

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

29.12.2011 г.

Регистрационный № 139-1110

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СТАДИИ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ
ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ МЕТОДОМ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ
ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии
и гематологии»

АВТОРЫ: Л.В. Мовчан, канд. биол. наук, М.В.Белевцев, канд. биол. наук,
В.П. Савицкий, канд. биол. наук, Т.В.Шман,
д-р мед. наук, проф. О.В. Алейникова

Минск 2010

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острые лейкозы (ОЛ) представляют собой гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы крови — гемобластозов, которые характеризуются первичным поражением костного мозга морфологически незрелыми кроветворными (бластными) клетками с вытеснением ими нормальных элементов гемопоэза и инфильтрацией ими различных тканей и органов. Все острые лейкозы клональны, т.е. возникают из одной мутировавшей кроветворной клетки, которая может относиться как к очень ранним, так и к коммитированным в направлении различных линий кроветворения клеткам-предшественницам. Принадлежность бластных клеток к той или иной линии кроветворения, степень их дифференцировки обуславливают клиническое течение острого лейкоза, выбор терапии, эффективность проводимого лечения и, соответственно, прогноз заболевания.

Острые лейкозы занимают первое место среди онкогематологических заболеваний у детей, и 80% из них приходятся на острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ). По статистическим данным регистра острых лейкозов Республиканского научно-практического центра детской онкологии и гематологии (РНПЦДОГ) Министерства здравоохранения, частота ОЛ составляет 41,6 на 1 млн детского населения.

В настоящее время в лечении острых лейкозов достигнуты значительные успехи. Благодаря использованию современных протоколов лечения общая 5-летняя выживаемость повысилась с 20% до 80–86%. Высокий уровень излечиваемости ОЛ у детей предполагает, безусловно, высочайший уровень диагностики с привлечением новейших диагностических средств и методов исследования.

Иммунофенотипирование бластных клеток является определяющим моментом в диагностике острых лейкозов, их классификации в соответствии с линейной принадлежностью и стадией дифференцировки лейкоэмических клеток, а так же выделении прогностически важных подтипов и выборе методов рациональной терапии.

Основные методы, используемые для диагностики ОЛ

1. Морфологическое исследование.
2. Цитохимические методы исследования.
3. Иммунофенотипирование.
4. Цитогенетические методы исследования.
5. Молекулярно-биологические методы исследования.

Иммунофенотипирование лейкозных клеток методом проточной цитофлуориметрии

В основе современной иммунофенотипической диагностики ОЛЛ лежит представление об этапности процесса созревания гемопоэтических клеток-предшественников, из которых может развиваться лейкозный клон. Выявление

линейно-специфичных и стадийно-специфичных маркеров с помощью моноклональных антител (МКА) позволяет дать иммунофенотипическую характеристику бластных клеток, обычно более точную по сравнению с методами морфологического и цитохимического анализа.

Классификационные схемы острых лейкозов, построенные с учетом данных иммунофенотипирования опухолевых клеток, отражают существующие стадии дифференцировки их нормальных аналогов, начиная с костно-мозговых клеток-предшественников. Иммунологическая классификация Европейской группы по иммунологическому изучению лейкозов (EGIL) предполагает использование стандартизированной панели МКА, что позволяет определить происхождение бластных клеток более чем в 98% случаев ОЛ.

линейно-специфические маркеры:

- cCD3, MPO, cCD79a, CD7, CD2, CD10, CD19, CD22 (п или ц), pIg, CD13, CD33.

стадийно-специфичных маркеров:

- DR, CD1a, CD4, CD5, CD8, CD3 (п), IgM (ц), CD14, CD117, CD65, CD41 или CD61, CD238 (гликофорин А) или CD36.

дополнительные маркеры:

- CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD35/36, CD58, CD64, CD68 (ц), CD71, CD86, CD99, CD123, TCR α/β или γ/δ , CD56, CD45, CD34, CD68, TdT.

Примечание. С — цитоплазматический антиген; МРО — миелопероксидаза, TdT — терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

Согласно классификации EGIL-95 выделяют 4 основных группы острых лейкозов:

1. Острые лимфобластные лейкозы.
2. Острые миелобластные лейкозы.
3. Бифенотипические острые лейкозы (БОЛ).
4. Недифференцированные острые лейкозы.

В группе острых лимфобластных лейкозов выделяют 4 подтипа В-линейных и 5 подтипов Т-линейных лимфолейкозов, различающихся по степени дифференцировки лейкозных клеток, а также ОЛЛ с коэкспрессией миеломаркеров. В таб. 1 представлены критерии иммунофенотипической диагностики ОЛЛ.

