

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 15.11.2019
Принята к печати 23.12.2019

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-58-67

Иммунологические особенности В-линейных предшественников на 15-й день терапии острого лимфобластного лейкоза у детей. Сопоставление протоколов оценки минимальной остаточной болезни и собственные результаты

О.А. Чернышева, И.Н. Серебрякова, Н.А. Купрышина, Е.Н. Шолохова, М.А. Шервашидзе, Б.В. Курдюков, А.В. Попа, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Контактная информация:
Чернышева Ольга Алексеевна, канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунологии гемопоза НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.
Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
E-mail: dr.chernysheva@mail.ru

Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й день терапии острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников (В-ОЛЛ) у детей имеет ключевое значение в прогнозе заболевания. При оценке МОБ необходимо учитывать особенности первичного иммунофенотипа опухолевых В-лимфобластов. Для оценки МОБ в середине терапии индукции ремиссии (15-й день лечения) предложены несколько иммунологических подходов, имеющих общую концепцию, но отличающихся принципиально важными деталями. Цель данной работы: проанализировать сложившиеся проточно-цитометрические (ПЦ) протоколы основных исследовательских групп (*Berlin-Frankfurt-Munster Group*, *госпиталь St. Jude*, *Children's Oncology Group*) и сопоставить их данные с собственными результатами при оценке в соответствии с различными подходами. Исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено Ученым советом НИИ Клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. В исследование включили 131 больного с В-ОЛЛ в возрасте от 1 года до 17 лет (медиана – 5,53 года). Преобладал пре-пре-В-иммуноподвариант (92,4% случаев). У всех больных на 15-й день проведено морфологическое (подсчет миелограммы) и иммунологическое (оценка МОБ) исследование костного мозга. При сопоставлении ПЦ-протоколов оценки МОБ на 15-й день показано, что CD10 – более надежный критерий выявления В-ЛП по сравнению с CD34. Экспрессия CD45 может служить дополнительным критерием детекции В-ОЛЛ. Пересчет на мононуклеарную фракцию – более жесткий критерий определения МОБ. Научная новизна исследования состоит в том, что впервые на 15-й день терапии проведено подробное сопоставление данных ПЦ с цитологической картиной костного мозга: впервые показано, что не все В-ЛП, выявленные на основании CD10⁺/CD19⁺/CD34⁺/CD45^{low}, aberrантны по CD58/CD38. **Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, В-линейные предшественники, иммунофенотип

Чернышева О.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 58–67.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-58-67

Immunological features of B-linear progenitors on the 15th day of acute lymphoblastic leukemia therapy in children. Comparison of minimal residual disease assessment protocols and own results

O.A. Chernysheva, I.N. Serebryakova, N.A. Kupryshina, E.N. Sholokhova, M.A. Shervashidze, B.V. Kurdyukov, A.V. Popa, N.N. Tupitsyn

N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center, Moscow

Evaluation of minimal residual disease (MRD) on the 15th day of treatment of acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors (B-ALL) in children is of key importance in the prognosis of the disease. When evaluating the MRD, it is necessary to take into account the features of the primary immunophenotype of tumor B-lymphoblasts. To assess the MRD on the 15th day of treatment several immunological approaches have been proposed that have a general concept, but differ in fundamentally important details. The purpose of this work was to analyze the established flow cytometry (FC) protocols of the main research groups (*Berlin-Frankfurt-Munster Group*, *St. Jude Hospital*, *Children's Oncology Group*) and to compare the results evaluated according to those approaches. This study was approved by the Independent Ethical Committee N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center. The study included 131 patients with B-ALL aged 1 to 17 years (median 5.53). Pre-Pre-B immunosubvariant prevailed (92.4%). A morphological (myelogram count) and immunological (MRD assessment) study of the BM was performed in all patients on the 15th day. Comparing the FC protocols of the MRD on the 15th day, it was shown that CD10 was a more reliable criterion for the detection of B-LP in comparison with CD34. The expression of CD45 may serve as an additional criterion for the detection of B-LP. The recalculation of the mononuclear cells is a more stringent criterion for determining the MRD. The scientific novelty is that for the first time on the 15th day, a detailed comparison of flow cytometry data with a cytological picture of the bone marrow was carried out. It was shown for the first time that not all B-LP detected on the basis of CD10⁺/CD19⁺/CD34⁺/CD45^{low} are aberrant according to CD58/CD38.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, B-linear progenitors, immunophenotype

Chernysheva O.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 58–67.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-58-67

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 15.11.2019
Accepted 23.12.2019

Correspondence:
Olga A. Chernysheva, PhD, laboratory of hematopoiesis immunology, N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center.
Address: Russia 115478 Moscow, Kashirskoye sh., 24
E-mail: E-mail: dr.chernysheva@mail.ru

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) у детей как один из основных критериев риск-стратификации и факторов прогноза заболевания включена в большинство современных лечебных программ [1–3]. В зависимости от этапа терапии оценка количества клеток МОБ решает определенные клинические задачи. Так, в середине терапии индукции ремиссии количество клеток МОБ в костном мозге (КМ) наиболее полно отражает первичный ответ на лечение [4], в то время как клиренс бластов на 8-й день – это только ответ на стероиды [5]. При этом было установлено, что большое значение имеет эффект первой линии терапии [6]. Важно отметить, что интенсивность проводимых режимов полихимиотерапии приводила к развитию серьезных долговременных побочных эффектов и перелеченности больных [7–12]. Таким образом, именно с учетом МОБ на 15-й день стало возможным выявление группы больных с хорошим ответом на терапию, которым можно снизить дозы антрациклинов с целью уменьшения частоты развития осложнений и улучшения качества жизни [13, 14]. В настоящее время редукция доз антрациклинов с учетом количества клеток МОБ на 15-й день индукционной химиотерапии предусмотрена протоколами группы BFM (протокол BFM-ALL-IC 2009).

В зависимости от этапа лечения иммунологические подходы к оценке МОБ различны. Это обусловлено закономерными процессами, протекающими в костном мозге под действием системной терапии. Уникальна с иммунологической точки зрения ситуация, формирующаяся к середине терапии индукции ремиссии (15-й день). Основу лечения на данном этапе составляет системное введение глюкокортикостероидов. В экспериментальных работах показана высокая чувствительность В-линейных предшественников (В-ЛП) к кортикостероидам [15]. Кроме того, у больных с ОЛЛ из Т-линейных предшественников, а также с опухолями мозга показана полная элиминация CD19-позитивных В-ЛП (CD34⁺/CD10⁺), либо их количество не превышало 0,01% к концу индукционной химиотерапии [16].

На данный момент в клинической практике сформировались несколько подходов к оценке МОБ методом многопараметровой проточной цитометрии (ПЦ) при В-ОЛЛ у детей. Они разработаны примерно в одно и то же время, но каждый подход имеет свои особенности. Сопоставление иммунологических панелей антител (АТ) представлено в *таблице 1* [1, 17].

