

Оптимизация проточно-цитометрических протоколов детекции минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах

О. А. Безнос, научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза
Л. Ю. Гривцова, к.м.н., д.б.н., с.н.с. лаборатории иммунологии гемопоэза
Н. Н. Тупицын, д.м.н., проф., зав. лабораторией иммунологии гемопоэза

НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

Optimization of flow-cytometry protocols for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia

O. A. Beznos, L. Yu. Grivtsova, N. N. Tupitsyn

National Medical Research Centre of Oncology n.a. N. N. Blokhin, Moscow, Russia

Резюме

Важнейший критерий эффективности лечения при острых лимфобластных лейкозах — минимальная остаточная болезнь (МОБ) — количество опухолевых бластов, определяемое в костном мозге больного на различных этапах терапии. Основным методом оценки количества клеток МОБ при острых лейкозах является многоцветная проточная цитометрия (ПЦ), позволяющая охарактеризовать до 8–11 параметров одновременно. Принципиальным моментом является то, что оценка МОБ при ОЛЛ осуществляется непосредственно в процессе проведения химиотерапии, и костный мозг часто гипоклеточный и характеризуется выраженным количеством дебриса — разрушенных клеток, появляющихся под влиянием системной терапии. Такое разбавление может привести к искажению результатов оценки МОБ и, как следствие, неверной риск-стратификации больных. Поэтому для исключения из анализа разрушенных клеток и артефактов (дебриса), появляющихся под действием системной терапии, необходимо использовать нуклеотропные красители семейства Syto, что позволяет оценивать количество клеток МОБ в пределах живых ядросодержащих клеток образца.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, SYTO 16.

Summary

The most important criterion of the effectiveness of treatment in acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the minimal residual disease (MRD) — the number of tumor blasts detected in the bone marrow of a patient at various stages of therapy. The main method for estimating the number of MRD cells in acute leukemia is multicolor flow cytometry, which allows to characterize up to 8–11 parameters simultaneously. The principal point is that the evaluation of the MRD in ALL is carried out directly during the chemotherapy and the bone marrow is often hypocellular and is characterized by a pronounced amount of debris destroyed cells that appear under the influence of systemic therapy. Such a dilution may lead to a distortion of the results of the evaluation of the MRD and, as a consequence, an incorrect risk of stratification of patients. Therefore, to exclude from analysis of destroyed cells and artefacts (debris), which appear under the action of systemic therapy, it is necessary to use nucleotropic dyes of the Syto family, which allows estimating the number of MRD cells within the living nucleated cells of the sample.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry.

Введение

Контроль эффективности полихимиотерапии является неотъемлемой частью современных лечебных протоколов [13, 15]. В случае острых лейкозов таким критерием является количество опухолевых бластов, определяемое в костном мозге (КМ) больного на различных этапах терапии — минимальная остаточная болезнь (МОБ).

Для взрослых пациентов вопросы о наиболее значимых точках иммунологической детекции, а также роли уровней МОБ, обсуждаются [8]. Наиболее полно показано значение МОБ в педиатрической практике. Установлено значение МОБ как в прогнозе острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), так и как предиктора развития рецидива [11]. Определены

ключевые точки оценки МОБ и их клиническое значение, а также уровни МОБ, позволяющие проводить углубленную риск-стратификацию больных [6, 7].

Ключевое значение в прогнозе больного играет 15-й день химиотерапии индукции ремиссии. МОБ на данном этапе отражает первичный ответ на проводимое лечение [10]. При этом именно с учетом данных МОБ возможно определение группы хорошего ответа (МОБ < 0,01 %), которым с учетом клинических факторов прогноза можно снизить дозы антрациклинов с целью уменьшения частоты развития осложнений и улучшения качества жизни без риска развития рецидива [16, 17].

Важной особенностью мониторинга МОБ является необходимость

учитывать влияние проводимой полихимиотерапии на костный мозг больного. Именно в середине индукционной химиотерапии ее влияние наиболее велико. На данном этапе костный мозг характеризуется гипоклеточностью, а также большим количеством дебриса — разрушенных клеток, появляющихся под влиянием системной терапии. Такое разбавление может привести к искажению результатов оценки МОБ и, как следствие, неверной риск-стратификации больных.

