

Проблемы иммунофенотипирования в России: опыт работы референсного центра кооперированной клинической группы «Москва–Берлин»

А.М.Попов^{1,2}, С.Н.Лагойко³, Ю.В.Румянцева^{3,4}, С.А.Луговская⁵,
Л.Г.Фечина^{1,2}, С.А.Румянцев^{3,4,6}, А.И.Карачунский^{3,4}

¹Областная детская клиническая больница №1, Екатеринбург, Российская Федерация;

²Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Российская Федерация;

³Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

⁵Российская медицинская академия последиplomного образования Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

⁶Московский физико-технический институт (государственный университет) Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация

Определение иммунофенотипа опухолевых клеток при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) методом проточной цитометрии – один из важнейших диагностических методов, определяющих правильный выбор терапии. В РФ до настоящего времени отсутствуют какие-либо стандарты проведения иммунофенотипирования, как на национальном уровне, так и на уровне отдельных исследовательских групп. В рамках исследования ALL-MB 2015 было решено создать референсный центр по иммунофенотипированию, основной задачей которого является устранение недостатков цитометрической диагностики в клиниках, включенных в исследование. По результатам работы референсного центра было выявлено большое количество проблем, связанных с неправильной калибровкой проточных цитометров, неправильным выбором моноклональных антител и подготовкой проб, а также некорректным анализом и интерпретацией цитометрических данных. Был сделан вывод о существовании очень серьезных проблем в иммунофенотипировании в РФ и полном отсутствии стандартизации данного метода исследования. Основным возможным решением данной проблемы является потенциальная централизация проведения данного исследования в нескольких крупных лабораториях, специалисты которых обладают достаточным опытом.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, иммунофенотипирование, референсный центр, стандартизация

Problems of flow cytometry immunophenotyping in Russia: Experience gained by the Reference Center of Moscow–Berlin Cooperative Clinical Group

A.M.Popov^{1,2}, S.N.Lagoiko³, Yu.V.Rumyantseva^{3,4}, S.A.Lugovskaya⁵,
L.G.Fechina^{1,2}, S.A.Rumyantsev^{3,4,6}, A.I.Karachunsky^{3,4}

¹Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, Russian Federation;

²Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation;

³Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, Russian Federation;

⁴Russian National Research Medical University named after N.I.Pirogov, Moscow, Russian Federation;

⁵Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation;

⁶Moscow Physical Technological Institute, Moscow, Russian Federation

Identification of the tumor cell immunophenotype in acute lymphoblastic leukemia (ALL) by flow cytometry is one of the priority diagnostic methods, determining the correct choice of therapy. The flow cytometry immunophenotyping standards are still not determined in Russian Federation – at the national level or at the levels of individual study groups. The groups involved in the ALL-MB-2015 study have created a reference center intended for repair of the flaws of flow cytometry immunophenotyping in the clinics involved in the study. The work of the reference center has made it possible to identify numerous problems with flow cytometer calibration, wrong choice of monoclonal antibodies and preparation of samples, incorrect analysis and interpretation of flow cytometry data. These results demonstrate very serious problems in flow cytometry immunophenotyping in Russia and complete absence of standards for this method. The basic solution for this problem is potential centralization of flow cytometry immunophenotyping at several major laboratories with experienced staff.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry immunophenotyping, reference center, standardization

Определение иммунофенотипа опухолевых клеток при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) методом проточной цитометрии уже на протяжении многих лет является одним из важнейших диагностических методов, определяющих правильный выбор терапии. В большинстве исследовательских групп по лечению ОЛЛ иммунофенотипирование для всех пациентов централизовано проводится наиболее опытными специалистами в нескольких крупных референсных лабораториях, оснащенных новейшими моделями проточных цитометров. При этом все референсные центры выделяют иммунологические подгруппы ОЛЛ в соответствие с современными классификациями, наиболее распространенными из которых являются классификации Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias – EGIL) [1] и ВОЗ [2]. В то же время в РФ до настоящего времени отсутствуют какие-либо стандарты проведения иммунофенотипирования, как на национальном уровне, так и на уровне отдельных исследовательских групп.

