

УДК 616/618.037

Мониторинг минимальной остаточной болезни в гематологической клинике

**С.С. Дагбашян, Л.С. Саакян, А.Г. Захарян,
Э.Е. Кабасакалян, М.Г. Анастасиади, А.А. Пепанян**

*Гематологический центр МЗ РА,
Кафедра гематологии ЕГМУ им. М. Гераци
0014, Ереван, ул. Нерсисяна, 7*

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, лейкозы

Под минимальной остаточной болезнью (МОБ), или минимальной резидуальной болезнью (МРБ, Minimal residual diseases) понимают популяцию опухолевых клеток, оставшуюся в организме после достижения клинко-гематологической ремиссии (когда количество бластных клеток в миелограмме менее 5%). МОБ является основной причиной рецидивов болезни и дальнейшая консолидирующая или поддерживающая терапия бывает направлена именно на уничтожение остатков опухолевых клеток [2, 4].

Однако мониторинг МОБ одновременно может служить нескольким целям: оценке эффективности терапии, сравнению различных лечебных протоколов, контролю за сохранением ремиссии и максимально раннему обнаружению рецидивов для своевременной коррекции тактики лечения. Необходимо отметить, что отслеживание МОБ возможно только при идентификации лейкозного клона, то есть выявлении особых фенотипических и генотипических характеристик лейкозных клеток, которые позволяют отличить их от нормальных гемопоэтических клеток-предшественниц. Как правило, объем остаточной массы лейкоэмических клеток лежит за пределом чувствительности световой микроскопии.

Наибольшее значение имеет оценка МОБ по завершении первого этапа терапии [7, 8, 15]. В серии крупных исследований было убедительно показано, что статус МОБ по завершении 4–6 нед. интенсивной терапии является наиболее значимым прогностическим фактором, позволяющим выявить группу с низкой вероятностью рецидива (<5%) и группу с вероятностью рецидива, превышающей 75%. Как и ранний ответ на терапию, исследование МОБ является интегральным отражением биологических особенностей опухоли, ее чувствительности к проводимой терапии, а

также индивидуальных вариаций метаболизма химиопрепаратов. В большинстве современных протоколов окончательное определение группы риска проводится в соответствии со статусом МОБ на исходе первого этапа терапии. Дополнительный контроль МОБ на более отдаленных сроках позволяет выявить группу пациентов, которым необходима максимальная интенсификация терапии, вплоть до выполнения пересадки кроветворных стволовых клеток в первой ремиссии [18, 20, 21].

Важным практическим приложением технологий мониторинга МОБ является клиническое исследование новых противоопухолевых препаратов. Принимая во внимание хорошие результаты стандартной терапии, внедрение в терапию новых препаратов представляет существенные организационные и этические трудности. Демонстрация эффективности нового препарата в группе пациентов с первичным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) на основании стандартных критериев оценки, таких как общая и бессобытийная выживаемость, потребует нереалистично большой выборки и длительных сроков наблюдения. Использование МОБ в качестве суррогатного маркера эффективности терапии представляется перспективным и, возможно, позволит в более короткие сроки оценить потенциал новых медикаментов в лечении ОЛЛ у детей.

Количественная диагностика МОБ важна практически на всех стадиях лечения гемобластозов [10]. При использовании современных препаратов на ранних этапах лечения содержание лейкозных клеток быстро снижается до цитологически недетектируемого уровня, и определение МОБ на этом этапе лечения служит прогностической информацией, превосходящей все известные классические прогностические факторы [27]. Исследования показали, что пациенты с недетектируемой МОБ имеют отличный прогноз и являются хорошими кандидатами для деинтенсификации лечения или, по крайней мере, не должны подвергаться дальнейшей интенсификации лечения, в отличие от пациентов с высоким уровнем МОБ, которые нуждаются в экстренной необходимости интенсификации лечения и даже использовании для новых терапевтических подходов [26, 27]. Предпосылками успешной пересадки костного мозга являются максимальное снижение МОБ до пересадки и благоприятные результаты отслеживания кинетики МОБ после пересадки костного мозга [25]. Особенно важно следить за МОБ в ремиссии для раннего обнаружения и предотвращения надвигающегося рецидива [7, 18].