В большинстве случаев В-ЛП имеют CD19⁺CD10⁺ иммунофенотип. Данная комбинация антител включена во все ПЦ-протоколы детекции МОБ. В-лимфобласты характеризуются также экспрессией

стволовоклеточного антигена CD34, который присутствует в панелях детекции МОБ всех исследовательских групп.

Протокол госпиталя St. Jude разработан как упрощенный для стран с ограниченными ресурсами и позволяет выявить остаточные бласты в середине индукционной химиотерапии (15–19-й дни). С учетом доказанной чувствительности нормальных В-ЛП к стероидам [15] и их отсутствия в КМ к середине терапии индукции ремиссии достаточно определить с количеством CD19⁺CD10⁺ и/или CD34⁺ клеток. Несмотря на бурное развитие технических возможностей современной проточной цитометрии, позволяющих анализировать 12 и более параметров на одной клетке, соревнование в «многоцветности» не должно превалировать над выполнением клинической задачи данного исследования.

Исходя из задач МОБ-диагностики на 15-й день – определение количества остаточных бластов для риск-стратификации больных, трехцветный протокол госпиталя *St. Jude* может быть оптимальным для рутинной практики. Значительное преимущество данного протокола – простота выполнения, а следовательно, высокая воспроизводимость, низкая стоимость исследования и доступность для большинства клиник. Кроме того, эта

Таблица 1
Комбинации МКА для выявления клеток МОБ при В-ОЛЛ у детей, используемые различными исследовательскими группами

Table
Monoclonal antibody combinations for detection of minimal residual disease in children B-ALL used by various research groups

Протокол Protocol	Панель МКА Monoclonal antibody panel
Госпиталь <i>St. Jude</i> Hospital <i>St. Jude</i> (<i>Coustan-Smith E., et al.</i>)	CD19/CD10 и/или CD19/CD34 and/or
AIEOP-BFM-ALL 2009 (<i>Basso J., et al.</i>)	1. Syto16/CD10/CD45/CD19 2. CD20/CD10/CD34/CD19 3. CD58/CD10/CD45/CD19 4. CD10-CD20/CD38/CD45/CD19
COG (<i>Borowitz M., et al.</i>)	4-цветная 4-color 1. CD20/CD10/CD45/CD19 2. CD34/CD9/CD45/CD19 6-цветная 6-color 1. CD20/CD10/CD38/CD58/CD19/CD45 2. CD9/CD13+CD33/CD34/CD10/CD19/CD45

методика позволяет обойтись одной пробиркой – это важно, так как большинство образцов КМ на 15-й день индукционной химиотерапии – гипоклеточные, а набор необходимого количества клеток для достоверного анализа при использовании двух и более пробирок затруднен [17, 18]. Важно отметить, что подсчет остаточных бластов по протоколу госпиталя *St. Jude* ведется на моноклеарную фракцию КМ.

Протокол группы BFM оптимизирован для выявления МОБ на всех этапах терапии. Он позволяет не только определиться с количеством В-ЛП ($CD19^+CD10^+CD34^+CD20^-$), но и выявить aberrантный (лейкоз-ассоциированный) иммунофенотип (ЛАИФ) бластов на основании гиперэкспрессии CD58 и CD10. Таким образом, данный протокол достаточно универсален, но все же не позволяет учесть альтернативные ЛАИФ в случае отсутствия aberrантности по указанным антигенам [19].

Наиболее полно оценить ЛАИФ позволяет **протокол *Children's oncology group* (COG, США)**, в котором учтен анализ сочетания антигенов CD58 и CD38, наиболее часто используемого для оценки aberrантности. Возможен поиск остаточных бластов по коэкспрессии пан-миелоидных антигенов (CD13 и CD33), а также на основании молекулы CD9. Лечебный протокол группы COG подразумевает оценку количества клеток МОБ только в конце терапии индукции (29–33-й дни) и по окончании индукции консолидации (78-й день), но с учетом широты включенных в панель антигенов может быть применен и на 15-й день.

И протокол группы BFM, и протокол группы COG подразумевают подсчет количества остаточных бластов на все ядродержащие клетки образца КМ (миелокарициты). Важная особенность КМ больных ОЛЛ в процессе терапии – его гипоклеточность, а также содержание значительного количества дебриса, появляющегося под влиянием химиотерапии. В лаборатории иммунологии гемопозза проведено исследование по оценке значения применения нуклеотропных красителей семейства *Syto* на 15-й день терапии ОЛЛ. В этой работе показана целесообразность их включения в проточно-цитометрическую панель для корректной оценки количества клеток МОБ [18].

Отдельный вопрос детекции МОБ – определение порогового уровня, то есть значения, выше которого образец КМ следует считать МОБ-позитивным. Так, пороговым считается уровень менее 17 лейкозных бластов/мкл, то есть с учетом средней клеточности образцов КМ – 0,01% на миелокарициты (10^{-4}) [5, 17]. Данная величина принята исследовательской группой BFM и учитывается в ее лечебных протоколах на всех этапах терапии как пороговый уровень

МОБ-негативности. В настоящее время с учетом возможностей многопараметровой ПЦ (оценка 12 и более параметров) и анализа большого количества клеток (2 млн и более) чувствительность метода достигает 10^{-5} – 10^{-6} и сопоставима с молекулярными методами [18, 20].

Учитывая разнообразие проточно-цитометрических протоколов по оценке МОБ, целью данного исследования было сопоставление предложенных алгоритмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено Ученым советом НИИ Клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

В исследование включен 131 больной В-ОЛЛ (64 мальчика и 67 девочек) в возрасте от 1 до 17 лет (медиана – 5,53 года), проходивший лечение в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с 2007 по 2017 год. Диагноз устанавливали по совокупности морфоцитохимического и иммунофенотипического исследований пунктата КМ. Пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ был установлен в 92,4% случаев; про-В-вариант диагностирован у 10 больных. Во всех случаях на 15-й день лечения проводили морфологическое и иммунологическое (оценка МОБ) исследования пунктата КМ.

Подсчет миелограммы вели два морфолога (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Романовского–Гимзе. Согласно стандартным морфологическим критериям по количеству бластных клеток выделяли М-варианты: М1 – образцы, в которых содержание бластных клеток не превышало 5,0%; М2 – образцы с количеством бластов от 5,0 до 25,0%; в образцах группы М3 – 25,0% и более бластных клеток.

Иммунологически клетки остаточной опухоли выявляли на основании экспрессии пан-В-клеточного антигена CD19 в сочетании с CD45, CD10 и CD34. Для сопоставления различных подходов к оценке количества клеток МОБ подсчет проводили с помощью двух алгоритмов: в пределах моноклеарной фракции образца (МНК) и в пределах ядродержащих (*Syto+*) клеток (ЯСК) образца КМ. Проанализирован также иммунофенотип клеток МОБ в отношении основных маркеров aberrантности (CD58 и CD38).