Таблица 1

Иммунологическая классификация ОЛЛ (EGIL-95)

В-линейные ОЛЛ	CD19+ и/или CD79a+и/или CD22+(позитивны не менее 2 из 3 маркеров), большинство случаев TdT+ (кроме зрелого В-ОЛЛ), HLA-DR+
----------------	--

Про-В ОЛЛ	CD19+ и/или CD79a+и/или CD22+(нет экспрессии других дифференцировочных В-клеточных антигенов)
Common В-ОЛЛ	CD10+
Пре-В ОЛЛ	Цитоплазматический IgM+
Зрелый В-ОЛЛ	Поверхностный IgM+, цитоплазматические и поверхностные κ- или λ- легкие цепи Ig+
Т-линейные ОЛЛ	CD3+ (цитоплазматический или мембранный), большинство случаев TdT+, HLA-DR-, CD34-
Про-Т ОЛЛ	CD7+
Пре-Т ОЛЛ	CD2+ и/или CD5+ и/или CD8+
Кортикальный Т-ОЛЛ	CD1a+
Зрелый Т-ОЛЛ	Мембранный CD3+, CD1a+/-
α/β	Анти-TCR α/β+
γ/δ	Анти-TCR γ/δ+
ОЛЛ с экспрессией миелоидных антигенов (миело+ ОЛЛ)	

Иммунофенотипирование при острых миелобластных лейкозах (ОМЛ) не несет столь существенной диагностической нагрузки. В табл. 2 представлены иммунофенотипические характеристики клеток при различных морфологических вариантах ОМЛ. Для ОМЛ (за исключением М0, М7) иммунофенотипирование не является принципиальным методом, оно лишь подтверждает диагноз ОЛ, однако иммунофенотипическая оценка лейкоэмических клеток при ОМЛ необходима для дальнейшего мониторинга остаточных опухолевых клеток в ходе терапии. Лишь в случае М0 и М7 использование иммунофенотипирования позволяет достоверно установить диагноз.

Таблица 2

Иммунологические маркеры, характерные для разных подтипов ОМЛ

Подтип ОМЛ	экспрессия антигенов кластеров дифференцировки								
	CD11	CD13	CD14	CD15	CD33	CD34	HLA-DR	CD41	CD42b
М0	-	+	-	-	+	+	-	-	-
М1	-	+	-	-	+	+	+	-	-
М2	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-
М3	+	+	-	+/-	+	-	-	-	-
М4	+	+	+	+	+	-	+	-	-
М5	+/-	+	+	+	+	-	+	-	-
М6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
М7	-	-	-	-	-	-	-	+	+

С внедрением в практику метода иммунофенотипирования и созданием большого количества моноклональных антител появилось понятие бифенотипического и билинейного острого лейкоза. Чаще всего речь идет о тех случаях, когда лейкоэмические клетки несут на себе маркеры двух или более линий кроветворения (миелоидной и лимфоидной, например). Диагноз бифенотипического острого лейкоза устанавливается в тех ситуациях, когда

цитохимически и морфологически не представляется возможным определить принадлежность клеток к той или иной линии кроветворения, а при иммунофенотипировании на мембране этих клеток экспрессируются принципиально значимые маркеры (оцениваемые по специальной шкале в баллах) как лимфоидные, так и миелоидные. Если сочетание маркеров, принадлежащих к противоположным линиям кроветворения, дает в сумме 2 и более баллов для каждой из присутствующих линий, то только в этих случаях острый лейкоз определяется как бифенотипический (табл. 3).

Таблица 3

Диагностика бифенотипического острого лейкоза

Направленность дифференцировки клеток	0,5 балла	1 балл	2 балла
Миелоидная	CD11b, CD11, CD15	CD33, CD13, CD14	MPO
B-лимфоидная	TdT, реарранжировка генов тяжелой цепи Ig	CD10, CD19, CD24	cCD22, ц-т цепь
T-лимфоидная	TdT, CD7	CD2, CD5, реарранжировка генов T-клеточных рецепторов	cCD3

Примечание. C — цитоплазматический антиген; MPO — миелопероксидаза, TdT — терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза.

Реже наблюдаются случаи, когда сосуществуют две популяции бластных клеток, иммунофенотипически принадлежащих к различным линиям кроветворения. Этот вариант острого лейкоза называют билинейным.

