

УДК 616.155.15-07.392-03

**КЛИНИЧЕСКОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ –
ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ
(Обзор литературы)**

Н.А. Совхозова, И.А. Цопова, Ш.А. Мурзаматова

Рассматривается метод проточной цитофлуориметрии, являющийся одним из важнейших инструментов, предоставляющих возможность провести углубленный анализ популяционного состава клеток периферической крови и костного мозга, и его направление – иммунофенотипирование (ИФТ) – способ, позволяющий при помощи моноклональных антител или каких-либо зондов, определить линейную принадлежность клеток при острых лейкозах. ИФТ дает возможность выявить особенности патогенеза острых лейкозов (ОЛ), а правильная интерпретация результата анализа является одним из путей повышения эффективности терапии. Современные протоколы лечения пациентов с ОЛ предусматривают обязательное определение линейной принадлежности и степени дифференцировки злокачественных клеток. Кроме этого ИФТ патологической популяции клеток при ОЛ дает возможность прогнозировать агрессивность течения заболевания и результаты терапии. В Кыргызстане ИФТ практически недоступно для пациентов, а диагностика ОЛ проводится старыми методами или по очень завышенной стоимости в частной лаборатории. Литературный обзор констатирует важность, значимость и необходимость развития этого направления для современной гематологической науки Кыргызстана, так как на основании полученных данных можно будет охарактеризовать иммунологические особенности ОЛ у детей и взрослых в Кыргызской Республике для проведения полихимиотерапии высокого риска для пациентов и разработать диагностические маркеры для обоснования различных возрастов, в различных регионах Кыргызстана.

Ключевые слова: проточная цитофлуориметрия; иммунофенотипирование; онкогематология; гемопоэз; острый лейкоз; моноклональные антитела; миелобластный лейкоз; лимфобластный лейкоз; вариант лейкоза; кластер дифференцировки.

**АГЫНДЫ ЦИТОМЕТРИЯЛАРДЫН КЛИНИКАЛЫК БАГЫТЫ –
КАТУУ КАРМАГАН ЛЕЙКОЗДО ИММУНДУК ФЕНОТИПТӨӨ
(Адабиятка сереп салуу)**

Н.А. Совхозова, И.А. Цопова, Ш.А. Мурзаматова

Бул макалада перифериялык кандын жана жүлүндүн клеткаларынын популяциялык курамына тереңдетип талдоо жүргүзүүгө мүмкүндүк берүүчү маанилүү каражаттардын бири болуп эсептелген агынды цитофлуориметрия ыкмасы жана анын багыты болгон - иммундук фенотиптөө (ИФТ) каралат, ал катуу кармаган лейкоздо моноклоналдык антителолордун же кандайдыр-бир зонддордун жардамы менен клеткалардын тилкелик таандыктыгын аныктоого мүмкүндүк берүүчү ыкма. ИФТ катуу кармаган лейкоздун патогенезинин өзгөчөлүктөрүн аныктоого мүмкүндүк берет, ал эми талдоо жүргүзүүнүн жыйынтыктарын туура интерпретациялоо дарылоонун натыйжалуулугун жогорулатуучу жолдордун бири болуп эсептелет. Катуу кармаган лейкоз менен ооруган бейтаптарды дарылоонун заманбап протоколдору залалдуу клеткалардын тилкелик таандыктыгын жана дифференцирлөө даражасын милдеттүү түрдө аныктоону алдын ала карайт. Мындан тышкары катуу кармаган лейкоздо патологиялык популяцияны иммундук фенотиптөө оорунун агрессивдүү өтүшүн жана дарылоонун жыйынтыктарын божомолдоого мүмкүндүк берет. Кыргызстанда иммундук фенотиптөө бейтаптар үчүн дээрлик жеткиликтүү эмес болууда, ал эми катуу кармаган лейкозду аныктоо эски ыкмалар менен же жеке менчик лабораторияларда өтө кымбат баада жүргүзүлүүдө.

Адабияттарга сереп салуу Кыргызстандын заманбап гематология илими үчүн бул багытты өнүктүрүүнүн маанилүүлүгүн жана зарылдыгын тастыктайт, анткени алынган маалыматтардын негизинде Кыргызстандын ар түрдүү аймактарында, ар түрдүү курактарды негиздөө үчүн бейтаптарга жогорку тобокелдиктеги полихимиотерапияны жүргүзүү жана диагностикалык маркерлерди иштеп чыгуу үчүн, Кыргыз Республикасында балдарда жана чоңдордо катуу кармаган лейкоздун иммундук өзгөчөлүктөрүн мүнөздөөгө болот.

