunophenotypic evaluation of MRD. It is important to remember that even such a comprehensive cellular analysis cannot always give a direct answer as to whether a certain cell population is malignant but in the majority of cases it makes interpretation of cytometric data much easier



Подтверждение МОБ-позитивности при сходстве иммунофенотипа опухолевых клеток с антигенным профилем нормальных клеток

Несмотря на достаточно четкие отличия опухолевых клеток от нормальных при ОЛ [34], не во всех случаях могут быть выявлены комбинации антигенов, позволяющие однозначно отделить МОБ от нормальных клеток. Это усугубляется также изменениями иммунофенотипа опухолевых и нормальных клеток под действием терапии. В результате в некоторых случаях антигенный профиль остаточной опухолевой популяции может быть крайне схож с таковым у нормальных клеток КМ. В таких случаях сортировка «подозрительной» популяции клеток чаще всего позволяет достаточно точно ответить на вопрос об их опухолевой природе.

Еще более существенной данная проблема является для ОМЛ, поскольку иммунофенотип опухолевых клеток гораздо чаще не имеет существенных отличий от нормальных миелоидных клеток в КМ. И в этом случае проточная сортировка клеток может существенно помочь в мониторинге МОБ, но такая возможность будет только при наличии специфических хромосомных перестроек или предшествующей ТГСК. Пример такого исследования показан на рисунке 9.

Подтверждение или исключение ранней смены линейности ОЛ

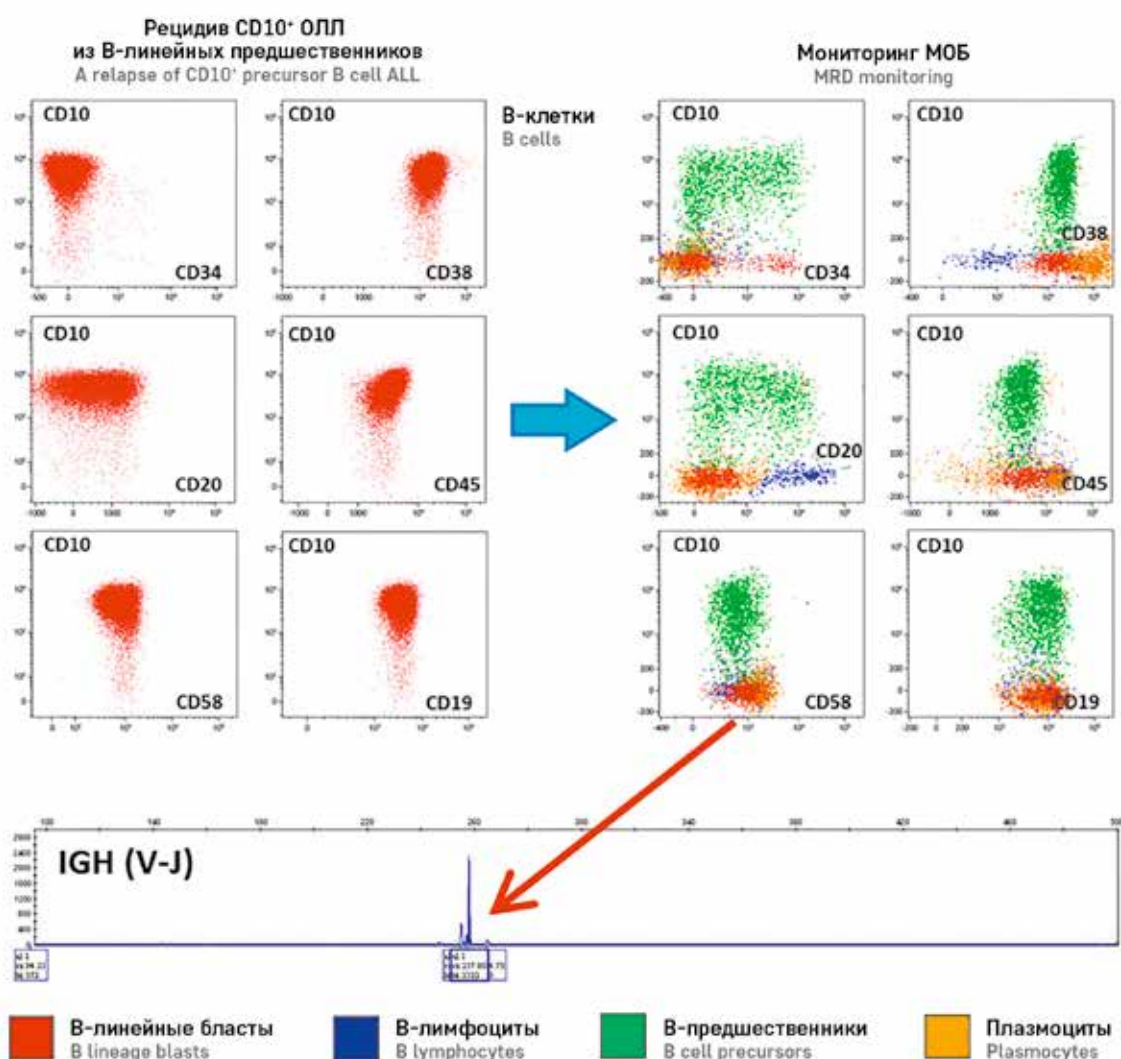
Смена линейной дифференцировки ОЛ – редкое событие, при котором иммунофенотип опухолевых клеток в дебюте заболевания соответствует крите-