Принимая все это во внимание, можно сделать вывод, что отслеживание МОБ важно не только для контроля течения и прогноза заболевания, но также для выбора наиболее эффективной и сопряженной с меньшим риском стратегии лечения [18], и поэтому определение МОБ необходимо включать во все протоколы лечения с целью выяснения эффективности выбранной лечебной процедуры для данного пациента [27].

Методы, используемые для определения МОБ, должны отвечать следующим требованиям: высокая чувствительность, специфичность, точное измерение количества маркера, техническая осуществимость (простота стандартизации и быстрое получение результатов для клинического применения), а также внутрилабораторная и межлабораторная воспроизводимость [27].

Существует несколько принципиально различных методов выявления МОБ. Каждый из них обладает определенными преимуществами и недостатками, и выбор метода диктуется клинической ситуацией и задачей исследования [17]. Мишенью при исследовании МОБ, как уже было отмечено выше, является клоноспецифичная характеристика лейкомиических клеток, позволяющая достоверно выявить и количественно охарактеризовать небольшую опухолевую популяцию на фоне избытка нормальных форменных элементов крови или костного мозга.

Материалом для исследования служит, как правило, костный мозг. Важным исключением являются Т-ОЛЛ, при котором существует абсолютная корреляция между уровнем МОБ в костном мозге и периферической крови. При выборе метода определения МОБ необходимо учитывать такие характеристики, как чувствительность, универсальность, т.е. применимость к значительной части образцов, а также трудоемкость и стоимость исследования [23].

В настоящее время основными методами, позволяющими идентифицировать остаточные лейкозные клетки, являются цитогенетика (метод бандирования, FISH-флюоресцентная *in situ* гибридизация, определение ploидности хромосом, метод полимеразной цепной реакции (PCR) на выявление транслокаций, выявление экспрессии генов иммуноглобулинов (Ig) и Т-клеточных рецепторов с помощью иммуноблотинга) и иммунофенотипирование (проточная цитофлюориметрия).

При выявлении продуктов реаранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора в качестве мишени используется уникальная последовательность нуклеотидов, образующаяся в результате перестройки в указанных локусах. Преимуществом данного метода является высокая чувствительность, достигающая 1×10^5 , и возможность применения у подавляющего большинства (до 98%) пациентов. К недостаткам относят трудоемкость, обусловленную необходимостью детального молекулярно-биологического анализа первичного образца и определения уникальной мишени для каждого пациента.

Общей проблемой при использовании аберрантного иммунофенотипа и продукта реаранжировки генов Т- и В-клеточных рецепторов в качестве маркера МОБ является нестабильность мишени, которая может привести к ложноотрицательным результатам и делает необходимым одновременное исследование нескольких маркеров.

Наиболее чувствительным методом диагностики резидуальной болезни при острых лейкозах является метод PCR. Количественное определение остаточных лейкозных клеток после проведения терапии индукции ремиссии, консолидации ремиссии и ранней интенсификации – основа выработки стратегии и тактики лечения больного острым лейкозом. Невозможность выявления с помощью молекулярно-биологических методов исследования лейкозных клеток является основным критерием прекращения лечения и установления факта выздоровления больного от лейкоза. Мониторинг течения болезни с использованием метода PCR обладает высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать неопластические клетки в крови даже тогда, когда количество их весьма невысоко и не превышает 1×10^3 или 1×10^6 [22].

Метод PCR с большим успехом используется в гематологической практике уже около 10 лет. В частности, RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) позволяет выявлять отдельные лейкозные клетки, персистирующие во время ремиссии, то есть дает возможность проводить мониторинг МОБ. Это очень важно для детекции и количественного учета химерных генов, образовавшихся в результате специфических хромосомных транслокаций или инверсий.

Известно, что для большинства клинико-морфологических типов гемобластозов характерны неслучайные изменения кариотипа, чаще всего хромосомные транслокации, приводящие к формированию химерных генов. Показано, что в тех случаях заболевания, при которых лейкозные клетки характеризуются наличием специфических химерных генов и, соответственно, их химерных продуктов (транскриптов химерных генов), достижение терапевтической ремиссии сопровождается значительным снижением уровня химерного транскрипта в крови и костном мозге больных, нередко вплоть до полного исчезновения: наступает так называемая молекулярная ремиссия. Установлено также, что на любом этапе гематологической ремиссии может наблюдаться резкое повышение содержания химерного транскрипта в крови или костном мозге больного, то есть возникает молекулярный рецидив. Вслед за этим обязательно следует гематологический рецидив, как правило, 4-6 месяцев спустя. Общеизвестно, что применение молекулярно-генетических методик создает возможность значительно более ранней диагностики рецидива, чем стандартные клинико-лабораторные тесты [16, 19].