Таким образом иммунофенотипирование выполняется с использованием панели МАТ (фирмы «Becton Dickinson» и «Beckman Coulter»), выявляющих поверхностные маркеры (CD45, CD14, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD10, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD117, CD15, CD11b, sIgM) и внутриклеточные (cyIgM, MPO, TdT, CD79a, cyCD3). Результаты учитывают методом проточной цитометрии (на аппарате Cytomics FC500 фирмы «Beckman Coulter»), регистрируя долю позитивных клеток по каждому маркеру. Позитивность определяется по отношению к пробам с негативным изотипическим контролем. Положительными считают пробы, в которых МКА прореагировали не менее чем с 20% бластных клеток. Для наиболее специфических цитоплазматических маркеров, таких как cyIgM, cyCD3, CD79a и MPO, EGIL (Европейская группа по иммунологической классификации лейкозов) рекомендует снижать лимит позитивности до 10%. Проточная цитометрия позволяет определить как процент клеток, экспрессирующих выявляемый маркер, так и среднюю интенсивность его флуоресценции (СИФ), которая выражается в условных единицах. Показатель СИФ отражает количество экспрессируемых антигенных молекул клетки. При формулировке заключения по результатам иммунофенотипирования острого лейкоза используют классификацию EGIL-95.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

Иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкомиических клеток методом многоцветной проточной цитофлуориметрии:

1. Проточный цитофлуориметр с набором прикладных программ.
2. Центрифуга.
3. Моноклональные антитела (CD45, CD14, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD10, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD117, CD15, CD11b, IgM, MPO, TdT, CD79a).
4. Фосфатно-солевой буфер (PBS).
5. Раствор для лизиса эритроцитов.
6. Раствор параформальдегида 1%.
7. Histopaque (жидкость для разделения клеток в градиенте плотности)

Описание технологии метода определения поверхностных маркеров лейкозных клеток

В качестве материала для исследования используется пунктат костного мозга или периферическая кровь. Исследуемый материал доставляют в специальных пробирках, в которые предварительно вносится антикоагулянт (3,8% цитрат натрия или ЭДТА натрия). Кровь или костный мозг набирают в объеме от 2,5 до 5 мл в зависимости от клеточности. Методика определения поверхностных антигенов выполняется с предварительным выделением мононуклеаров. Для этого вначале разводим костный мозг в 2 раза раствором фосфатного буфера (Phosphate buffered saline=PBS); периферическую кровь разводить не следует. Для выделения мононуклеаров в пробирку наливают 2,5 мл Histopaque (жидкость для разделения клеток в градиенте плотности). Пастеровской пипеткой сверху наслаивают 5 мл разведенного костного мозга или цельной периферической крови. Центрифугируют 30 мин. при 1500 об./мин. Пастеровской пипеткой собирают «кольцо» мононуклеаров в интерфазе, переносят в сухую пробирку, остаток выбрасывают. Добавляют 5 мл PBS, центрифугируют 3 мин при 2200 об./мин. Надосадок сливают, осадок встряхивают. Взвесь клеток заливают лизирующим раствором для лизиса эритроцитов, до 5–8 мл, оставляют при комнатной температуре на 3 мин. Клетки осаждают центрифугированием (3 мин при 2200 об./мин.), надосадок сливают, клетки встряхивают и добавляют 500 мкл PBS (отмывка). Повторяют отмывку 2 раза. Готовят рабочее разведение клеточной взвеси в PBS в концентрации 1 млн/мл (проверяют в камере Горяева). В специальные пробирки разливают готовую взвесь клеток по 100 мкл. Число пробирок зависит от числа используемых в каждом конкретном случае моноклональных антител.

Наиболее полная панель для первичной диагностики формы лейкоза включает следующие МКА: Control, CD45, CD14, CD2, CD5, CD7, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD10, HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD15, CD11c, pIgM. Пробирки подписывают по названию МКА. В каждую пробирку с

взвесью клеток вносят МКА в количестве 10 мкл (согласно инструкции). Далее добавляют CD45+ — МКА к общему лейкоцитарному антигену. Пробы инкубируют в холодильнике (+4 °С) 30 мин. После инкубации клетки отмывают PBS 2 раза. Если используется МКА без флуоресцентной метки, то после первой отмывки к пробе добавляют 10 мкл вторичных антител, меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE), инкубируют в холодильнике 15 мин, после чего отмывают 1 раз. После отмывки пробы заливают 500 мкл раствора параформальдегида (1%). Результаты учитывают на (проточном цитофлуориметре) аппарате Cytomics FC500 (фирмы «Beckman Coulter») согласно инструкции фирмы-производителя.