Рисунок 8

Подтверждение МОБ-позитивности при существенном изменении иммунофенотипа остаточной опухолевой популяции (полная потеря CD10 лейкоемическими бластами во время терапии) при помощи подтверждения моноклональности отсортированной популяции клеток

Figure 8

Confirmation of MRD positivity in a patient with a significantly altered immunophenotype of the remaining tumor cell population (a complete loss of CD10 in leukemic blast cells during treatment) through confirmation of monoclonality of the sorted cell population.



риям одной линии, но затем под воздействием терапии полностью меняет свою линейную принадлежность. Чаще всего происходит переход из ОЛЛ в ОМЛ. Большая часть случаев смены линейности описана для пациентов с перестройкой гена *KMT2A*, однако встречаются и другие хромосомные аберрации [35, 37, 46]. Данное явление может наблюдаться как в рецидиве заболевания (см. выше), так и непосредственно в процессе терапии, в том числе и на самых ранних этапах [46–48], и может быть выявлено исключительно с помощью проточной цитометрии. При подозрении на переключение опухолевой линии клетки можно изолировать для проведения FISH (при наличии известной генетической перестройки) или определения клональности, причем последнее будет информативным, несмотря на смену линейности с лимфоидной на миелоидную. Пример такого исследования показан на рисунке 10.

Подтверждение МОБ-рецидива при критической клинической значимости результата определения МОБ

МОБ-рецидив, или появление МОБ после периода МОБ-негативности, – достаточно редкое событие, непосредственно предшествующее развитию рецидива ОЛ [49, 50]. Наличие в настоящее время иммунобиологических препаратов, позволяющих таргетно воздействовать в том числе и на небольшие количества опухолевых клеток [51, 52], позволяет начинать терапию рецидива и на уровне МОБ-рецидива, не дожидаясь существенного нарастания массы опухоли [51–53]. С другой стороны, в современных МОБ-ориентированных протоколах лечения ОЛ появление МОБ при использовании экспериментальных методов терапии приводит к необходимости перевода пациентов на более стандартную интенсивную химиотерапию или применять ТГСК [53–55]. В этих случаях, особенно при очень низком количестве опухолевых клеток, может быть важным подтверждение МОБ-рецидива с использованием цитогенетических и/или молекулярно-генетических методов, для чего, в свою очередь, опухолевые бласты должны быть выделены в чистую популяцию при помощи проточной сортировки. Пример комплексного подтверждения МОБ-рецидива показан на рисунке 11.