Анализ проточно-цитометрических файлов проводили с использованием программного обеспечения *FCS Express v.3*; обработку статистических данных – при помощи статистического пакета *IBM-SPSS Statistics-17*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологический и иммунологический анализы пунктатов КМ вели параллельно из одной пробирки. Большинство больных (80,0%) с учетом морфологических критериев попали в группу M1 (< 5,0% бластных клеток в КМ), при этом в 9,2% пунктатов бластных клеток морфологически не выявлено. Группу M2 составили 19 больных, в образцах КМ

которых согласно морфологическим данным количество бластов варьировало от 5,0 до 25,0%. Группа M3 ($\geq 25\%$) – 7 больных, в образцах КМ которых выявили 25% и более бластных клеток. Распределение больных по уровням МОБ на 15-й день представлено в *таблице 2*. Важно, что 11 больных достигли МОБ-негативного статуса, а еще трое – порогового значения МОБ. Для этой группы больных может быть рассмотрен вопрос о снижении доз антрациклинов с учетом всех факторов прогноза.

Таблица 2

Распределение больных по уровням МОБ на 15-й день лечения

Table 2

Patient distribution by levels of minimal residual disease on the 15th day of therapy

Уровень МОБ, % MRD level, %	Среднее значение МОБ, % MRD mean value, %	Количество больных Number of patients
МОБ < 0,01 MRD < 0,01	0,027	11
МОБ = 0,01 MRD = 0,01	0,01	3
0,01 < МОБ < 0,1 0,01 < MRD < 0,1	0,055	30
0,1 ≤ МОБ < 1,0 0,1 ≤ MRD < 1,0	0,94	40
1,0 ≤ МОБ < 10,0 1,0 ≤ MRD < 10,0	3,89	32
МОБ ≥ 10,0 MRD ≥ 10,0	27,0	15

Сопоставление различных иммунологических протоколов оценки МОБ на 15-й день терапии.

Мы сопоставили подход, основанный на выявлении aberrантных (по CD58 и CD38) В-ЛП в пределах ЯСК, и протокол, определяющий клетки МОБ на основании CD10⁺ и/или CD34⁺ В-клеток в пределах МНК на 15-й день. Важно, что при сопоставлении результатов подсчета клеток МОБ в пределах ЯСК и в пределах МНК ситуация в целом значительно не менялась. Однако два пациента перешли из группы МОБ-негативности (< 0,01%) в группу МОБ-положительного статуса, оставшись при этом в группе стандартного риска. Изменение группы риска со стандартного на промежуточный установлено у 6 больных, чей уровень МОБ стал более 0,1% при пересчете на МНК. В группу высокого риска перешли 6 пациентов группы промежуточного риска.

Таким образом, подсчет в пределах МНК – более жесткий критерий риск-стратификации пациентов на 15-й день лечения.

Таблица 3

Сопоставление количества клеток МОБ, выявленных на основании экспрессии различных маркеров В-ЛП

Table 3

Comparison of MRD cells number identified by the expression of various BCPs markers

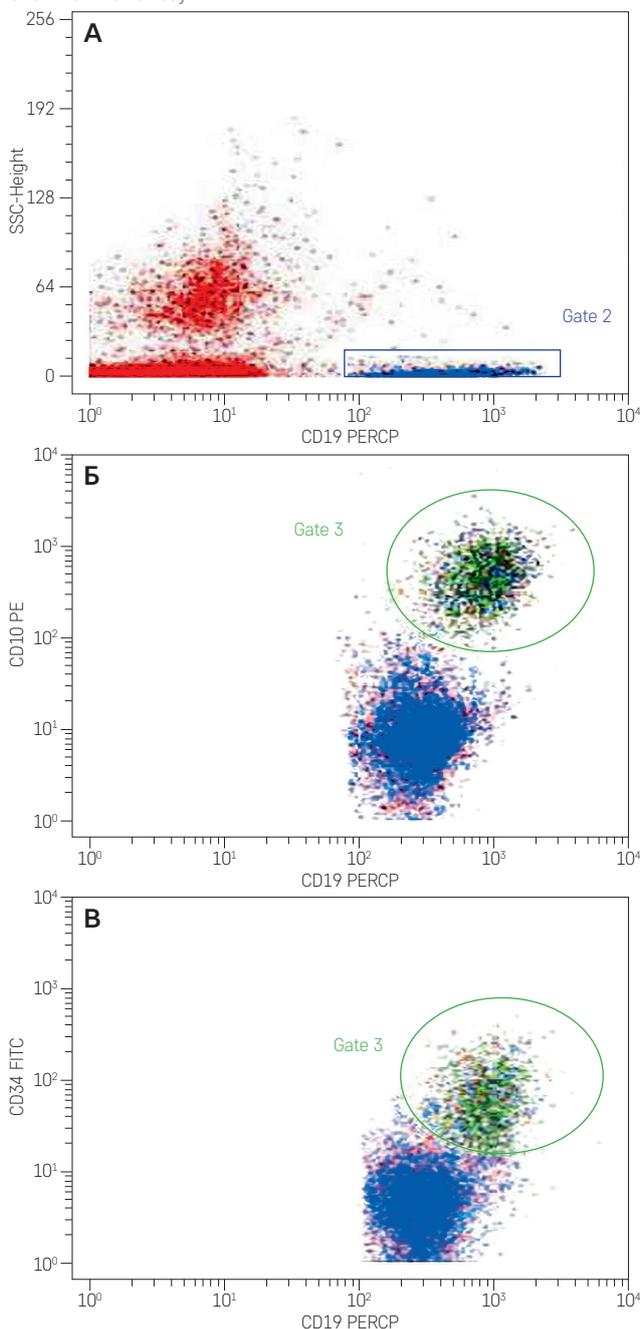
Параметр Parameter	Стандартный риск Standard risk group		Промежуточный риск Intermediate risk group		Высокий риск High risk group
	МОБ < 0,01 MRD < 0,01	0,01 < МОБ < 0,1 0,01 < MRD < 0,1	0,1 < МОБ < 1,0 0,1 < MRD < 1,0	1,0 < МОБ < 10,0 1,0 < MRD < 10,0	
Уровни МОБ, % MRD levels, %	МОБ < 0,01 MRD < 0,01	0,01 < МОБ < 0,1 0,01 < MRD < 0,1	0,1 < МОБ < 1,0 0,1 < MRD < 1,0	1,0 < МОБ < 10,0 1,0 < MRD < 10,0	МОБ ≥ 10,0 MRD ≥ 10,0
CD10, % от ЯСК CD10, % NC	0,003 ± 0,001 0,0–0,009 n = 11	0,05 ± 0,005 0,0–0,099 n = 31	0,3 ± 0,05 0,0–1,0 n = 34	4,3 ± 0,7 0,0–19,25 n = 31	24,3 ± 4,1 0,0–48,1 n = 12
CD34, % от ЯСК CD34, % NC	0,001 ± 0,0007 0,0–0,005 n = 8	0,03 ± 0,005 0,0–0,08 n = 22	0,2 ± 0,04 0,0–0,68 n = 28	1,7 ± 0,5 0,0–9,79 n = 22	16,1 ± 4,6 0,06–42,6 n = 9
CD45 ^{low/-} , % от ЯСК CD45 ^{low/-} , % NC	0,2 ± 0,09 0,0–0,5 n = 6	0,1 ± 0,05 0,0–0,7 n = 14	0,7 ± 0,2 0,0–2,94 n = 19	2,4 ± 0,5 0,0–9,0 n = 22	21,3 ± 6,2 0,0–59,8 n = 10
В-ЛП, % от ЯСК BCP, % NC	0,003 ± 0,001 0,0–0,009 n = 11	0,05 ± 0,005 0,01–0,099 n = 31	0,4 ± 0,04 0,1–0,81 n = 35	3,9 ± 0,4 1,02–9,88 n = 32	24,2 ± 3,2 10,5–48,1 n = 12
CD58/CD38, % от ЯСК CD58/CD38, % NC	0,001 ± 0,0007 0,0–0,003 n = 4	0,02 ± 0,01 0,0–0,092 n = 7	0,2 ± 0,1 0,02–0,6 n = 6	0,7 ± 0,5 0,0–3,8 n = 7	10,2 ± 6,6 0,009–27,5 n = 4