Для решения данной проблемы, а также с целью упрощения пересчета количества клеток МОБ в проточно-цитометрическую панель детекции МОБ предложено включать нуклеотропные красители семейства Syto. Образуя четыре подсемейства, красители это

Таблица 1
Количество исследований в каждой точке мониторинга МОБ

Иммуноподвариант ОЛЛ		Точки мониторинга МОБ								
		15-й день			33-й день			78-й день		
		3	4-6	8	3	4-6	8	3	4-6	8
В-ОЛЛ	Всего исследований	139			148			54		
	Количество	59	68	12	51	79	18	3	38	13
	Частота (%)	42,4	49,0	8,6	34,4	53,4	12,2	5,6	70,4	24,0
Т-ОЛЛ	Всего исследований	30			26			–		
	Количество	9	19	2	6	18	2	–	–	–
	Частота (%)	30,0	63,3	6,7	23,1	69,2	7,7	–	–	–

группы характеризуются широким диапазоном видимых спектров возбуждения и излучения [14, 18]. Пассивно диффундируя сквозь цитоплазматическую мембрану эукариотических клеток, Syto селективно связывается с ДНК или РНК [12, 18], что позволяет проводить дальнейший анализ в пределах именно живых ядродержащих клеток (ЯСК) образца.

Нуклеотропные красители находят свое применение в различных областях клинической онкогематологии. Так, при трансплантации мобилизованных стволовых кроветворных клеток (СКК) или пуповинной крови оценка количества CD 34-клеток проводится в пределах Syto⁺-клеток образца, что позволяет избежать искусственного занижения или занижения пропорции СКК и, как следствие, сократить число необходимых цитаферезов у каждого конкретного больного [4].

В случае с оценкой МОБ, Syto 16 входит в диагностическую панель протокола ALL IC BFM 2009 как для В-линейных, так и для Т-линейных ОЛЛ, применимого на всех этапах полихимиотерапии. Однако упрощенный протокол госпиталя St. Jude для оценки МОБ на 15-й день индукционной химиотерапии предусматривает оценку клеток МОБ в пределах моноклеарной фракции костного мозга без учета жизнеспособности [9]. В лаборатории иммунологии гемопоэза НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России отработаны протоколы мониторинга МОБ на всех этапах терапии [1, 4, 5], включая оценку МОБ в условиях таргетной противорецидивной терапии [2].

Материалы и методы

В исследование включены 155 больных ОЛЛ из В-линейных пред-

шественников (в возрасте от 1 года до 18 лет; 48,7 % мальчиков и 51,3 % девочек), а также 31 больной ОЛЛ из Т-линейных предшественников (в возрасте от 2 до 17 лет; 83,9 % мальчиков и 16,1 % девочек). Все больные проходили диагностику и лечение на базе НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России. Диагноз устанавливался по совокупности морфоцитохимического (лаборатория гемоцитологии к.м.н. И. Н. Серебрякова) и иммунофенотипического (лаборатория иммунологии гемопоэза, заведующий д.м.н., проф. Н. Н. Тупицын) исследований пунктата костного мозга.

С учетом лечебных протоколов, применявшихся в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ ДООГ НМИЦ онкологии, согласно международным рекомендациям мониторинг МОБ осуществлялся на 15-й, 33-й и 78-й дни химиотерапии.

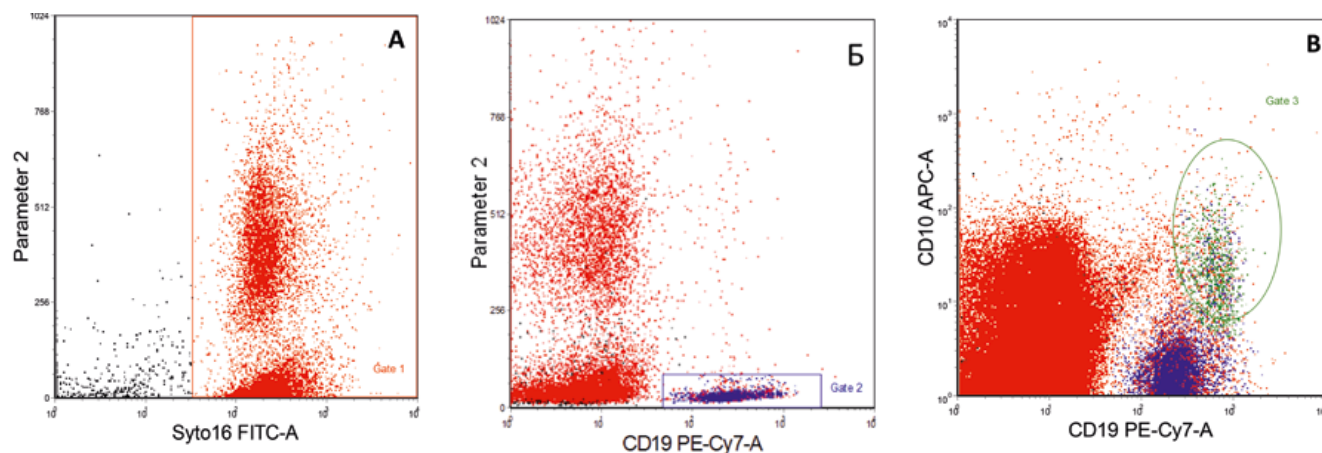


Рисунок 1. 15-й день индукционной химиотерапии. Пример отсутствия дебриса в образце костного мозга.