Уточнение причин расхождения результатов определения МОБ разными методами

Несмотря на то, что результаты молекулярно-генетического определения МОБ нередко отличаются от результатов иммунофенотипирования [26, 56, 57], зачастую уточнение причин такого расхождения является достаточно важным. При ОЛЛ это касается

появления МОБ после периода МОБ-негативности (МОБ-рецидива, см. выше) и оценки эффективности действия иммунобиологических препаратов. В первом случае, обладая большей чувствительностью, молекулярно-генетические методы мониторинга МОБ могут раньше выявить развитие рецидива, а во втором – могут иметь преимущество в специфичности перед иммунофенотипированием вследствие возможной утраты опухолевыми клетками таргетируемых молекул, прежде всего CD19. При ОМЛ, особенно в случае «созревания» опухолевых клеток, мониторинг химерного транскрипта может показывать существенно большие величины МОБ [58] по сравнению с проточной цитометрией, поскольку химерный ген может экспрессироваться также и в

Рисунок 9

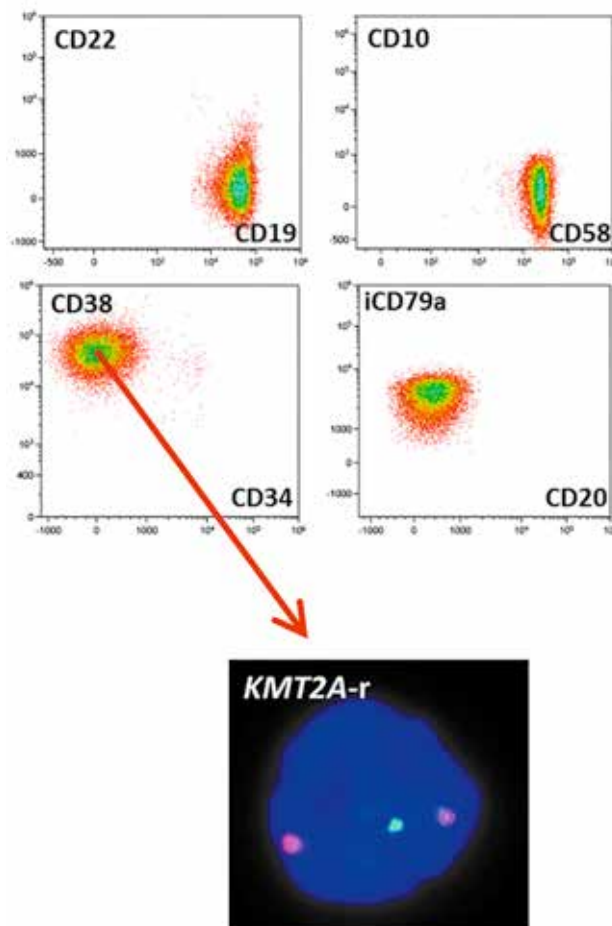
Подтверждение МОБ-позитивности на 15-й день терапии у пациента с В-линейным ОЛЛ с транслокацией *t(1;11)(p32;q23)/KMT2A::EPS15*

Иммунофенотип опухолевых клеток не имел существенных отличий от иммунофенотипа нормальных плазмочитов, однако в выделенных при помощи проточной сортировки клетках была обнаружена перестройка гена *KMT2A*

Figure 9

Confirmation of MRD positivity on Day 15 of treatment in a patient with B cell ALL with *t(1;11)(p32;q23)/KMT2A::EPS15* translocation

The immunophenotype of tumor cells did not differ much from the immunophenotype of normal plasmocytes but the cells isolated by flow cell sorting were found to harbor a *KMT2A* gene rearrangement



различных популяциях зрелых миелоидных клеток КМ. При этом молекулярно-генетический анализ различных популяций нормальных клеток КМ, выделенных при помощи проточной сортировки, может позволить уточнить, именно ли «созревание» ОМЛ является причиной расхождений результатов мониторинга МОБ или основной причиной являются технические ограничения или аналитические ошибки при проведении проточной цитометрии.

Пример такого исследования показан на рисунке 12. В случае положительного результата иммунофенотипирования, но негативного или существенно более низкого результата молекулярно-генетического определения МОБ проточная сортировка клеток применяется аналогично разделу «Подтверждение МОБ-рецидива при критической клинической значимости результата определения МОБ».