Рисунок 1

Пример совпадения количества В-ЛП, оцененных на основании экспрессии CD10 и CD34; пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ, CD34+ на 15-й день

Figure 1

Example of coincidence of the number of BCPs evaluated by expression of CD10 and CD34; pre-pre-B immunosubvariant of ALL, CD34+ on the 15th day



На цитограммах **A–B** представлен пример оценки В-ЛП на основании экспрессии антигенов CD10 и CD34: **A** – гейт В-клеток (gate 2, синий цвет) CD19⁺ (ось x) против параметров бокового светорассеяния (ось y); CD19⁺ В-клетки составили 11,81%; **B** – в пределах В-клеток определялись В-ЛП с отчетливой экспрессией CD10 (ось y) против CD19 (ось x) в количестве 2,52% (gate 3, зеленый цвет); **B** – CD19 (ось x) против CD34 (ось y); количество CD34-положительных В-клеток – 2,35% (gate 3, зеленый цвет).

On cytograms **A–B**, an example of BCP assessment based on expression of CD10 and CD34 antigens: **A** – B-cell gate (gate 2, blue) CD19⁺ (x axis) versus side scattering (y axis); CD19⁺ B cells accounted for 11.81%; **B** – BCP was detected within the B-cells by distinct expression of CD10 (y axis) against CD19 (x-axis) in the amount of 2.52% (gate 3, green); **B** – CD19 (x-axis) versus CD34 (y-axis); the number of CD34 positive B-cells – 2.35% (gate 3, green).

Иммунологические подходы к выявлению В-линейных предшественников в образцах костного мозга на 15-й день терапии

Определение В-ЛП основано на выявлении экспрессии антигенов CD10, CD34, CD45 и их сочетаний на CD19⁺В-клетках. Согласно ПЦ-протоколам группы BFM при оценке количества клеток МОБ всегда выбирают большее значение из всех В-ЛП, оцененных на основании экспрессии CD10, и/или CD34, и/или CD45.

В рамках этого исследования мы проанализировали экспрессию указанных антигенов на В-клетках на 15-й день терапии в зависимости от первичного иммунофенотипа опухоли. Проанализировано также количество клеток МОБ на основании каждого из маркеров клеток-предшественников (таблица 3).

Количество В-ЛП, выявленных на основании экспрессии CD10 и CD34, было сопоставлено в 88 образцах КМ больных с пре-пре-В-иммуноподвариантом ОЛЛ, анализируемых на 15-й день индукционной химиотерапии. В 43 (48,9%) образцах количество В-ЛП, оцененных на основании экспрессии CD10 и CD34, совпадало (рисунок 1). Однако 51 (57,9%) случай из 88 демонстрировал различие по данным параметрам. В 35 (39,8%) из 88 случаев преобладали CD10⁺ В-клетки, при этом CD34-негативными при первичной диагностике были только 21,6% случаев (рисунок 2). В 10 (11,3%) образцах КМ преобладали CD34⁺ В-ЛП (рисунок 3).

Экспрессия CD45 для выявления В-ЛП была оценена в 77 образцах КМ. При оценке количества В-ЛП по слабой экспрессии антигена CD45 или ее отсутствию установлено, что в большинстве случаев – в 47 (61%) из 77 – количество В-ЛП, выявленное на основании экспрессии CD10⁺CD34⁺ и CD45^{low/-}, совпадало (рисунок 4). Однако полного совпадения не получено, так как часть нормальных зрелых В-клеток слабее экспрессирует CD45 по сравнению с лимфоцитами. Таким образом, происходит некоторое завышение количества В-ЛП за счет нормальных зрелых В-клеток, слабо экспрессирующих антиген CD45. В группе высокого риска данные показатели совпали. При корреляционном анализе установлено, что количество CD10/CD34-положительных В-ЛП было достоверно прямо пропорционально числу CD45^{low/-} В-клеток ($R = 0,836$; $p < 0,0001$; $n = 77$). Таким образом, оценка количества В-ЛП, несомненно, должна производиться на основании экспрессии комбинации антигенов CD34, CD10 и CD45.

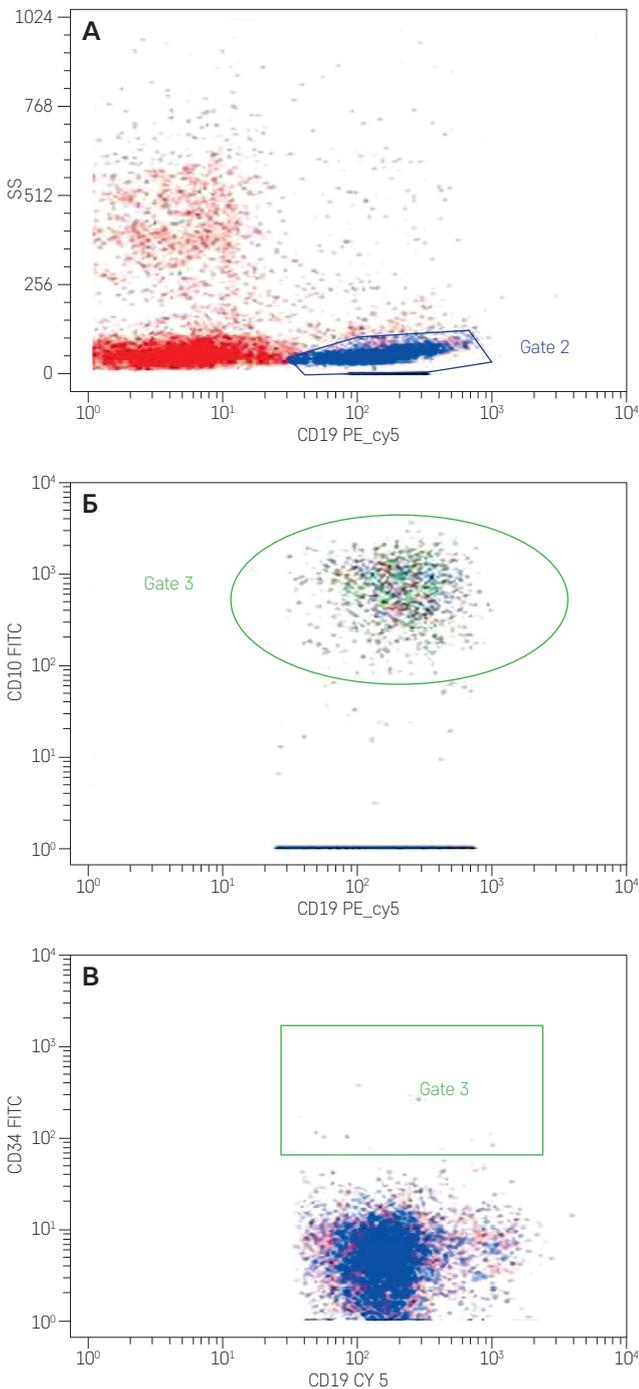
В случае про-В-иммуноподварианта, характеризующегося отсутствием экспрессии CD10, оценку количества В-ЛП проводили на основании числа TdT⁺cyCD22⁺клеток (рисунок 5).