Достигнутые в последние годы успехи в лечении лейкозов в значительной мере обусловлены подбором терапевтических протоколов в соответствии с результатами хромосомного анализа на момент постановки диагноза. В основе этого подхода лежит вывод о том, что кариотип лейкоэмических клеток представляет собой важнейший прогностический признак [4].

Метод проточной цитометрии основан на том, что лейкозные клетки имеют аномальный иммунофенотип – LAIP (leukemia-associated aberrant immuno pheno types). Процедура определения МОБ с его помощью состоит в выделении ядерных клеток крови или костного мозга, с дальнейшей их инкубацией с моноклональными антителами, специфичными к поверхностным антигенам лейкозных клеток и мечеными флуоресцентными группами. При пропускании полученных проб через проточный цитометр, регистрируется флуоресцентный сигнал от клеток, несущих антитело. Наиболее точные результаты получают с помощью мультипараметрической проточной цитометрии при использовании 4-6 антител, меченных разными флуорофорами [5]. К достоинствам метода относят применимость в тех ситуациях, когда отсутствуют генетические маркеры (химерные гены или другие генетические аномалии), относительную дешевизну и быстроту (1–2 дня) [6].

Теоретически чувствительность метода может достигать 10^{-6} , но на практике она гораздо ниже [6]. К факторам, снижающим чувствительность проточной цитометрии, относят: недостаточное различие антигенных профилей опухолевых и нормальных клеток, существование нескольких субпопуляций лейкозных клеток, некоторые из которых малочисленны и поэтому трудно определяемы, неспособность отследить изменение иммунофенотипа лейкозных клеток в период между диагнозом и рецидивом, необходимость подсчета большого числа клеток и использования высококвалифицированных кадров, потеря клеток, зависящая от типа клеток и процедуры, используемой для их выделения [12].

Если иммунофенотип лейкозных клеток достаточно отличим от иммунофенотипа нормальных клеток, то чувствительность составляет 10^{-4} . В остальных случаях, когда иммунофенотипы лейкозных и нормальных клеток частично перекрываются, чувствительность детекции понижается до 10^{-3} [24].

Для достижения бóльшей специфичности раньше предлагалось для каждого пациента определять индивидуальный иммунофенотип лейкозных клеток, используя большой набор антител, и сравнивать этот иммунофенотип с иммунофенотипом нормальных клеток костного мозга того же пациента для нахождения максимальной разницы. Однако на конференции в Бетезде в 2006г. пришли к выводу, что даже при таком подходе в 50% случаев использования проточной цитометрии не удастся получить достоверные результаты. В целях сокращения финансовых затрат Международный Консенсус рекомендовал сводить к минимуму первоначальные исследования и направлять усилия на более интенсивный анализ образцов тех пациентов, у которых при первоначальных исследованиях выявляется ярковыраженный аберрантный иммунофенотип, при этом для первичного скрининга предлагается использовать около 30 видов антител [9].

Изменчивость иммунофенотипа лейкозных клеток в период между диагнозом и рецидивом, которая наблюдается у 90% пациентов, – еще более серьезная проблема, часто приводящая к невозможности детекции МОБ и возникающая, вероятно, либо из-за нестабильности генома злокачественных клеток, либо из-за экспансии при рецидиве небольшого пула лейкозных клеток, фенотипически отличающегося от основного и недектируемого при постановке диагноза [27].

Вероятно, со временем удастся выявить закономерности изменения иммунофенотипов лейкозных клеток, сопоставив эти изменения с рекуррентными генетическими нарушениями, свойственными тому или иному виду лейкоза, как, например, это удалось выявить для хромосомной транслокации t(15;17) (PML-RARA) [13].