Рисунок 10

Подтверждение опухолевой природы популяции при подозрении на смену линейности ОЛ оценкой клональных реаранжировок генов *IG*

На 15-й день терапии у пациента с В-линейным ОЛЛ была выявлена существенная популяция клеток моноцитарной направленности дифференцировки. В отсутствие специфических хромосомных aberrаций в обеих популяциях было проведено исследование клональности, показавшее наличие идентичных клональных реаранжировок. Красный цвет – опухолевые В-лимфоциты; черный цвет – моноцитоподобные опухолевые клетки

Figure 10

Confirmation of the malignancy of a cell population in a patient with suspected AL lineage switch using an *IG* gene clonal rearrangement analysis

On day 15 of treatment, a large population of cells undergoing differentiation into monocytes was found in the patient with B cell ALL. Since there were no specific chromosomal aberrations, a clonality analysis was carried out in both populations which revealed identical clonal rearrangements in each of them. Malignant B lymphoblasts are shown in red, monocyte-like tumor cells – in black

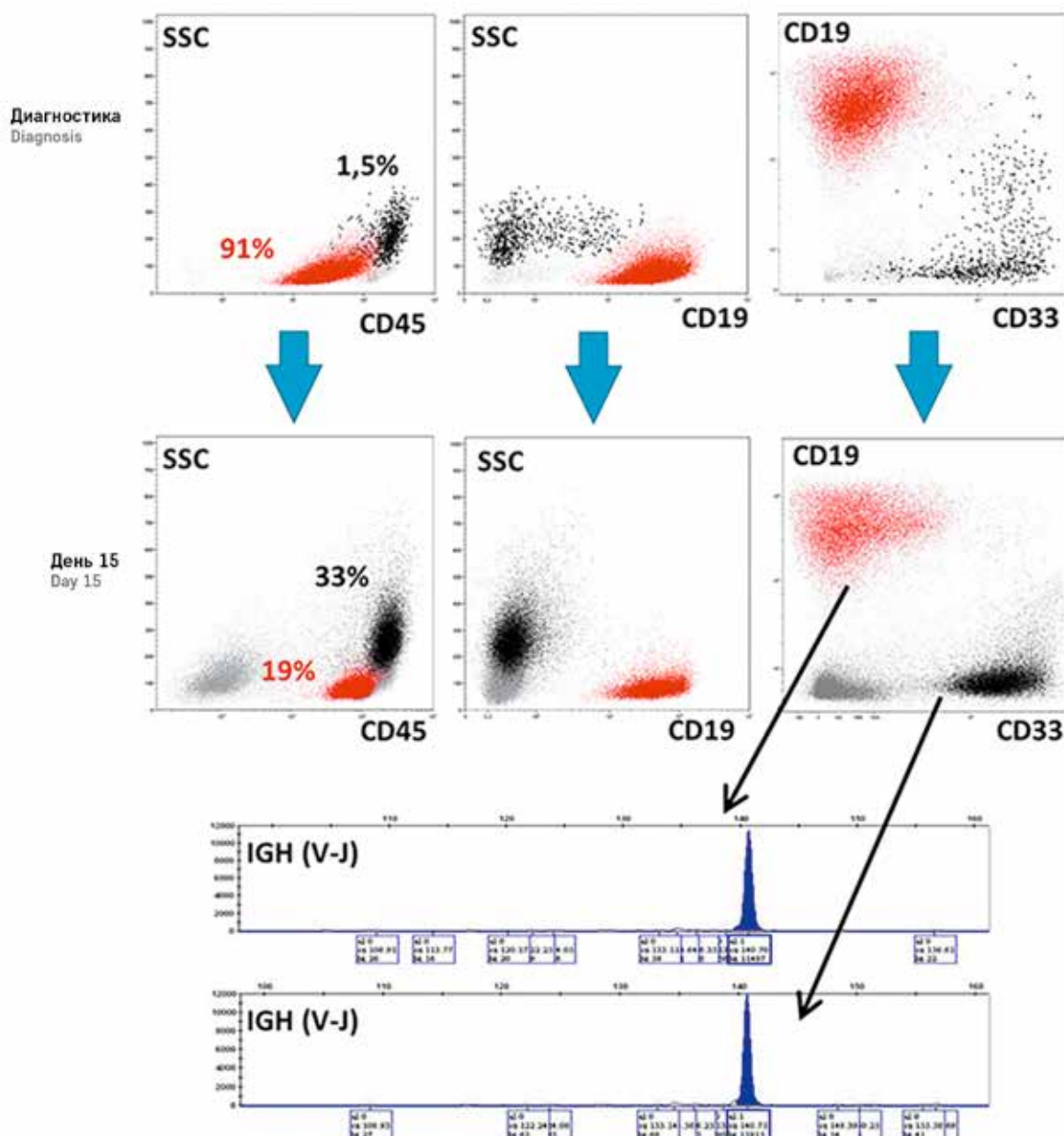


Рисунок 11

Пример комплексного подтверждения МОБ-рецидива у пациента с В-линейным ОЛЛ и транслокацией t(4;11)(q21;q23)/KMT2A::AFF1 после проведения аллогенной ТГСК