Рисунок 2

Пример преобладания CD10⁺ В-ЛП на 15-й день; пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ, CD10⁺CD34⁺

Figure 2

An example of the predominance of CD10-positive BCPs on day 15; pre-pre-B immunosubvariant of ALL, CD10⁺CD34⁺



Цитограмма А: выявление В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось x) против параметров бокового светорассеяния (ось y) – gate 2, синий цвет. CD19⁺ В-клетки составили 18,2%. Цитограмма Б: в пределах В-клеток определялись В-ЛП с отчетливой экспрессией CD10 (ось y) против CD19 (ось x) в количестве 3,94% (gate 3, зеленый цвет). Цитограмма В: CD19 (ось x) против CD34 (ось y). Количество CD34-позитивных В-клеток – 0,13% (gate 3, зеленый цвет).

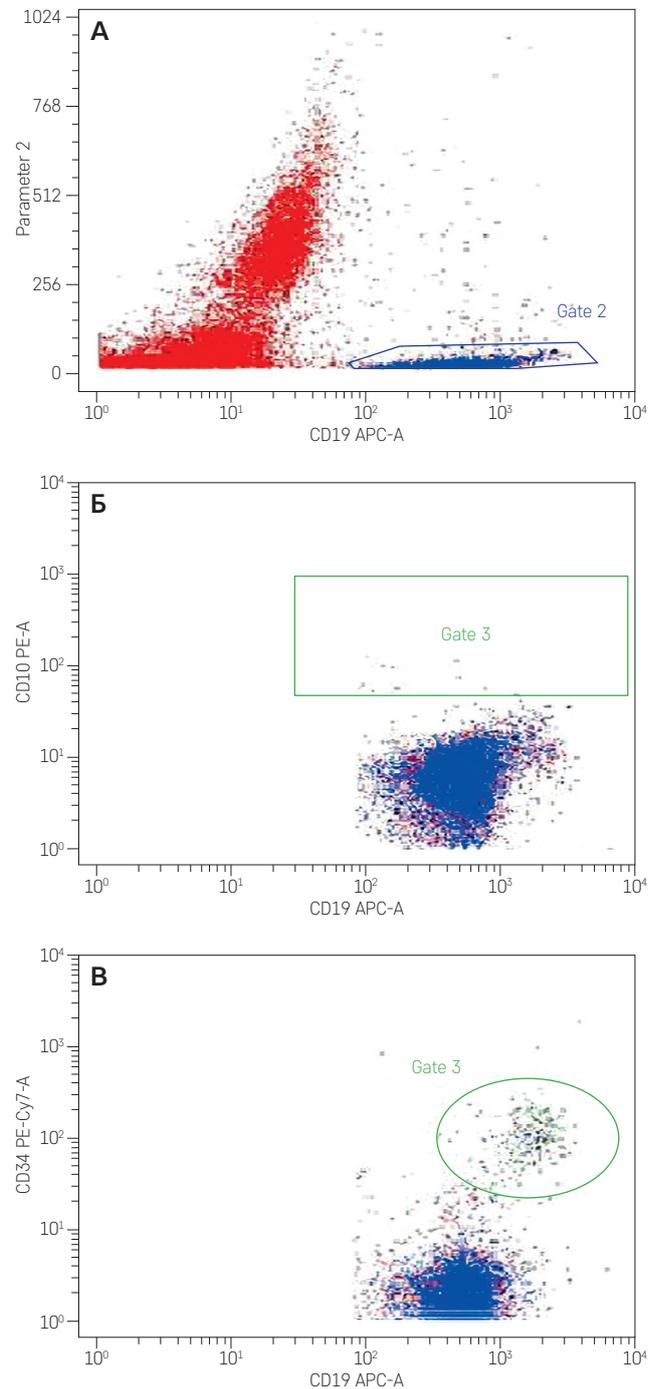
Cytogram A: detection of B-cells based on the expression of CD19 (x-axis) versus the parameters of side scattering (y axis) – gate 2, blue. CD19⁺ B-cells accounted for 18.2%. Cytoqram B: within the B-cells BCP with distinct expression of CD10 (y axis) against CD19 (x axis) in the amount of 3.94% (gate 3, green). Cytoqram B: CD19 (x axis) versus CD34 (y axis). The number of CD34-positive b-cells – 0.13% (gate 3, green).

Рисунок 3

Пример преобладания CD34⁺ В-ЛП на 15-й день; пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ с мономорфной экспрессией CD10 в дебюте

Figure 3

An example of the predominance of CD34-positive BCPs on day 15; pre-pre-B immunosubvariant of ALL with monomorphic expression of CD10 in debut



Цитограмма А: гейт В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось x) против параметров бокового светорассеяния (ось y). Цитограмма Б: в gate CD19⁺ клеток выявляются единичные CD10⁺ В-линейные предшественники (gate 3, зеленый цвет); CD19 (ось x) против CD10 (ось y). Цитограмма В: CD19 (ось x) против CD34 (ось y); четко визуализируется кластер CD34⁺ В-клеток (gate 3, зеленый цвет) в количестве 0,57% от миелокариоцитов.