Түйүндүү сөздөр: агынды цитофлуориметрия; иммундук фенотиптөө; онкогематология; гемопоэз; курч лейкоз; моноклоналдык антителолор; миелобласттык лейкоз; лимфобласттык лейкоз; лейкоздун варианты; дифференцирлөө кластери.

CLINICAL APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY –
IMMUNOPHENOTYPING OF ACUTE LEUKEMIA
(Literature review)

N.A. Sovkhozova, I.A. Tsopova, Sh.A. Murzamatova

The article is devoted to flow cytofluorometry method that is one of the most important tools that provide an opportunity to conduct an in depth analysis of the population composition of peripheral blood cells and bone marrow, and its direction – immunophenotyping, which, using monoclonal antibodies or any probes, allows you to determine the linear affiliation of cells in acute leukemia. Immunophenotyping allows to determine the features of pathogenesis of acute leukemia. The correct interpretation of immunophenotyping analysis is one of the way to increase the effectiveness of therapy. Modern treatment protocols for acute leukemia provide for the mandatory determination of the linear affiliation and degree of differentiation of malignant cells. In addition, the immunophenotyping of the pathological cell population in acute leukemia makes possible to predict the aggressiveness of the disease and the results of therapy. In Kyrgyzstan immunophenotyping analysis is provided only in a private laboratory at very high cost and for patients it is practically inaccessible. Because of it diagnosis of acute leukemia is performed using old methods. A literature review notes the importance, significance and necessity of developing of immunophenotyping the modern hematological science of Kyrgyzstan. Because this information will give possibility to characterize the immunological features of acute leukemia in children and adults in the Kyrgyz Republic for treatment with polychemotherapy, which has high risk for patients' healthy and to develop diagnostic markers to justify various ages and regions of Kyrgyzstan.

Keyword: flow cytofluorometry; immunophenotyping; oncohematology; hematopoiesis; acute leukemia; monoclonal antibodies; myeloid leukemia; lymphoblastic leukemia; leukemia variant; cluster of differentiation.

Введение. Иммунофенотипирование (ИФТ) на проточном цитометре в течение последних 30 лет активно применяется в онкогематологии и становится одним из наиболее приоритетных методов диагностики гемобластозов. Этот метод отличается от всех других, используемых в лабораторной диагностике онкогематологических заболеваний тем, что имеет способность проводить одновременную оценку множества параметров в сотне индивидуальных клеток в секунду, может использоваться для постановки диагноза, мониторинга течения и прогноза заболевания, определения минимальной остаточной болезни [1].

Современная гематология острые лейкозы (ОЛ) или гемобластозы относит к злокачественным заболеваниям крови. Основной характеристикой этой нозологической группы является клональное распространение генетически измененных клеток – предшественников гемопоэза [2]. Основная причина развития этой патологии – дисбаланс между пролиферацией и дифференцировкой клеток, который приводит к изменению в процессе нормального кроветворения. Количество опухолевых (бластных) клеток, образующихся в костном мозге, увеличивается в геометрической прогрессии, они мигрируют в периферическую кровь и распространяются в различные органы.

Лабораторная диагностика ОЛ начинается с микроскопии препаратов периферической крови и, в случае обнаружения в них бластов, обязывает провести исследование костного мозга. При выявлении в любом из этих биоматериалов 20 % и более бластных клеток диагностируется ОЛ [3]. Затем проводится морфологическое описание и цитохимическое исследование патологической популяции для определения миелоидной (ОМЛ) или лимфоидной (ОЛЛ) направленности лейкоза. В настоящее время эти постулаты есть в каждом руководстве по онкогематологии, однако врач-морфолог, проводящий исследование, должен иметь опыт, поэтому не всегда оценка патологической популяции, обнаруженной в биоматериале, адекватна. Именно на этом этапе для определения линейной принадлежности опухолевых клеток при ОЛ все современные гематологические школы рекомендуют использовать ИФТ [4]. К задачам ИФТ относят следующие:

1) определение варианта ОЛ в том случае, когда морфологическое и цитохимическое исследование не дает достаточной информации (например, если по сумме двух этих анализов установлен вариант по ФАБ, 1976 г. (группа французских, английских, германских гематологов), ОМЛ с минимальной дифференцировкой (M0) или мегакариобластный лейкоз (M7), то необходимо подтвердить миелоидную направленность бластных клеток и исключить ОЛЛ);

2) диагностика острого лейкоза бифенотипической природы;

3) характеристика aberrантного лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа бластов на момент постановки диагноза для последующего мониторинга минимальной остаточной болезни после лечения [5].