Все методы исследования выделенных опухолевых клеток подтвердили развитие МОБ-рецидива ОЛЛ

Figure 11

Comprehensive confirmation of an MRD relapse in a patient with B cell ALL and t(4;11)(q21;q23)/KMT2A::AFF1 translocation following allogeneic HSCT

All studies of the isolated tumor cells confirmed the MRD relapse

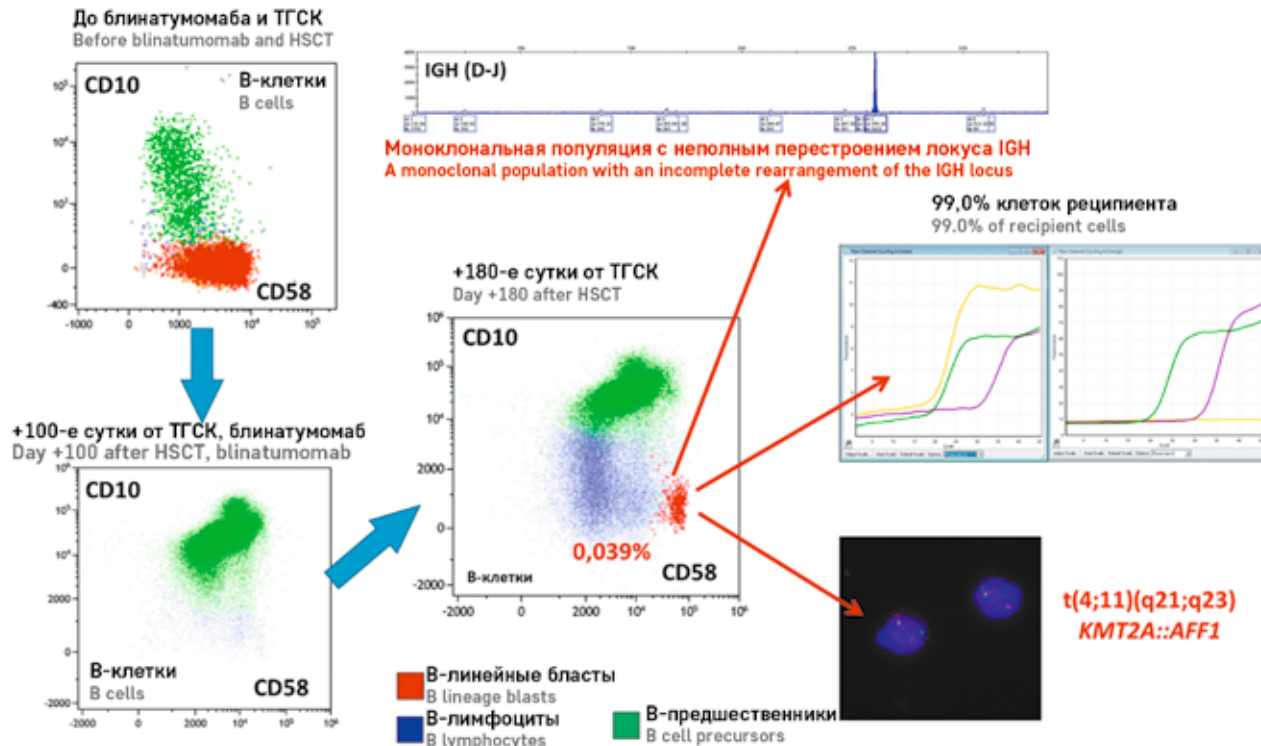


Рисунок 12

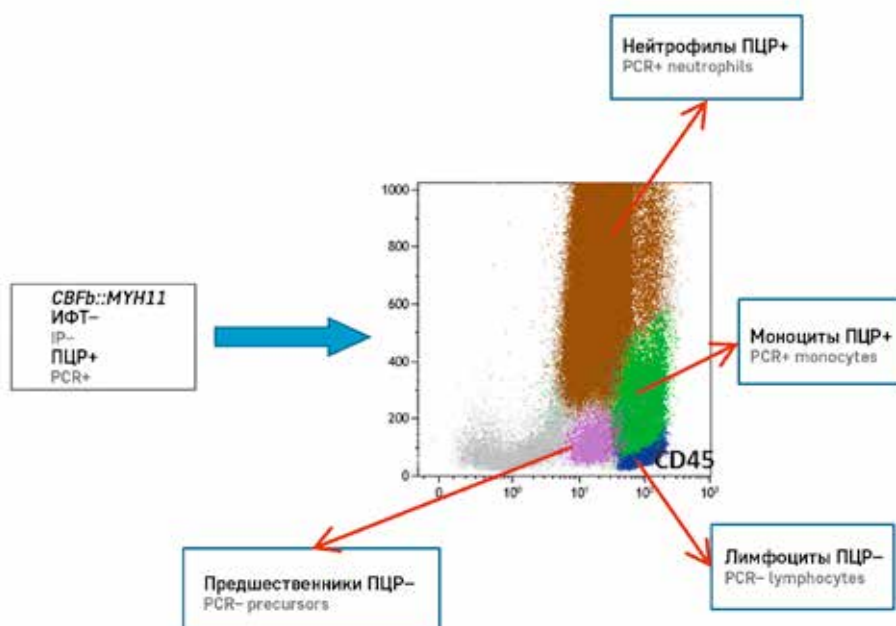
Подтверждение «созревания» ОМЛ как основной причины расхождения результатов мониторинга МОБ методами проточной цитометрии и ПЦР химерного транскрипта

При качественном расхождении результатов определения МОБ методом проточной сортировки были выделены разные популяции клеток КМ, а затем при помощи ПЦР было показано, что химерный транскрипт находится в относительно зрелых клетках миелоидного ряда. ИФТ – иммунофенотипирование

Figure 12

Confirmation of AML "maturation" as the primary reason for a divergence between results of MRD monitoring using flow cytometry and those obtained using PCR analysis of fusion transcripts

In a case of a divergence in the qualitative MRD detection results, various BM cell populations were isolated using flow cell sorting, whereafter a fusion transcript was found in relatively "mature" cells of the myeloid lineage using PCR. IP – immunophenotyping



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проточная сортировка клеток способна объединить несколько методов клеточного анализа для детального изучения изолированных клеточных популяций. Применение такого комплексного подхода показало свою эффективность в подтверждении неоднозначных результатов иммунофенотипирования как на этапе диагностики, так и при оценке МОБ. Несмотря на то, что данная технология доступна в ограниченном количестве лабораторий, при проведении диагностических и мониторинговых исследований при ОЛ в централизованном формате она становится доступной для всех пациентов. С другой стороны, сомнительные результаты, полученные в локальных лабораториях, могут также быть уточнены и при помощи проточной сортировки клеток в центральных лабораториях, при должном уровне

коммуникации лабораторных специалистов между собой и с врачами-клиницистами. При правильной постановке задачи, достаточной квалификации лабораторного персонала и высоком уровне генетических методов исследования проточная сортировка клеток является очень важным уточняющим методом диагностики и мониторинга ОЛ.

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>
Karachunskiy A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9300-198X>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>
Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>
Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