На цитограмме А представлена оценка количества ЯСК на основании экспрессии нуклеотропного красителя Syto 16 (ось X) против параметров бокового светорассеяния (gate 1, красный цвет). ЯСК в образце — 91,65%. Выявление количества В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось X) против параметров бокового светорассеяния (цитограмма Б, gate 2, синий цвет). CD19⁺-В-клеток в образце — 11,95% с учетом ЯСК. Без учета ЯСК — 11,05%. CD10-позитивных В-АП в образце — 0,83% с учетом ЯСК и 0,77% без учета ЯСК — МОБ-позитивный статус.

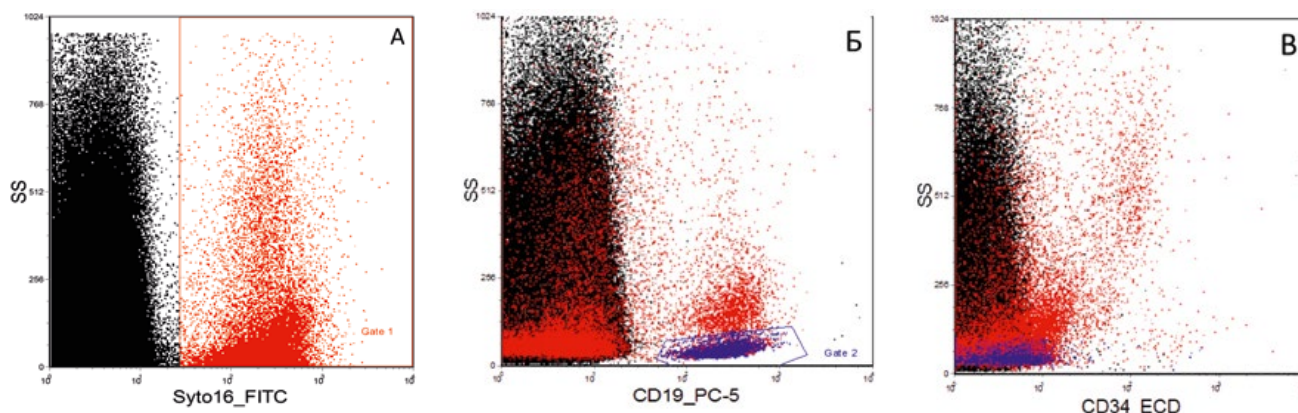


Рисунок 2. 15-й день индукционной химиотерапии. Пример значительного содержания дебриса в образце.

На цитограмме А показано выявление ЯСК на основании экспрессии нуклеотропного красителя Syto 16 против параметров бокового светорассеяния. В образце 3,65% ЯСК (gate 1, красный цвет). Оценку количества В-клеток (gate 2, синий цвет) в образце демонстрирует цитограмма Б — CD19 (ось X) против параметров бокового светорассеяния. Количество В-клеток в образце без учета ЯСК составляет 0,57%, при пересчете на ЯСК CD19⁺-клетки составляют 15,6%. Количество CD34⁺-В-АП составляет 0,0021% без учета ЯСК — МОБ-негативный статус. При пересчете с учетом Syto 16 CD34-позитивные В-АП составляют 0,06% — МОБ-позитивность.

Количество клеток МОБ проанализировано в 397 образцах костного мозга. Каждый пунктат при диагностике МОБ был охарактеризован морфологически и иммунологически. Подсчет миелограммы проводился двумя морфологами (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Романовского-Гимзе. Согласно стандартным морфологическим критериям по количеству бластных клеток выделялись М-варианты: М1 — образцы, в которых содержание бластных клеток не превышало 5,0%, М2 — образцы с количеством бластов от 5,0 до 25,0% и образцы группы М3 содержали 25,0% и более бластных клеток.

Данные о иммунологической оценке количества клеток МОБ представлены в табл. 1.

Анализ проточно-цитометрических файлов проводился с использованием программного обеспечения FCS Express v. 3. Обработка статистических данных — при помощи статистического пакета IBM-SPSS Statistics 17.