В исследовании ALL-MB-2008 впервые в России определение иммунофенотипа опухолевых клеток стало обязательным для всех участвующих клиник. В результате проточная цитометрия была выполнена примерно у 99% включенных в исследование пациентов, однако качество диагностики в данном случае никак не оценивалось. Поскольку в начинающемся новом исследовании ALL-MB-2015 иммунофенотипированию отводится важная роль, а от качества цитометрической диагностики напрямую будет зависеть выбор терапии, было принято решение о создании на базе Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (Москва) и Областной детской клинической больницы №1 (Екатеринбург) референсного центра по иммунофенотипированию. Основной задачей референсного центра является устранение недостатков цитометрической диагностики в клиниках, включенных в исследование. На первом этапе работы проводили анализ первичных данных с цитометров и заключений по результатам иммунофенотипирования, а при обнаружении недостатков выясняли их причины. Даже за несколько месяцев работы референсного центра было выявлено большое количество проблем, которые можно разделить на 3 группы:

- неправильная калибровка проточного цитометра;
- неправильный выбор моноклональных антител и подготовка проб;
- некорректные анализ и интерпретация цитометрических данных.

Калибровка проточных цитометров

В результате сотрудничества с фирмами-производителями проточных цитометров было выявлено, что в подавляющем

большинстве лабораторий не выполняются стандартные калибровочные процедуры, в результате чего зачастую используются настройки приборов, заданные сервисными инженерами при установке приборов, иногда несколько лет назад. Специальный калибровочный материал для настройки прибора под конкретные комбинации антител и флуорохромов зачастую не приобретается вовсе. В итоге изменения в работе цитометра сказываются на качестве получаемой с прибора информации и, следовательно, на правильности результатов иммунофенотипирования. При этом стабильность работы цитометра никак не оценивается, хотя все производители приборов выпускают наборы для оценки правильности работы проточных цитометров. Другой проблемой настройки цитометра является «привычка» ряда лабораторий к постоянному изменению цифровой компенсации флуоресценции – ключевого параметра, обеспечивающего четкое разделение сигналов флуорохромов с частично перекрывающимися спектрами. Значение компенсации для каждой пары флуорохромов должно настраиваться с помощью специального калибровочного материала для конкретных комбинаций антител и не изменяться вручную от случая к случаю. В то же время в ряде лабораторий практикуется подстраивание компенсации в каждом конкретном случае с учетом субъективных ощущений оператора. Это привносит в настройку прибора совершенно недопустимый субъективный компонент и ставит под сомнение стабильность получения адекватного результата цитометрического исследования.

Выбор моноклональных антител и подготовка проб

Используемые в различных лабораториях комбинации антител зачастую составляются без какой-либо логики, исключительно по наличию в каталогах фирм-производителей. При этом далеко не всегда используются все возможности многоцветного анализа на современных проточных цитометрах. Так, имея в распоряжении 5-, 6- и даже 8-цветные приборы, многие лаборатории ограничиваются 2- или 3-цветными комбинациями антител. Зачастую в некоторых комбинациях может отсутствовать необходимый для выделения бластных клеток маркер CD45, что в современных условиях иммунофенотипирования выглядит явным анахронизмом и не позволяет правильно выделять опухолевые клетки. Кроме того, выбор флуорохрома для того или иного антитела зачастую проводится без какого-либо учета особенностей экспрессии маркера и диагностических задач, которые позволяют решить использование данного антитела. Однако самой большой выявленной проблемой оказалось то, что в панель антител не всегда включаются антитела, необходимые для диагностики конкретных иммунологических вариантов ОЛЛ [1] (например, антитела к тяжелым и легким цепям иммуноглобулинов), а также для дифференцировки ОЛЛ с острым миелоидным лейкозом и острым лейкозом со смешанным фенотипом [2] (например, антитела к лизоциму или к CD11c).