Как известно, на поверхности и в цитоплазме клеток, в том числе и гемопоэтических, определено более 150 специфических белков-антигенов, сгруппированных в так называемые кластеры дифференцировки – Cluster of differentiation (CD). Эти поверхностные молекулы являются мембранно-клеточными антигенами (липопротеинами) или рецепторами (антигенами), позволяющими идентифицировать множественные клеточные линии на разных стадиях созревания [6]. Во время проведения исследования на проточном цитометре используются суспензии, состоящие из клеток крови или костного мозга и моноклональных антител (МАТ), выполняющих роль специфической, своеобразной метки. Кроме этого суспензия содержит специальные красители – стабильные флюорохромы, например, такие как флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), фикоэритрин (ФЭ), перидинин-хлорофилл протеин (Per CP) и другие, имеющие большие способности по оценке клетки и ее компонентов.

Обнаружение флюоресценции каждого из этих специальных красителей и усиление светового сигнала клетки на фотоумножителях проточного цитометра позволяет одновременно получать информацию о физических параметрах клетки (размер и гранулярность) и наличии/отсутствии экспрессии тех или иных антигенов. В процессе исследования в проточном цитометре клеточная суспензия, впрыснутая под давлением через наконечник прибора в движущийся поток жидкости, приобретает единопольное движение. Затем клетки, имеющиеся в ее составе, выстраиваются друг за другом согласно принципу гидродинамического фокусирования и создают возможность для определения их специфических характеристик [7]. Измерения производят при пересечении клеткой сфокусированного лазерного луча, световые сигналы, получаемые при взаимодействии луча лазера

с клетками, регистрируются системой детектирования и преобразуются в элементы данных, которые можно анализировать и объединять с данными, полученными для других клеток в составе того же образца. ИФТ клеток методом многоцветной ПЦ делает возможным охарактеризовать их антигенные детерминанты, что помогает отдифференцировать острые лейкозы. Определение принадлежности лейкоцитарной клетки к той или иной линии кроветворения основано на положении о том, что опухолевые клетки являются аналогами здоровых и экспрессируют те же дифференцировочные антигены, которые появляются на мембране или в цитоплазме нормальных клеток на разных этапах дифференцировки [8].

Использование иммунологических маркеров и стандартной панели МАТ к антигенам миелоидных и лимфоидных клеток позволяет выявить как линейную принадлежность опухолевых клеток, так и определить стадию, где произошел сбой в дифференцировке клеток, что привело к появлению патологической популяции. Чем более широкий набор МАТ, тем выше возможность для обнаружения аномального экспрессирования антигенов на бластных клетках. Поэтому ИФТ послужило основой для разработки критериев, которые используются в иммунологической классификации лейкозов, как острых, так и хронических, и лимфом. Первая Европейская группа по иммунологической характеристике/классификации лейкозов (EGIL) рекомендует проводить иммунологическое фенотипирование лейкозов в два этапа.

Первый – дифференцирование между миелоидными и Т- или В-лимфобластными ОЛ с использованием наиболее специфических маркеров лимфоидного и миелоидного происхождения и несколько линейно-неспецифических маркеров (таблица 1).

Второй – уточнение варианта ОМЛ и степень дифференцировки клеток Т- или В-ОЛЛ в зависимости от результатов первого этапа [9].

Особое значение ИФТ бластных клеток имеет при ОМЛ вариантах М0, М6, М7. Например, для подтверждения миелоидной природы этих лейкозов применяют антитела к антигенам CD117, CD34, CD41a, CD13, CDw65 и MPO.

Таблица 1 – Маркеры для диагностики острого лейкоза

<i>1-й этап скрининга</i>
В-лимфоидные: цитоплазматический CD22, CD19, CD79a, CD10
Т-лимфоидные: цитоплазматический CD3, CD2, CD7
Миелоидные MPO, CD13, CD33, CDw65, CD177
Линейно-неспецифические: TdT, CD34, HLA-DR
<i>2-й этап скрининга</i>
При ОЛЛ и В-линейной природе blasts: цитоплазматический IgM, κ, λ-легкие цепи Ig, CD20, CD24
При ОЛЛ и Т-линейной природе blasts: CD1a, мембранный CD3, CD4, CD5, CD8, TCR α/β, TCR γ/δ
При ОМЛ: лизоцим, гликофорин А, CD14, CD15, CD16, CD64