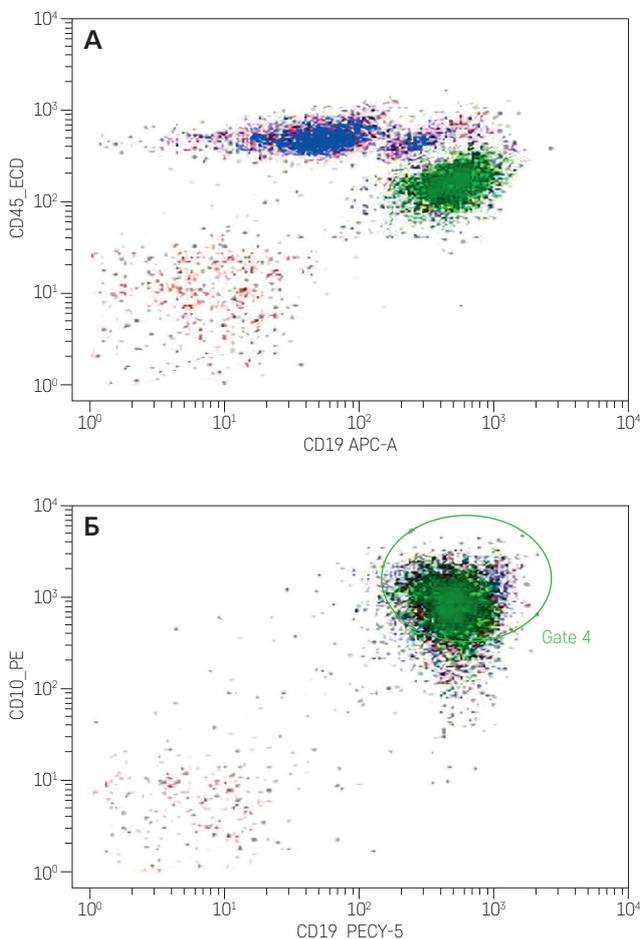
Cytogram A: B-cells gate based on expression of CD19 (x-axis) against side scattering parameters (y axis). Cytoqram B: in gate of CD19⁺ cells single CD10⁺ B-linear precursors are detected (gate 3, green color); CD19 (x axis) versus CD10 (y axis). Cytoqram B: CD19 (x-axis) against CD34 (y axis); a cluster of CD34⁺ B cells is clearly visualized (gate 3, green color) in an amount of 0.57% of myelocaryocytes.

Рисунок 4

Пример совпадения количества В-ЛП, оцененных на основании слабой экспрессии CD45 и экспрессии CD10; пре-пре-В-иммуноподвариант, CD34-, 15-й день

Figure 4

Example of coincidence of the number of BCPs evaluated based on weak expression of CD45 and expression of CD10; pre-pre-B immunosubvariant, CD34-negative, day 15



На цитограмме **А** в координатах CD19 (ось x) против CD45 (ось y) определяется гейт В-ЛП (gate 3, зеленый цвет) на основании отчетливой экспрессии CD19 в сочетании со слабой экспрессией CD45; количество CD19⁺CD45^{low} клеток – 35,1% от миелокариоцитов. Цитограмма **Б**: CD19 (ось x) против CD10 (ось y): те же клетки характеризуются яркой экспрессией CD10.

On the cytogram **A** in the coordinates CD19 (x axis) against CD45 (y axis), there is a gate of BCPs (gate 3, green) detected by a distinct expression of CD19 in combination with weak expression of CD45; number of CD19⁺ CD45^{low} cells – 35.1% of myelocaryocytes. Cytogram **B**: CD19 (x-axis) vs CD10 (y axis): the same cells are characterized by vivid expression of CD10.

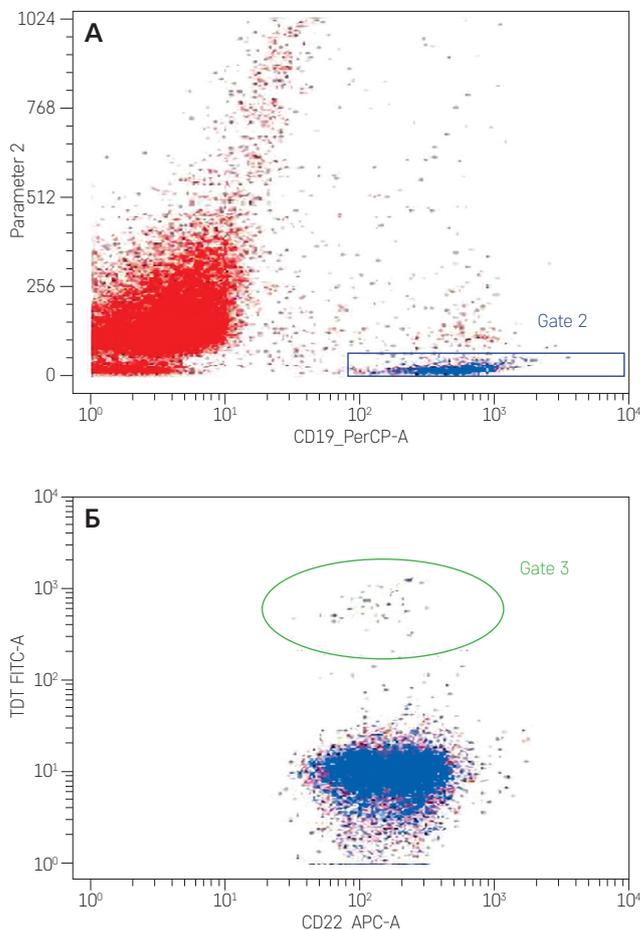
Иммунофенотип клеток МОР на 15-й день терапии. Как показано группой госпиталя *St. Jude*, для оценки МОР в середине терапии индукции ремиссии (15-й день) достаточно определить количество В-ЛП. Данный подход можно реализовать только на этом этапе лечения, так как к завершению индукции ремиссии (29–33-й дни) происходит регенерация КМ, и определение клеток МОР возможно только с точки зрения ЛАИФ – при подсчете коли-

Рисунок 5

Выявление клеток МОР на основании экспрессии TdT и cyCD22 в случае про-В-иммуноподварианта ОЛЛ

Figure 5

Detection of MRD cells based on the expression of nuTdT and cyCD22 in the case of pro-B immunosubvariant ALL



Пример оценки количества клеток МОР на 15-й день на основании экспрессии ядерной TdT и цитоплазматического CD22 в случае про-В-иммуноподварианта ОЛЛ. Цитограмма **А**: gate ЯСК – подсчет В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось x) против параметров бокового светорассеяния; CD19⁺-клетки составили 5,5% от миелокариоцитов. Цитограмме **Б**: gate 3 – 0,03% В-ЛП, выявленных на основании экспрессии ядерной TdT (ось y) против цитоплазматического CD22 (ось x).

An example of estimating the number of MRD cells on day 15 based on expression of nuclear TdT and cytoplasmic CD22 in the case of pro-B-immunosubvariant of ALL. Cytogram **A**: among the nucleated cells, the calculation of B-cells based on expression of CD19 (x axis) against side scattering parameters; D19⁺ cells accounted for 5.5% of myelocaryocytes. On cytogram **B**: gate 3 – 0.03% of BCPs detected based on the expression of nuclear TdT (y axis) versus cytoplasmic CD22 (x axis).

чества В-ЛП (CD19⁺CD10⁺/CD34⁺) с aberrантной экспрессией ряда антигенов. Наиболее часто используемый критерий aberrантности – гиперэкспрессия CD58 при слабой экспрессии CD38.