- Robinson J.P., Ostafe R., Iyengar S.N., Rajwa B., Fischer R. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells* 2023; 12 (14): 1875.
- Alexander T.B., Gu Z., Iacobucci I., Dickerson K., Choi J.K., Xu B., et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* 2018; 562 (7727): 373–9.
- Rabilloud T., Potier D., Pankaew S., Nozais M., Loosveld M., Payet-Bornet D. Single-cell profiling identifies pre-existing CD19-negative subclones in a B-ALL patient with CD19-negative relapse after CAR-T therapy. *Nat Commun* 2021; 12 (1): 865.
- Bueno C., Barrera S., Bataller A., Ortiz-Maldonado V., Elliot N., O'Byrne S., et al. CD34⁺CD19⁺CD22⁺ B-cell progenitors may underlie phenotypic escape in patients treated with CD19-directed therapies. *Blood* 2022; 140 (1): 38–44.
- Kotrova M., Musilova A., Stuchly J., Fiser K., Starkova J., Mejstrikova E., et al. Distinct bilineal leukemia immunophenotypes are not genetically determined. *Blood* 2016; 128 (18): 2263–6.
- Reichel J., Chadburn A., Rubinstein P.G., Giulino-Roth L., Tam W., Liu Y., et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 2015; 125 (7): 1061–72.
- Fromm J.R., Thomas A., Wood B.L. Characterization and Purification of Neoplastic Cells of Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma from Lymph Nodes by Flow Cytometry and Flow Cytometric Cell Sorting. *Am J Pathol* 2017; 187 (2): 304–17.
- Fromm J.R., Kussick S.J., Wood B.L. Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am J Clin Pathol* 2006; 126 (5): 764–80.
- Obro N.F., Madsen H.O., Ryder L.P., Andersen M.K., Schmiegelow K., Marquart H.V. Approaches for cytogenetic and molecular analyses of small flow-sorted cell populations from childhood leukemia bone marrow samples. *J Immunol Methods* 2011; 369 (1–2): 69–73.
- 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* 2021; 100 (5): 568–73.
- 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; 45 (4): 506–15.
- Semchenkova A., Zerkalnikova E., Demina I., Kashpor S., Volchikov E., Zakharova E., et al. Recognizing Minor Leukemic Populations with Monocytic Features in Mixed-Phenotype Acute Leukemia by Flow Cell Sorting Followed by Cytogenetic and Molecular Studies: Report of Five Exemplary Cases. *Int J Mol Sci* 2023; 24 (6): 5260.
- Obro N.F., Ryder L.P., Madsen H.O., Andersen M.K., Lausen B., Hasle H., et al. Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods. *Haematologica* 2012; 97 (1): 137–41.
- DiGiuseppe J.A., Wood B.L. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lym-

- phoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96 (4): 256–65.
15. Borowitz M.J., Pullen D.J., Winick N., Martin P.L., Bowman W.P., Camitta B. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the children's oncology group. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 68 (1): 18–24.
 16. 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.
 17. Semchenkova A., Zhogov V., Rudneva A., Potapenko L., Plyasunova S., Miakova N., et al. Immune reconstitution following rituximab-based immunochemotherapy in pediatric patients with B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2022; 63 (1): 217–21.
 18. Mikhailova E., Gluhanyuk E., Illarionova O., Zerkalenskova 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.
 19. 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 российской-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
 20. Попов А.М., Михайлова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Пермикин Ж.В., Шман Т.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе методом проточной цитометрии. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (3): 199–209. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209
 21. 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
 22. Цаур Г.А., Олышанская Ю.В., Обухова Т.Н., Судариков А.Б., Лазарева О.В., Гиндина Т.Л. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика онкогематологических заболеваний: позиция Организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии. *Гематология и трансфузиология* 2023; 68 (1): 129–43. DOI: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-129-143
 23. Van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A., Delabesse E., Rossi V., Saglio G., et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13 (12): 1901–28.
 24. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17 (12): 2318–57.
 25. Tsaur G., Popov A., Riger T., Kustanovich A., Solodovnikov A., Shorikov E., et al. Prognostic value of minimal residual disease measured by fusion-gene transcript in infants with *KMT2A*-rearranged acute lymphoblastic leukaemia treated according to the MLL-Baby protocol. *Br J Haematol* 2021; 193 (6): 1151–6.
 26. Popov A., Tsaur G., Verzhbitskaya T., Riger T., Permikin Z., Demina A., et al. Comparison of minimal residual disease measurement by multicolour 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. Langerak A.W., Groenen P.J., Bruggemann M., Beldjord K., Bellan C., Bonello L., et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012; 26 (10): 2159–71.
 28. Scheijen B., Meijers R.W.J., Rijntjes J., van der Klift M.Y., Mobs M., Steinhilber J., et al. Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia* 2019; 33 (9): 2227–40.
 29. Gendzekhadze K., Gaidulis L., Senitzer D. Chimerism testing by quantitative PCR using Indel markers. *Methods Mol Biol* 2013; 1034: 221–37.
 30. Demina I., Zerkalenskova E., Semchenkova A., Volchikov E., Boychenko E., Prudnikova M., et al. Rare case of pediatric trilineal mixed-phenotype acute leukemia with t(11;19)(q23.3;p13)/*KMT2A::ELL*. *Leuk Res* 2023; 125: 107018.
 31. Kolenova A., Maloney K.W., Hunger S.P. Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia or Chronic Myeloid Leukemia in Lymphoid Blast Crisis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2016; 38 (6): e193–5.
 32. Balducci E., Loosveld M., Rahal I., Boudjarane J., Alazard E., Missirian C., et al. Interphase FISH for BCR-ABL1 rearrangement on neutrophils: A decisive tool to discriminate a lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia from a *de novo* BCR-ABL1 positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol* 2018; 36 (1): 344–8.
 33. Chen Z., Hu S., Wang S.A., Konopleva M., Tang Z., Xu J., et al. Chronic myeloid leukemia presenting in lymphoblastic crisis, a differential diagnosis with Philadelphia-positive B-lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2020; 61 (12): 2831–8.
 34. 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.
 35. Dorantes-Acosta E., Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone Marrow Res* 2012; 2012: 406796.