Несмотря на это, в настоящее время метод проточной цитометрии принято считать наиболее быстрым и простым способом выявления МОБ. Наибольшую ценность метод проточной цитометрии имеет при Т-линейных ОЛЛ, так как возможность его применения составляет 90%. Для диагностики МОБ наиболее информативны следующие иммунофенотипические комбинации клеточных маркеров. Для Т-линейных ОЛЛ – TdT/цитоплазматический CD3. Для В-линейных ОЛЛ – следующие комбинации: TdT-CD10 (или CD19-CD34)/ CD13, TdT-CD10 (или CD19-CD34)/ CD33, TdT-CD10 (или CD19-CD34)/ CDw65, TdT-CD10 (или CD19-CD34)/ CD21, TdT-CD10 (или CD19-CD34)/CD56, TdT/цитоплазматический μ /CD34. Для ОНЛЛ – следующие комбинации: CD34/CD56, CDw65/CD34/TdT. Гетерогенная экспрессия антигенов опухолевыми клетками и изменения иммунофенотипа во время терапии делают необходимым применение для определения МОБ широкой панели моноклональных антител, включающей в себя CD19, CD10, CD34, CD45, CD20, CD38 и CD58, а также, в некоторых случаях, дополнительные лейкоз-ассоциированные антигены [11, 14].

Клиническая значимость определения МОБ в гематологической клинике методом проточной цитометрии показана различными исследовательскими группами. Чаще всего они используют различные подходы к определению остаточных опухолевых клеток [1, 3, 26, 28]. Поэтому, несмотря на определенный опыт применения проточной цитометрии для мониторинга МОБ, накопленный к настоящему времени, крайне редки публикации, в которых бы описывался четкий алгоритм анализа данных цитометрического исследования при лейкозах. Кроме того, постоянно появляются новые маркеры, потенциальное применение которых для определения МОБ представляется перспективным. Одним из таких антигенов, например, является NG2, экспрессия которого специфична для ОЛЛ, ассоциированных с перестройками гена MLL [20]. В то же время, некоторыми исследователями предлагаются упрощенные подходы для мониторинга МОБ методом проточной цитометрии [27]. Применимость

таких методов пока остается недостаточно изученной. Кроме того, конкретные методики мониторинга МОБ могут применяться только в рамках конкретного протокола лечения. Методология определения МОБ во время терапии по одному протоколу может не удовлетворять условиям другого протокола. Это может быть обусловлено различиями в изменении иммунофенотипа опухолевых клеток под воздействием различных препаратов, разным временем заселения костного мозга нормальными клетками-предшественниками, а также другими факторами, напрямую связанными с терапевтическим режимом.

Резюмируя вышеизложенное, можно констатировать, что исследование оптимальных методов мониторинга МОБ в гематологии продолжается. Прогресс в медицине и смежных с ней науках стремителен, и есть основания для надежды, что онкогематологические заболевания в скором времени перейдут из разряда пугающих своим фатальным исходом во вполне «нормальные», поддающиеся лечению. Есть основания предполагать, что в решение этих задачи весьма существенный вклад внесет мониторинг МОБ, который может стать основой эффективных методов скрининга и ранней диагностики, выяснения действенности лекарственных препаратов у конкретного пациента в гематологической клинике.

Поступила 11.06.13

Մինիմալ մնացորդային հիվանդության մոնիտորինգը արյունաբանական կլինիկայում

**Ս.Ս. Դաղբաշյան, Լ.Ս. Սահակյան, Ա.Հ. Զախարյան,
Է.Յ. Կաբասակալյան, Մ.Գ. Անաստատիադի, Ա.Ա. Պեպանյան**

Ակնարկում ամփոփված են ժամանակակից պատկերացումները մինիմալ մնացորդային հիվանդության ախտորոշման հիմնական եղանակների և արյունաբանական կլինիկայում նրանց կիրառության հիմնահարցերի վերաբերյալ:

Minimal residual disease monitoring in hematological clinics

**S.S. Daghbashyan, L.S. Sahakyan, A.H. Zakharyan, E.Y. Kabasakalyan,
M.G. Anastasiady, A.A. Pepanyan**

The review summarizes current understanding of minimal residual disease, comparison of the basic methods of diagnosis and their application and monitoring in hematologic clinics.