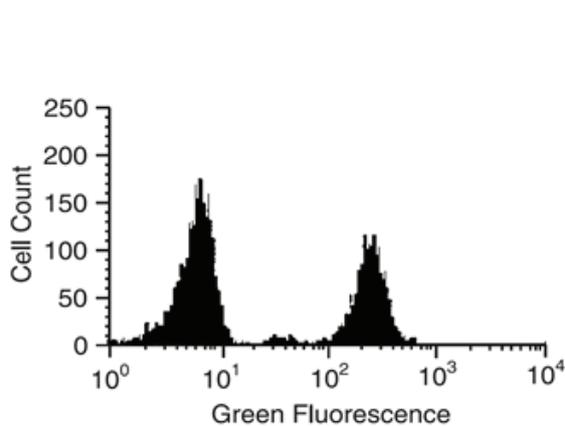


Рисунок 1 – Гистограмма с прямым и боковым светорассеянием

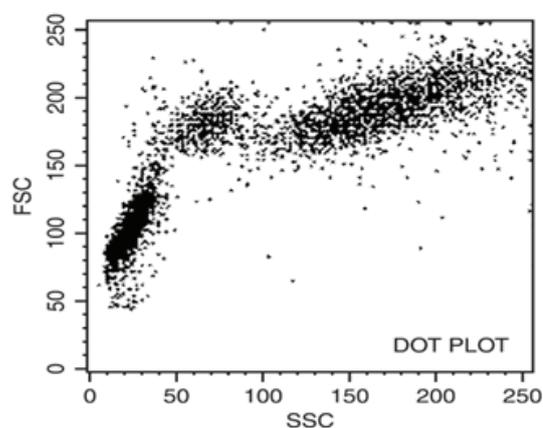


Рисунок 2 – Точечный график

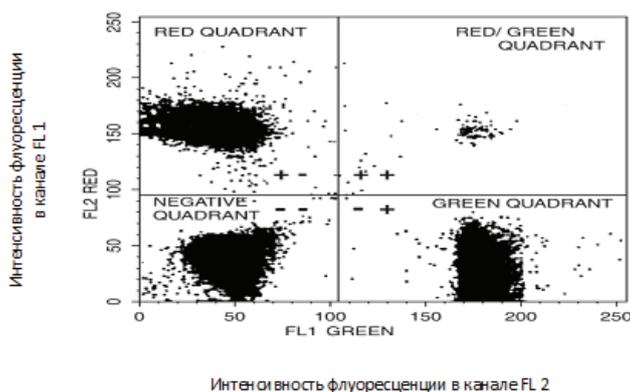


Рисунок 3 – Пример гистограммы для двух параметров

Козэкспрессия CD14 и CD64 характерна для миеломоно- и монобластных лейкозов. Для диагностики мегакариобластного лейкоза используют моноклональные антитела к специфичным маркерам тромбоцитов и мегакариоцитов – CD41, CD42, CD61. Для подтверждения В-клеточной природы ОЛ используют

моноклональные антитела к цитоплазматическим CD22 и CD19, цитоплазматическим и мембранным CD79a, CD10 и иммуноглобулинам. Т-клеточные острые лимфобластные лейкозы диагностируют, оценивая экспрессию цитоплазматических CD3, CD2, CD7, CD5, CD1a и коэкспрессию CD4 и CD8 [10]. Согласно

предложению группы, EGIL выделяют В- и Т-линейные ОЛЛ. В соответствии с уровнем дифференцировки В-лимфоцитов различают 4 подварианта В-ОЛЛ: VI (про-В), VII (common), VIII (пре-В), IV (зрелый В) ОЛЛ. Выделенные иммунологические варианты отличаются по клинике и ответу на терапию, поэтому их дифференциальной диагностике придается большое значение [11].

При типировании ОЛЛ по критериям классификации EGI самым часто встречаемым признается IV-вариант, который называется зрелый В-клеточный ОЛЛ. Его основной признак – поверхностная экспрессия μ -цепи молекулы иммуноглобулина (IgM) и/или одной из легких цепей. Тем не менее в современной литературе описаны случаи такого варианта лейкоза, где экспрессии иммуноглобулина М нет [12]. Кроме того, слабая экспрессия IgM иногда определяется на поверхности части бластных клеток при ВП-ОЛЛ.

Результат ИФТ ПЦ представляется в виде гистограммы, где интенсивность излучения схожих событий определяется по прямому и боковому светорассеянию или флуоресценции, которые собираются в каналах и затем графически отображаются, т. е. отражают количество клеток со схожими оптическими характеристиками (рисунок 1).