36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Mikhailova E., Illarionova O., Shelikhova L., Zerkalenkova E., Molostova 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Verbeek M.W.C., Buracchi C., Laqua A., Nierkens S., Sedek L., Flores-Montero J., et al. Flow cytometric minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients treated with CD19-targeted therapies – a EuroFlow study. *Br J Haematol* 2022; 197 (1): 76–81.
46. Novakova M., Zaliouva M., Fiser K., Vakrmanova B., Slamova L., Musilova A., et al. DUX4r, ZNF384r and PAX5-P80R mutated B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia frequently undergo monocytic switch. *Haematologica* 2021; 106 (8): 2066–75.
47. Slamova L., Starkova J., Fronkova E., Zaliouva M., Reznickova L., van Delft F.W., et al. CD2-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to the monocytic lineage. *Leukemia* 2014; 28 (3): 609–20.
48. Permikin Z., Popov A., Verzhbitskaya T., Riger T., Plekhanova O., Makarova O., et al. Lineage switch to acute myeloid leukemia during induction chemotherapy for early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with the translocation t(6;11)(q27;q23)/KMT2A-AFDN: A case report. *Leuk Res* 2022; 112: 106758.
49. Pemmaraju N., Kantarjian H., Jorgensen J.L., Jabbour E., Jain N., Thomas D., et al. Significance of recurrence of minimal residual disease detected by multi-parameter flow cytometry in patients with acute lymphoblastic leukemia in morphological remission. *Am J Hematol* 2017; 92 (3): 279–85.
50. Buchmann S., Schrappe M., Baruchel A., Biondi A., Borowitz M.J., Campbell M., et al. Remission, treatment failure, and relapse in pediatric ALL: An international consensus of the Ponte-di-Legno Consortium. *Blood* 2022; 139 (12): 1785–93.
51. Ali H., Salhotra A., Stein A.S., Nakamura R., Marcucci G., Forman S.J., et al. Efficacy of blinatumomab for MRD relapse in ALL post allogeneic HCT. *Leuk Res* 2021; 104: 106579.
52. Keating A.K., Gossai N., Phillips C.L., Maloney K., Campbell K., Doan A., et al. Reducing minimal residual disease with blinatumomab prior to HCT for pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 2019; 3 (13): 1926–9.
53. 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.
54. Queudeville M., Ebinger M. Blinatumomab in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia-From Salvage to First Line Therapy (A Systematic Review). *J Clin Med* 2021; 10 (12): 2544.
55. 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.
56. Huang Y.J., Coustan-Smith E., Kao H.W., Liu H.C., Chen S.H., Hsiao C.C., et al. Concordance of two approaches in monitoring of minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Fusion transcripts and leukemia-associated immunophenotypes. *J Formos Med Assoc* 2017; 116 (10): 774–81.
57. Gaipa G., Cazzaniga G., Valsecchi M.G., Panzer-Grumayer R., Buldini B., Silvestri D., et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012; 97 (10): 1582–93.
58. Buldini B., Maurer-Granofszky M., Varotto E., Dworzak M.N. Flow-Cytometric Monitoring of Minimal Residual Disease in Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia: Recent Advances and Future Strategies. *Front Pediatr* 2019; 7: 412.