Литература

1. *Бутлицкий Д.А.* Молекулярно-генетический мониторинг минимальной остаточной болезни у пациентов с хроническим миелолейкозом. Дис...канд.мед. наук, СПб., 2006.
2. *Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Москаленко М.В., Абдулкадыров К.М.* Острый миелоидный лейкоз и минимальная резидуальная болезнь. Бюл. СО РАМН, 2011, т.31, 2, с.6-13.
3. *Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю.* Сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии и выявления химерного транскрипта полимеразной цепной реакцией у детей, больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Гематология и трансфузиология, 2010, 2, с. 3-9.
4. *Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М.* Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. Онкогематология, 2010, 2, с. 46-54.
5. *Al-Mawali A., Gillis D., Hissaria P., Lewis I.* Incidence, sensitivity and specificity of leukemia associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. Am. J. Clin. Pathol., 2008, 129, p.934-945.
6. *Al-Mawali A., Gillis D., Lewis I.* The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Am. J. Clin. Pathol., 2009, 131(1), p.16-26.
7. *Bassan R., Spinelli O., Oldani E. et al.* Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Blood, 2009, 113(18), p.4153-4162.
8. *Béné M.C., Kaeda J.S.* How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European Leukaemia Net. Haematologica, 2009, 94(8), p.1135-1150.
9. *Calvo K.R., McCoy C.S., Stetler-Stevenson M.* Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology, 2011, vol.699, p.295-316.
10. *Campana D.* Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hematol. Oncol. Clin. North. Am., 2009, 23(5), p.1083-1098.
11. *Coustan-Smith E., Song G., Clark C. et al.* New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood, 2011, p.6267-6276.
12. *Craig F.E., Foon K.A.* Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood, 2008, 11(8), p.3941-3967.
13. *Dimov N.D., Medeiros L.J., Ravandi F., Bueso-Ramos C.E.* Acute Promyelocytic Leukemia at Time of Relapse Commonly Demonstrates Cytogenetic Evidence of Clonal Evolution and Variability in Blast Immunophenotypic Features. American Journal of Clinical Pathology, 2010, 133, p.484-490.
14. *Domingo E., Moreno C., Sánchez-Ibarrola A. et al.* Enhanced sensitivity of flow cytometry for routine assessment of minimal residual disease. Haematologica, 2010, vol.95, 4, p.691-692.
15. *Fábián A., Vereb G., Szöllösi J.* The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: Markers, pathways and therapy. Cytometry. Part A, 2013, vol.83A, is.1, p.62-71.
16. *Gujral S., Badrinath Y., Kumar A. et al.* Immunophenotypic Profile of Acute Leukemia: Critical Analysis and Insights Gained at a Tertiary Care Center in India. Cytometry, Part B, 2009, 76, p.199-205.
17. *Gulley M.L., Shea T.C., Fedoriw Y.* Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia. J. Mol. Diagn., 2010, 12, p. 3-16.
18. *Kern W., Schoch C., Haferlach T., Schnittger S.* Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2005, N56(2), p.283-309.
19. *Liu X., Hsieh H.B., Campana D., Bruce R.H.* A new method for high speed, sensitive detection of minimal residual disease. Cytometry. Part A, 2012, 81, p.169-175.

20. Novoa V., Núñez N.A., Carballo O.G., Lessa C.F. Aberrant immunophenotypes in acute leukemia in a Buenos Aires' hospital population. *Medicina (B. Aires)*, 2013, vol.73, 1, p.315-324.
21. Patkar N., Abu Alex A., Bargavi B, et al. Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country. *Cytometry. Part B: Clinical Cytometry*, 2012, vol. 82B, 4, p.252–258.
22. Pedreira C.E., Costa E.S., Almeida J. et al. A Probabilistic Approach for the Evaluation of Minimal Residual Disease by Multiparameter Flow Cytometry in Leukemic B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders. *Cytometry. Part A*, 2008, 73A, p.1141-1150.
23. Seegmiller A.C., Kroft S.H., Karandikar N.J., Mc Kenna R.W. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2009, 132, p.940-949.
24. Shook D., Coustan-Smith E., Ribeiro R.C. et al. Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma*, 2009, 9, suppl. 3, p.281-285.
25. Spinelli O., Peruta B., Tosi M. et al., Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2007, vol. 92, 5, p.612-618.
26. Stow P., Key L., Chen X. et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2010, 115(23), p.4657–4663.
27. Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*, 2007, 21(4), p.622-626.
28. Zangrando A., Intini F., te Kronie G., Basso G. Validation of NG2 in identifying BP-ALL patients with MLL-rearrangements using qualitative and quantitative flow cytometry: a prospective study. *Leukemia*, 2008, vol. 22, p.858-861.