В большинстве лабораторий были выявлены определенные отступления в методике подготовки проб. Чаще всего это касалось несоблюдения последовательности этапов и их продолжительности. Кроме того, зачастую к образцу антитела добавляются в значительно меньших количествах, чем рекомендовано фирмой-производителем. Обычно это основано не на результатах титрования реагентов с целью уточнения оптималь-

Для корреспонденции:

Попов Александр Михайлович, кандидат медицинских наук, врач клиничко-лабораторной диагностики лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов Областной детской клинической больницы №1, ведущий научный сотрудник Института медицинских клеточных технологий

Адрес: 620149, Екатеринбург, ул. С.Дерябиной, 32

Телефон: (343) 216-2514

E-mail: uralcytometry@gmail.com

Статья поступила 03.02.2015 г., принята к печати 20.03.2015 г.

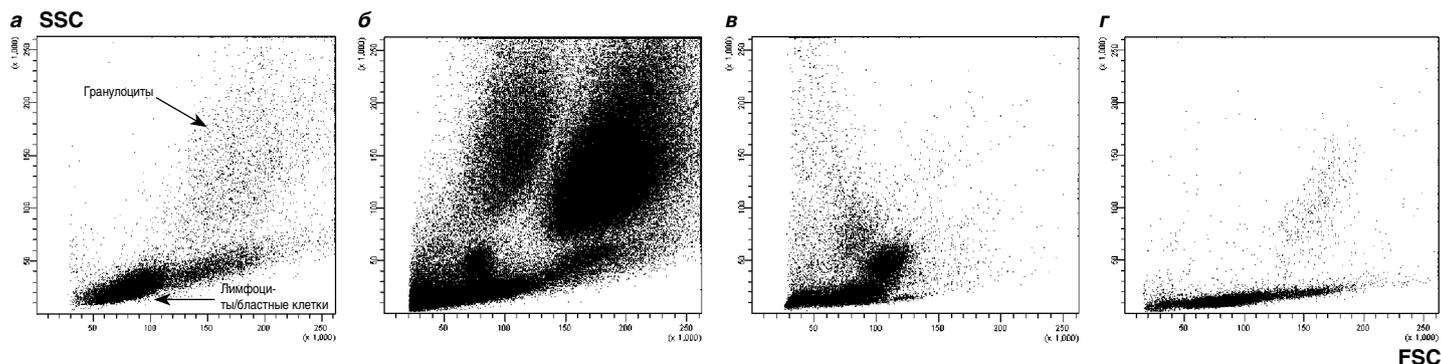


Рис. 1. Результаты иммунофенотипирования клеток костного мозга пациентов с ОЛЛ на стандартных точечных графиках, косвенно отражающих соотношение размера (FSC) и степени развития внутриклеточных структур (SSC): а – хорошее качество материала и подготовки пробы; б – излишне «мягкий» лизис эритроцитов и отсутствие фиксации клеток; в – низкое качество материала и/или подготовки пробы; г – неадекватные настройки проточного цитометра.

ной концентрации, а на банальном желании сэкономить. По этой же причине иногда используются нестандартные относительно дешевые реагенты для лизиса эритроцитов и различные буферные растворы. Все это приводит к большому количеству обломков разрушенных клеток, регистрируемых проточным цитометром (рис. 1), что существенно усложняет анализ точечных графиков, а также к плохому разделению позитивного и негативного сигналов и нарушению стандартного распределения клеток на графиках (рис. 2). В результате в некоторых случаях даже очень опытным специалистам по иммунофенотипированию не представляется возможным провести адекватный анализ цитометрических данных, полученных с явными нарушениями технологии подготовки проб.

Анализ данных и интерпретация результатов цитометрии

Проблемы анализа данных чаще всего сводятся к неправильной установке порога аутофлуоресценции и разделению позитивных и негативных клеток. При этом лишь в некоторых лабораториях в качестве внутренних контролей используют имеющиеся в образце нормальные клетки. Гораздо чаще применяются либо не всегда адекватные изотипические контроли, либо вообще граница негативных клеток выставляется без всяких контролей, исключительно на основании субъективного восприятия шкалы интенсивности флуоресценции. В итоге далеко не всегда правильно принимается решение о том, экспрессируют ли опухолевые клетки тот или иной маркер.

Однако даже если данные проанализированы правильно, зачастую возникают сложности с интерпретацией полученных результатов. При этом опухолевые клетки не только бывают неправильно классифицированы, но даже не всегда правильно определяется их опухолевая природа.