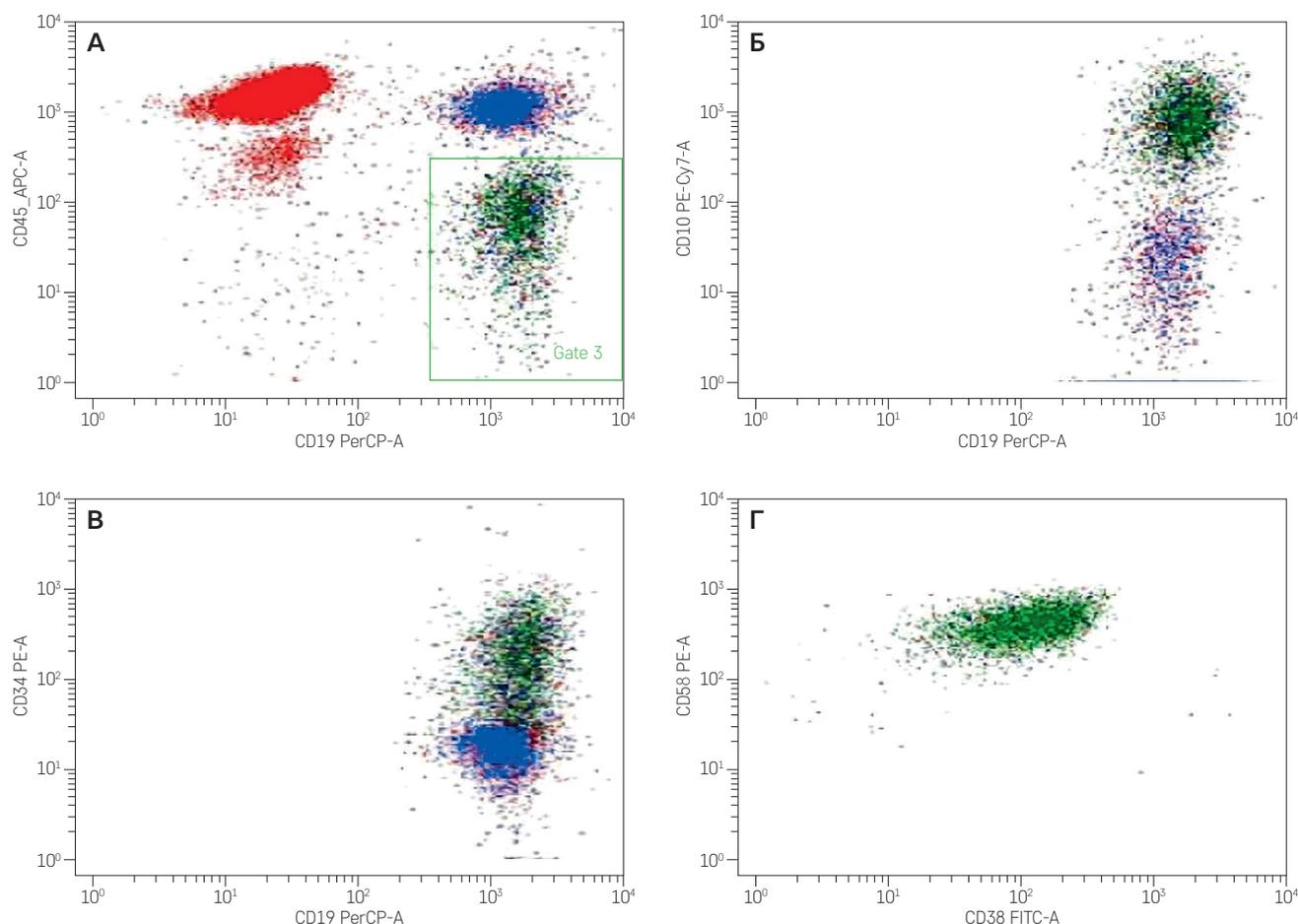
Сопоставление количества В-ЛП и В-лимфоцитов с aberrантной экспрессией антигенов CD58/CD38 в КМ на 15-й день индукционной химиотерапии представляется важным с точки зрения дальнейшей стандартизации ПЦ-протоколов оценки МОР.

Рисунок 6

Оценка количества В-ЛП и особенности их иммунофенотипа на 15-й день индукционной химиотерапии

Figure 6

Estimation of the amount and immunophenotype features of BCPs on the 15th day of induction chemotherapy



На цитограмме **А** в координатах CD19 (ось x) против CD45 (ось y) определяется 16,6% CD19⁺CD45^{low} В-ЛП (gate 3, зеленый цвет). Клетки характеризуются яркой экспрессией CD10 (цитограмма **Б**, CD19 (ось x) против CD10 (ось y), а также отчетливой экспрессией CD34 (цитограмма **В**, CD19 (ось x) против CD34 (ось y). Клетки МОБ демонстрируют aberrantный иммунофенотип CD58⁺CD38^{low} (цитограмма **Г**, CD38 (ось x) против CD58 (ось y).

On the cytogram **A** in the coordinates CD19 (x axis) versus CD45 (y axis), 16.6% of CD19⁺ CD45^{low} BCPs are determined (gate 3, green). Cells are characterized by bright expression of CD10 (cytogram **B**, CD19 (x-axis) versus CD10 (y-axis), as well as a distinct expression of CD34 (cytogram **V**, CD19 (x-axis) versus CD34 (y-axis). MRD cells demonstrate the aberrant immunophenotype CD58⁺ CD38^{low} (cytogram **Г**, CD38 (x-axis) versus CD58 (y-axis).

Оценка экспрессии CD58/CD38 выполнена на 15-й день химиотерапии индукции у 28 больных. Только у 15 (54%) из них все В-ЛП, то есть клетки МОБ, имели aberrantный иммунофенотип CD58⁺/CD38^{low} (рисунок 6). В остальных случаях количество В-ЛП (CD19⁺CD10⁺/CD34⁺CD45^{low}) было больше, чем В-ЛП с иммунофенотипом CD58⁺/CD38^{low}.

Отдельно мы проанализировали количество CD58⁺/CD38^{low/-} В-ЛП в группе больных с отсутствием aberrantности по данному сочетанию антигенов при первичной диагностике (n = 11). Количество CD10⁺ В-клеток совпало с количеством CD58⁺/CD38^{low/-} В-ЛП только в 4 (36,4%) из 11 образцов. В остальных образцах aberrantных В-ЛП выявлено меньшее по сравнению с CD10⁺ В-клетками количество CD58⁺CD38^{low} В-ЛП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значение определения МОБ на 15-й день не вызывает сомнений. Именно уровень остаточных лейкозных бластов является инструментом возможной коррекции лечебных программ в процессе терапии. В случае В-ОЛЛ такая опция предусмотрена для группы больных, достигших МОБ-негативного статуса к середине терапии индукции ремиссии (15-й день). Для них возможно рассмотрение вопроса о снижении доз антрациклинов с учетом остальных факторов прогноза.

Несмотря на определенную клиническую ясность значения оценки МОБ на 15-й день, нерешенными остаются иммунологические аспекты. Так, каждая исследовательская группа создает свои ПЦ-панели

антител и алгоритмы оценки МОБ в рамках разработанных лечебных программ.