Еще одно представление ИФТ – точечный график (рисунок 2), здесь каждая точка соответствует одной клетке.

Рисунок 3 схематически изображает гистограммы для двух параметров, что дает возможность выделить в образце популяции клетки с различными сочетаниями исследуемых признаков: 1) популяцию с положительными результатами для одного из маркеров (+ -); 2) популяцию с положительными результатами для обоих маркеров (+ +); 3) популяцию с положительными результатами для одного из маркеров (- -); 4) популяцию с положительными результатами для обоих маркеров (- +).

В настоящее время в гематологической науке, к сожалению, нет единого стандарта для ИФТ ОЛ методом ПЦ и различные исследовательские группы предлагают свои диагностические панели и протоколы, среди которых наиболее

значимыми являются рекомендации Еврофлоры, Европейской сети лейкемии, международного консенсуса Бетесда [13].

Заключение. Согласно литературным данным, мировая заболеваемость ОМЛ в год составляет в среднем 3–5 человек на 100 тыс. населения. В когорте населения в возрасте от 60 лет и старше заболеваемость этим видом лейкоза резко возрастает и в возрасте 80 лет и старше составляет 12–13 человек на 100 тыс. Среди всех онкогематологических заболеваний детского возраста на первом месте стоит ОЛЛ, который составляет 25 % всех злокачественных новообразований в педиатрии, заболеваемость им даже в развитых странах составляет 3–4 случая на 100 тыс. детского населения в год [14, 15].

В Кыргызстане объективных эпидемиологических данных не существует, как таковой реестр больных только начинает формироваться, ИФТ ОЛ может проводить лишь одна частная лаборатория. Поэтому есть острая необходимость во внедрении и адаптации в Национальном центре онкологии и гематологии МЗ КР современной, инновационной методики ИФТ, которая облегчит дифференциальную диагностику не только ОЛ, но и другой онкогематологической патологии, пограничных состояний, позволит эффективно оценивать применение новых лекарственных препаратов (мабтера, кампас, велкейд) и мониторить процесс восстановления нормального гемопоэза.

Литература

1. Раимжанов А.Р. Некоторые аспекты диагностики и лечения острых лейкозов / А.Р. Раимжанов, И.А. Цопова, Ш.А. Мурзаматова // Вестник КРСУ. 2015. Т. 15. № 11. С. 138–143.
2. Бабяк А.С. Острые лейкозы / А.С. Бабяк, А.В. Полина, Е.П. Шилова // Международный студенческий научный вестник. 2018. № 4 (часть 2). С. 97–102.
3. Cheson B.D., Bennet J.M., Kopecky K.J. et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia // J. Clin. Oncol. 2003. P. 4642–4649.

4. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови / под ред. В.Г. Савченко. М.: НЦОМГ, 2018. Т. 1. 1006 с. № 1. 2008. С. 68–72.
5. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых // Российское национальное гематологическое общество. М., 2018. 75 с.
6. Дроздова М.В. Заболевания крови / М.В. Дроздова. М.: Медицина, 2009. 407 с.
7. Битанова Э.Ж. Проточная цитометрия: преимущества метода и области применения / Э.Ж. Битанова, А.С. Тарабаева; КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, кафедра общей иммунологии // Вестник КазНМУ. 2017. № 4. С. 465–467.
8. Диагностика болезней внутренних органов / под ред. А.Н. О कोरोкова. М.: Мед. лит., 2013. Т. 4. 512 с.
9. Луговская С.А. Лабораторная диагностика острых лейкозов / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь. Тверь: Губернская медицина, 1999. 80 с.
10. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H. et al. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization classification of tumours. Lyon, France: LARC Press. 2001. P. 67–69.
11. Bene M., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) // Leukemia 1995;9 (10):1783–6. PMID: 7564526.
12. Kelemen K., Braziel R.M., Gatter K. et al. Immunophenotypic Variations of Burkitt Lymphoma // Am J Clin Pathol. 2010; P. 127–138.
13. Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева. 4-е изд. М.: Ньюдиамед, 2007. 1275 с.
14. Раимжанов А.Р. Острые лейкозы: учебник / А.Р. Раимжанов, Э.К. Макимбетов, И.А. Цопова, А.А. Усенова. Бишкек, 2009.
15. Стамбеков С.А. Доступность онкологической помощи детям в Кыргызской Республике. Современное состояние. Пути решения проблем. URL: https://soros.kg/srs/wp-content/uploads/2018/12/Research-report_Stambekov.pdf