В 2014 г. совместно с кафедрой клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России (Москва, проф. С.А.Луговская) было проведено так называемое «круговое исследование». Специалистам из 19 цитометрических лабораторий были предоставлены точечные графики по 5 пациентам (3 случая В-линейного ОЛЛ, 1 случай подозрения на рецидив В-линейного ОЛЛ и 1 случай Т-линейного ОЛЛ) с предложением проанализировать данные и сформулировать заключение. Задача была заведомо упрощена, так как бластные клетки были уже выделены, а границы аутофлуо-

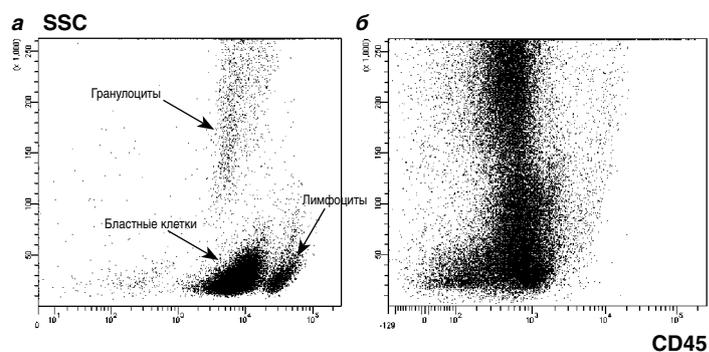


Рис. 2. Результаты иммунофенотипирования клеток костного мозга пациентов с ОЛЛ на стандартных точечных графиках, отражающих экспрессию общего лейкоцитарного антигена CD45 и степень развития внутриклеточных структур (SSC): а – хорошее качество окрашивания; б – недостаточное окрашивание, вызванное неадекватным соотношением количества клеток и антител, приводящее к отсутствию какого-либо разделения популяций клеток по интенсивности экспрессии CD45.

ресценции расставлены. Все лаборатории были разделены на две группы. В 1-ю группу были включены 6 лабораторий, сотрудники которых имели наибольший опыт проведения иммунофенотипирования, во 2-ю группу – остальные 13 лабораторий. Анализ присланных результатов показал, что сотрудники 1/3 лабораторий 1-й группы и сотрудники более половины лабораторий 2-й группы не смогли правильно отличить опухолевые клетки от нормальных клеток-предшественников при подозрении на рецидив В-линейного ОЛЛ. Кроме того, если в 3 случаях В-линейного ОЛЛ существенных расхождений в заключениях не было, то в случае Т-линейного ОЛЛ наблюдался очень большой разброс в определении иммунологического варианта ОЛЛ. Только сотрудники двух лабораторий правильно определили вариант ОЛЛ по классификации EGIL [1]. Следует отметить, что большинство участвовавших в исследовании лабораторий обслуживает именно детские онкогематологические отделения.

Дальнейший анализ присылаемых заключений по результатам иммунофенотипирования показал, что в большинстве лабораторий весьма вольно трактуются критерии иммунологических вариантов ОЛЛ, принятые EGIL [1]. При определении варианта учитывается экспрессия маркеров, которые либо просто не упоминаются в классификации (например, CD20), либо упоминаются, но именно в том контексте, что их

Использованные моноклональные антитела:

CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD10, CD13, CD14, CD16+56, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD38, CD45, CD56, CD58, CD61, CD64, GD117, CD200, HLA-DR, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$.

Описание: В доставленном материале гейт бластных клеток, негативных по CD45, составляет 85% от всех просчитанных событий. Иммунофенотип бластных клеток: CD10⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD58⁺, CD9⁺ (высокая плотность), CD200⁺, HLA-DR⁺, CD45⁻.

Экспрессия внутриклеточных маркеров, CD34 не определена из-за отсутствия реагентов.

Заключение: Данный иммунофенотип в наибольшей степени соответствует В-лимфобластному лейкозу (BIII) с экспрессией CD13.

Рис. 3. Образец заключения по результатам иммунофенотипирования. Несмотря на не проводившееся определение внутриклеточной экспрессии тяжелых цепей иммуноглобулинов, определен VIII-вариант ОЛЛ.