Результаты и обсуждение

Оценка МОБ на 15-й день терапии индукции ремиссии при В-ОЛЛ

На 15-й день терапии количество ЯСК было оценено в 80 образцах костного мозга на основании экспрессии Syto (16 или 41). Среднее количество ЯСК в образцах составило $78,9 \pm 2,8\%$, $n = 80$ и варьировало от 1,22 до 99,79%. Количество миелокариоцитов было достоверно прямо пропорционально числу

Syto⁺-клеток образцов ($R = 0,276$; $p = 0,014$; $n = 80$).

В большинстве случаев (86,25%) образцы характеризовались выраженной пропорцией ЯСК (50,0% и более) (среднее содержание Syto-позитивных клеток в данной выборке составило $87,6 \pm 1,4\%$; $n = 69$; разброс от 55,6 до 99,79%). Рис. 1.

В 13,7% образцов (11 из 80) количество ЯСК составило менее 50% (в среднем $24,0 \pm 5,2\%$). Менее 20% ЯСК содержалось в четырех пунктатах костного мозга (среднее $5,1 \pm 1,8\%$). Рис. 2.

Оценка МОБ на 15-й день терапии индукции ремиссии при Т-ОЛЛ.

На 15-й день терапии количество ЯСК было оценено в 20 образцах костного мозга на основании экспрессии

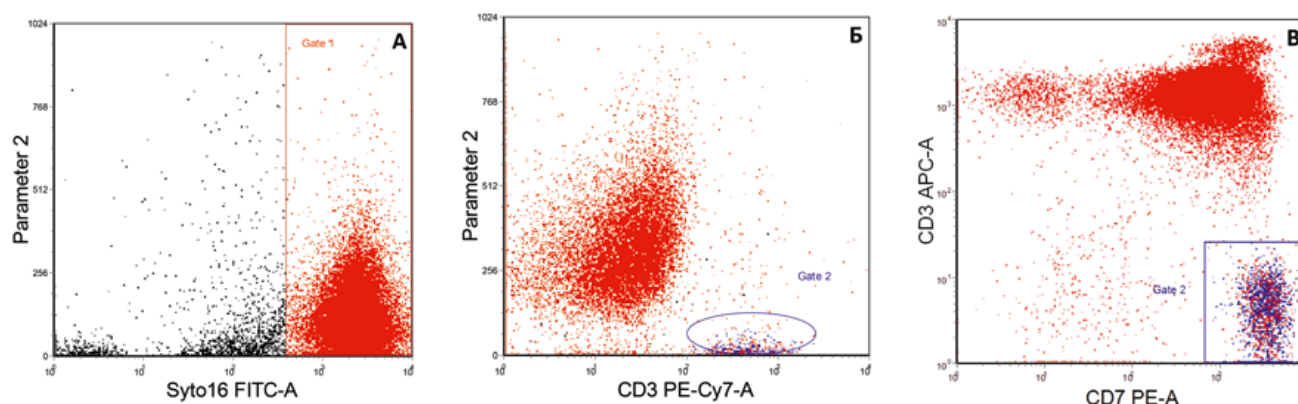


Рисунок 3. Пример использования Syto16 в оценке МОБ при Т-ОЛЛ.

На цитограмме А ЯСК образца (гейт 1, красный цвет) выделены на основании положительной реакции с нуклеотропным красителем Syto16 (ось X) против параметров бокового светорассеяния и оставили 94,2%. В пределах ЯСК на цитограмме Б выделены суCD3-позитивные Т-клетки (гейт 2, синий цвет) с низкими параметрами бокового светорассеяния (суCD3, ось X против SSC, ось Y). В гейте 2 на цитограмме В (CD7, ось X против smCD3, ось Y) выявлены Т-АП (клетки МОБ) с иммунофенотипом суCD3⁺CD7⁺smCD3⁺ в количестве 2,69% от миелокариоцитов — МОБ-позитивный статус.

Syto (16 или 41). Среднее количество ЯСК в образцах составило $81,6 \pm 3,9\%$, $n = 20$ и варьировало от 44,9 до 98,4%.

Большинство образцов (95,0%) характеризовались выраженной пропорцией ЯСК (50,0% и более) (среднее содержание Syto-позитивных клеток в данной выборке составило $83,6 \pm 3,6\%$; $n = 19$; разброс от 50,3 до 98,4%). Только один пунктат костного мозга на 15-й день терапии сохранил менее 50,0% ЯСК — 44,9%.