Описание технологии метода определения цитоплазматических (внутриклеточных) маркеров лейкозных клеток

В качестве материала для исследования используется пунктат костного мозга или периферическая кровь. Исследуемый материал доставляют в специальных пробирках, в которые предварительно вносится антикоагулянт (3,8% цитрат натрия или ЭДТА натрия). Кровь или костный мозг набирают в объеме от 2,5 до 5 мл в зависимости от клеточности. Методика определения поверхностных дифференцировочных антигенов выполняется с предварительным выделением мононуклеаров. Для этого вначале разводят костный мозг в 2 раза раствором фосфатного буфера (Phosphate buffered saline=PBS). Периферическую кровь разводить не надо. Для выделения мононуклеаров в пробирку наливают 2,5 мл Histopaque (жидкость для разделения клеток в градиенте плотности). Пастеровской пипеткой сверху наслаивают 5 мл разведенного костного мозга или цельной периферической крови. Центрифугируют 30 мин при 1500 об./мин. Пастеровской пипеткой собирают «кольцо» мононуклеаров в интерфазе, переносят в сухую пробирку, остаток выбрасывают. Добавляют 5 мл PBS, центрифугируют 3 мин при 2200 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок встряхивают. Взвесь клеток заливают лизирующим раствором для лизиса эритроцитов, до 5–8 мл, оставляют при комнатной температуре на 3 мин. Клетки осаждают центрифугированием (3 мин при 2200 об./мин), надосадочную жидкость сливают, клетки встряхивают и добавляют 500 мкл PBS (отмывка). Повторяют отмывку 2 раза. Готовят рабочее разведение клеточной взвеси в PBS в концентрации 1 млн/мл (проверяют в камере Горяева). В специальную пробирку наливают готовую взвесь клеток (весь объем для внутриклеточного исследования=1 мл). В пробирку добавляют CD45 — МКА к общему лейкоцитарному антигену в количестве 50 мкл и инкубируют при комнатной температуре 30 мин. После инкубации клетки отмывают PBS 2 раза. Надосадочную жидкость сливают, клетки встряхивают и добавляют 200 мкл. Cytofix/Cytoperm (фирмы «Becton Dickinson»). Инкубируют 15 мин. После инкубации клетки отмывают PBS 2 раза. Надосадочную жидкость сливают, клетки встряхивают и добавляют 1 мл заранее разведенного раствора Perm/Wash (фирмы «Becton Dickinson»)

(разведение: к 100 мкл раствора Perm/Wash добавляют 900 мкл дистиллированной воды). В специальные пробирки разливают готовую взвесь клеток по 200 мкл. Число пробирок зависит от числа используемых в каждом конкретном случае моноклональных антител. Для первичной диагностики формы лейкоза используются следующие МКА: IgM, MPO, TdT, CD79a, CD3+ контрольная проба. Пробирки подписывают по названию МКА. В каждую пробирку с взвесью клеток вносят определенное МКА в количестве 10 мкл. Пробы инкубируют в холодильнике (+4 °С) 30 мин, после чего отмывают 1 раз. После отмывки пробы заливают 500 мкл раствора параформальдегида (1%). Учитывают результаты на (проточном цитофлуориметре) аппарате Cytomics FC500 (фирмы «Beckman Coulter») согласно инструкции фирмы-производителя.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Иммунофенотипирование позволяет получить незаменимую информацию о линейном происхождении и в большинстве случаев — о степени дифференцировки лейкозных клеток, что важно для выбора адекватного протокола химиотерапии. При этом всегда следует помнить о неполном соответствии иммунофенотипа бластных клеток параметрам нормальных клеток на определенных стадиях гемопоэза.

Иммунофенотипическая диагностика может быть затруднена также в случаях, когда имеют место:

- лейкозы с коэкспрессией нескольких маркеров «чужих» линий;
- бифенотипические лейкозы;
- лейкозы с гетерогенными популяциями бластов;
- лейкозы с аберрантными фенотипами (характеризующиеся отсутствием одного или нескольких линейно-специфичных маркеров);
- лейкозы с асинхронной экспрессией антигенов (характеризующиеся одновременной экспрессией маркеров различных этапов дифференцировки, что не встречается на клетках нормального гемопоэза);
- при наличии примеси в аспирате костного мозга клеток периферической крови.

Правильной интерпретации результатов исследования в сложных для диагностики случаях способствуют:

1. Оптимальный выбор МКА для типизирующей панели.
2. Окрашивание одновременно нескольких антигенов в одной пробе.
3. Анализ процента позитивных клеток и интенсивности флуоресценции маркеров.
4. знание критериев классификации как типичных, так и нетипичных вариантов ОЛ.