наличие не должно влиять на определение варианта ОЛЛ (например, CD34 или TdT) [1]. Были случаи игнорирования того, что экспрессия CD1a даже на части клеток определяет TIII-вариант ОЛЛ (кортикальный) вне зависимости от всех других маркеров, и при экспрессии опухолевыми клетками более зрелых Т-линейных антигенов (CD3 или Т-клеточных рецепторов) [1] выставлялся более зрелый TIV-вариант ОЛЛ. Кроме того, по неизвестной причине не во всех лабораториях проводится определение поверхностных и внутриклеточных тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. При этом не только невозможно исключить зрелоклеточный вариант, чаще всего соответствующий лимфоме Беркитта, но и невозможно вообще с уверенностью определить ни один из иммунологических вариантов по классификации EGIL. Тем не менее встречались заключения типа «VIII-вариант ОЛЛ» в тех случаях, когда никакого определения иммуноглобулинов не проводили (рис. 3), хотя единственным критерием для диагностики данного варианта ОЛЛ является наличие иммуноглобулина в цитоплазме при отсутствии его на мембране [1].

Не существует на сегодняшний день и единого формата заключения по результатам иммунофенотипирования. Каждая лаборатория пишет заключение по-своему. При этом в заключение могут вноситься данные других методов исследования, что совершенно недопустимо, а также делаться всевозможные спекулятивные предположения.

В настоящее время иммунофенотипирование для нужд детских онкогематологических отделений в России выполняется во многих лабораториях. Наличие такое большого количества лабораторий, проводящих иммунофенотипирование, имеет два негативных следствия. Во-первых, крайне затруднены попытки даже минимальной стандартизации исследования, потому что большому числу специалистов всегда крайне трудно договориться между собой и выработать компромиссный итоговый протокол. Во-вторых, в большинство цитометрических лабораторий поступает крайне малое количество подлежащих исследованию образцов. Следовательно, специалистам таких лабораторий очень сложно набрать необходимый для проведения качественного иммунофенотипирования опыт.

Таким образом, по результатам работы референсного центра был сделан вывод о существовании очень серьезных проблем в иммунофенотипировании в России и полном отсутствии стандартизации данного метода исследования. Лишь очень немногие лаборатории продемонстрировали

хорошее качество работы. Поэтому, учитывая исключительную важность адекватного иммунофенотипирования для выбора правильной стратегии терапии, очевидна необходимость централизации проведения данного исследования в нескольких лабораториях, специалисты которых обладают достаточным опытом. Такая практика, принятая в большинстве крупных исследовательских групп, позволяет руководителям исследования лучше контролировать проведение диагностики и гарантирует адекватные результаты иммунофенотипирования для всех пациентов.

Литература/References

1. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, 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.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber D, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.

Информация о соавторах:

Лагойко Светлана Николаевна, научный сотрудник отдела оптимизации лечения онкологических заболеваний у детей Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5529
E-mail: lagoiko80@mail.ru

Румянцева Юлия Васильевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом оптимизации лечения онкологических заболеваний у детей Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5513
E-mail: j.roumiantseva@mail.ru

Луговская Светлана Алексеевна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России
Адрес: 125284, 2-й Боткинский проезд, 5, Городская клиническая больница им. С.П.Боткина Департамента здравоохранения Москвы, корпус 17, 3-й этаж
Телефон: (495) 945-8222
E-mail: salugovskaya@gmail.com

Фечина Лариса Геннадьевна, кандидат медицинских наук, руководитель Центра детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы №1, заведующая лабораторией клеточной терапии онкогематологических заболеваний Института медицинских клеточных технологий
Адрес: 620149, Екатеринбург, ул. С.Дерябиной, 32
Телефон/Факс: (343) 216-6877
E-mail: childrens_oncology@mail.ru

Румянцев Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова Минздрава России, заведующий кафедрой трансляционной и регенеративной медицины Московского физико-технического института (государственного университета) Минобрнауки России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5576
E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

Карачунский Александр Исаакович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, директор Института онкологии, радиологии и ядерной медицины, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, 5507
E-mail: aikarat@mail.ru