Заключение

Таким образом, необходимо и обязательно введение в панель детекции МОБ нуклеотропных красителей семейства Syto. Это позволяет четко выделить ЯСК образца, упрощает пересчет количества клеток МОБ и дает возможность исключить из анализа дебрис. Разбавление образца дебрисом может привести к занижению количества клеток МОБ и, как следствие, неверной риск-стратификации больных.

Список литературы

- Безнос О. А. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow. / О. А. Безнос, Л. Ю. Гривцова, А. В. Попа и соавт. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2017. — № 2. — С. 158–168.
- Безнос О. А. Подходы к оценке минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах в условиях таргетной терапии. / О. А. Безнос, Л. Ю. Гривцова, А. В. Попа и соавт. // Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — № 4. — С. 18–24.
- Гривцова Л. Ю. Оценка минимальной резидуальной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей методом трехцветной проточной цитометрии. / Л. Ю. Гривцова, А. В. Попа, Н. А. Купрышина и соавт. // Иммунология гемопоэза. — 2008. — Т. 2. — С. 8–33.
- Гривцова Л. Ю. Модифицированный метод оценки количества клеток-предшественников в кроветворной ткани. / Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Тупицын // Медицинский алфавит. 2016. — Т. 3. — № 30. — С. 50–53.
- Гривцова Л. Ю. К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии. / Л. Ю. Гривцова, А. В. Попа, И. Н. Серебрякова и соавт. // Иммунология гемопоэза. — 2011. — № 1. — С. 35–54.
- Basso G. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukaemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. / G. Basso, M. Veltroni, M. G. Valsecchi, et al. // J Clin Oncol. — 2009. — Vol. 27. — N. 31. — P. 5168–5174.
- Borowitz M. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's oncology group study / M. J. Borowitz, M. Devidas, S. P. Hunger et al. // Blood. — 2008. — Vol. 111. — N. 12. — P. 5477–5485.
- Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. / D. Campana // Hematol Oncol Clin North Am. — 2009. — Vol. 23. — N. 5. — P. 1083–1098.
- Coustan-Smith E. A simplified flow cytometry assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. / E. Coustan-Smith, R. C. Ribeiro, P. Stow // Blood. — 2006. — Vol. 108. — N. 1. — P. 97–102.
- Coustan-Smith E. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. / E. Coustan-Smith, J. Sancho, F. G. Behm et al. // Blood. — 2002. — Vol. 100. — N. 1. — P. 52–58.
- Eckert C. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia — Long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96 / C. Eckert, A. Stackelberg, T. KarlSeeger et al. // European Journal of Cancer. — 2013. — Vol. 49. — P. 1346–1355.
- Frey T. Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. / Frey T. // Cytometry. — 1995. — Vol. 21. — N. 3. — P. 265–274.
- Fronkova E. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 Protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? / E. Fronkova, E. Mejstrikova, S. Avigad, et al. // Leukemia. — 2008. — Vol. 22. — N. 5. — P. 989–997.
- Haughland RP. The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed. Carlsbad, CA: Invitrogen-Molecular Probes. — 2005.
- Ratei R. Monitoring treatment response of childhood precursors B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction / R. Ratei, G. Basso, M. Dworzak et al. // Leukemia. — 2009. — Vol. 23. — N. 3. — P. 528–534.
- Schrapppe M. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. / M. Schrapppe, A. Reiter, W.-D. Ludwig // Blood. — 2000. — Vol. 95. — N. 11. — P. 3310–3320.
- Steinherz P. G. Cyto reduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group / Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC et al. // Journal of Clinical Oncology. — 1996. — Vol. 14. — N. 2. — P. 389–398.
- Wlodkowic D. SYTO probes in the cytometry of tumor cell death. / D. Wlodkowic, J. Skommer, Z. Darynkiewicz // Cytometry A. — 2008. — Vol. 73. — N. 6. — P. 496–507.



Главное медицинское управление Управления делами Президента Российской Федерации;

ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации.

Ежегодная научно-практическая конференция

Сахарный диабет 2 типа в практике врача терапевта и эндокринолога

2 апреля 2018, Москва

Место проведения

ФГБУ «Поликлиника №1» УДП РФ, Большой конференц-зал (вход через проходную с Калошина пер., д.3, стр.2). Проезд до ст. метро Смоленская, Арбатская, Кропоткинская.

Начало регистрации и работа выставки с 09.00. Начало научной программы конференции в 10.00.

Регистрация и подробная информация на сайте www.eecmedical.ru, по эл. почте: info@eecmedical.ru, или по телефонам: +7 (495) 592-06-59, +7 (916) 567-35-29

EEC Medical
Educational Event Coordinator