Сопоставив два основных подхода к оценке МОБ на 15-й день, мы сделали определенные выводы. С учетом уникальности иммунологической ситуации в КМ, складывающейся к середине индукционной терапии (15–19-й дни), упрощенный (трехцветный) ПЦ-протокол госпиталя *St. Jude* может быть использован только в данном временном интервале. Так, в конце терапии индукции ремиссии (29–33-й дни) начинается восстановление КМ, в связи с чем детекция МОБ возможна только на основании ЛАИФ, которые позволяют отличить нормальные регенерирующие В-ЛП от клеток остаточной опухоли.

При сопоставлении основных маркеров клеток-предшественников (CD10, CD34, CD45) на CD19⁺ В-клетках на 15-й день выявлены определенные закономерности, связанные как с первичным иммунофенотипом опухоли, так и с влиянием проводимого лечения на экспрессию АГ. Согласно данным литературы описано снижение экспрессии CD10 и CD34 в процессе химиотерапии [21, 22]. В нашем исследовании CD10 был наиболее надежным критерием оценки количества В-ЛП на 15-й день в случае пре-пре-В-иммуноподварианта ОЛЛ. Слабая экспрессия CD45 на CD19⁺ В-клетках может быть использована как дополнительный критерий для выявления В-ЛП. Экспрессия антигена CD34 наиболее сильно подвержена модуляциям в процессе химиотерапии; ее снижение описано в работах зарубежных авторов [21, 22]. Наши данные в целом сопоставимы с зарубежными, однако следует обратить внимание на то, что в нашем исследовании 21,6% случаев В-ОЛЛ были CD34-негативны при первичной диагностике; экспрессия данного антигена закономерно отсутствовала на клетках остаточной опухоли и на 15-й день.

Взаимосвязи клеток МОБ с первичным иммунофенотипом опухоли прослеживаются также в отношении ЛАИФ. В случае отсутствия аберрантности по АГ CD58/CD38 появление клеток с аберрантным иммунофенотипом CD58⁺⁺CD38^{low/-} на 15-й день, равное числу CD10⁺/CD34⁺ В-клеток, выявлено только в 36,4% случаев. Таким образом, подход, основанный на определении клеток МОБ на 15-й день как В-ЛП аберрантных по CD58/CD38, нецелесообразен, так

как может привести к занижению количества клеток МОБ. Однако нами набрана относительно небольшая группа оценки экспрессии АГ CD58/CD38 на 15-й день. Необходимо дальнейшее изучение особенностей иммунофенотипа клеток МОБ в отношении аберрантных АГ, а также изучение дополнительных критериев ЛАИФ В-лимфобластов.

Принципиально важным отличием двух сопоставленных нами протоколов был подход к анализу КМ. Так, протокол госпиталя *St. Jude* предусматривает анализ в МНК, а протокол группы BFM – в ЯСК. Важно, что включение в ПЦ-панель нуклеотропных красителей семейства *Syto* позволяет избежать возможного разбавления образца КМ дебрисом (разрушенными элементами), появляющимся под влиянием проводимой химиотерапии [18]. В нашем исследовании показано, что пересчет на МНК – более жесткий критерий детекции МОБ и, как следствие, клинической риск-стратификации.

ВЫВОДЫ

На основании опыта международных многоцентровых исследований не вызывает сомнений тот факт, что диагностика МОБ на 15-й день терапии В-ОЛЛ должна быть основана на выявлении В-ЛП. Оценка аберрантности В-ЛП по АГ CD58/CD38, как и альтернативных ЛАИФ, в середине индукции ремиссии носит в основном исследовательский характер и нуждается в дальнейшем изучении. А для рутинной практики, отвечающей основной клинической задаче – точной риск-стратификации больных, достаточно комбинации CD19/CD10/CD34/CD45 в сочетании с нуклеотропным красителем семейства *Syto* в случае CD10⁺ В-ОЛЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-09115.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Chernysheva O.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9630-5591>

Kupryshina N.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8509-0954>

Popa A.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5318-8033>

Tupitsin N.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Литература

- Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G., Dworzak M.N., Ratei R., VSilvestri D., et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukaemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009; 27 (31): 5168–74.
- Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23 (5): 1083–98.

3. Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Фадеева М.С. и соавт. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы Российско-Белорусской кооперативной группы. Онкогематология 2016; 11 (4): 64–73.
4. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G., Hancock M.L., Razzouk B.I., Ribeiro R.C., et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100 (1): 52–8.
5. Ratei R., Basso G., Dworzak M., Gaipa G., Veltroni M., Rhein P., et al. 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. *Leukemia* 2009; 23 (3): 528–34.
6. Gaynon P.S., Desai A.A., Bostrom B.C., Hutchinson R.J., Lange B.J., Nachman J.B., et al. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer* 1997; 80 (9): 1717–26.
7. Hitchcock-Bryan S., Gelber R.D., Cassidy J.R. The impact of induction anthracycline on long-term failure-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Medical and Pediatric Oncology* 1986; 14 (4): 211–5.
8. Meadows A.T., Robison L.L., Neglia J.P., Sather H., Hammond D., Pui C.P., et al. Potential long-term toxic effects in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *New English Journal of Medicine* 1989; 321 (26): 1830–1.
9. Ochs J.J. Neurotoxicity due to central nervous system therapy for childhood leukemia. *American Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1989; 11 (1): 93–105.
10. Packer R.J., Meadows A.T., Rorke L.B., Goldwein J.L., D'Angio G. Long-term sequelae of cancer treatment on the central nervous system in childhood. *Medical and Pediatric Oncology* 1987; 15 (5): 241–53.
11. Pui C.H., Behm F.G., Raimondi S.C., Dodge R.K., George S.L., Rivera G.K., et al. Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *New English Journal of Medicine* 1989; 321 (3): 136–42.
12. Rimm I.J., Li F.C., Tarbell N.J., Winston K.R., Sallan S.E. Brain tumors after cranial irradiation for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1987; 59 (8): 1506–8.
13. Schrappe M. M., Reiter A., Ludwig W.-D. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood* 2000; 95 (11): 331020.
14. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Brenem J.M., Cherlow N.J., Grossman J.H., Kersey J.C., et al. Cyto-reduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia: the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996; 14 (2): 389–98.
15. Igarashi H., Medina K.L., Yokota T., Rossi M.I., Sakaguchi N., Comp P.C., et al. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids. *Int Immunology* 2005; 17 (5): 501–11.
16. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P. A simplified flow cytometry assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006; 108 (1): 97–102.
17. Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Серебрякова И.Н., Тупицын Н.Н. К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии. *Иммунология гемопоза* 2011; 1: 35–54.
18. Безнос О.А., Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Оптимизация проточно-цитометрических протоколов детекции минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах. *Медицинский алфавит* 2018; 1 (5) 342: 36–9.
19. Van Dongen J.J., van der Velden V.H., Bruggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125 (26): 3996–4009.
20. Безнос А., Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Шервашидзе М.А., Серебрякова И.Н., Баранова О.Ю. и соавт. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2017; 10 (2): 158–68.
21. 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; 18: 703–8.
22. Gaipa G., Basso G., Aliprandi S., Migliavacca M., Vallinoto C., Maglia O., et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD 10 and CD34 in non-apoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry Part B* 2008; 74B: 150–5.