

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

С.А. Луговская,

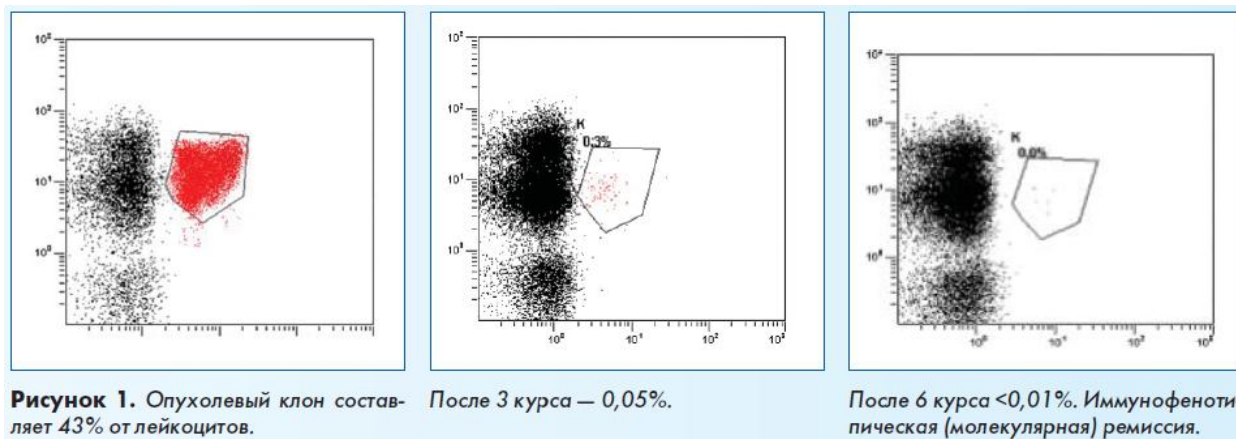
РМАПО, кафедра клинической лабораторной диагностики

Проточная цитофлуориметрия занимает ключевую роль в диагностике онкогематологических заболеваний. Кафедра клинической лабораторной диагностики РМАПО с момента ее основания занималась изучением морфо-функциональных характеристик клеток крови и костного мозга при острых и хронических лейкозах, используя морфологические и цитохимические исследования. Более 10 лет назад кафедра дополнила эти исследования современным высоко чувствительным методом — проточной цитофлуориметрией, который позволил более точно охарактеризовать поверхностную и внутриклеточную антигенную структуру опухолевых клеток, т.е. их иммунологический фенотип. Диагностические возможности метода во многом определяются выбором моноклональных антител и проточного цитометра. Начиная работу с 1-2-цветного анализа, кафедра постепенно переходила на многоцветный анализ и в настоящее время имеет возможность анализировать одновременно экспрессию 5-6 антигенов на одной клетке, используя современные анализаторы FC500 Beckman Coulter, CantoII Vecton Dickinson. Это значительно повысило диагностические возможности, особенно касающихся острых лимфобластных лейкозов, недифференцированных, бифенотипических лейкозов, а также внесло определенную ясность в диагностику и дифференциальную диагностику разнообразных В-, Т- и НК-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ). Проточная цитофлуориметрия в онкогематологии развивается по нескольким направлениям:

- диагностика острых лейкозов и ЛПЗ,
- мониторинг эффективности химиотерапии, т.е. детекция минимальной резидуальной болезни (МРБ) при острых лейкозах и ЛПЗ (хронический лимфолейкоз, волосатоклеточный лейкоз, миеломная болезнь),
- оценка восстановления нормального кроветворения после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и химиотерапии,
- количественное определение гемопоэтических стволовых клеток периферической крови, костного мозга, пуповинной крови, оценка влияния современной химио- и иммунотерапии на основные показатели клеточного и гуморального иммунитета.

Современная комбинированная терапия лимфопролиферативных заболеваний с использованием моноклональных антител (мабтера, алемтузумаб и др.) позволила увеличить число полных клинико-гематологических ремиссий и добиться получения молекулярных ремиссий. В связи с этим разработка и внедрение методов изучения минимальной остаточной (резидуальной) болезни является ключевым звеном в оценке эффективности терапии. *Минимальная резидуальная болезнь (МРБ)* — состояние, связанное с сохранением опухолевых клеток в крайне низких концентрациях, ниже предела чувствительности морфологических методов, обуславливающее развитие рецидива. В 2007 г. опубликован международный стандартизованный протокол для мониторинга резидуальной болезни при В-ХЛЛ методом проточной цитофлуориметрии, в котором участвовало 22 автора из различных клиник и институтов Европы и США. В качестве стандартизованного определения МРБ при В-ХЛЛ предложено использовать 4-х цветную проточную цитометрию. При разработке протокола проведен сравнительный анализ более 50 специфичных для ВХЛЛ комбинаций антител, в результате чего были отобраны три основных и два дополнительных сочетания моноклональных антител. Чувствительность метода составляет 1 клетка ВХЛЛ на 10 000 нормальных лейкоцитов.

При наличии более 0,01% опухолевых клеток и отсутствии клинических проявлений констатируется МРБ-позитивная ремиссия. Выявление опухолевых клеток В-ХЛЛ менее 0,01% свидетельствует о достижении МРБ-негативной, т.е. молекулярной ремиссии. Чем ниже уровень остаточной опухолевой популяции клеток В-ХЛЛ, тем лучше прогноз заболевания (5-летняя общая выживаемость составляет 96%). Основной целью современной терапии В-ХЛЛ является достижение МРБ-негативной ремиссии.



В настоящее время на кафедре проведено около 300 исследований на МРБ в динамике лечения 160 пациентов В-ХЛЛ, принимающих комбинированную терапию с использованием Мабтеры (моноклональные антитела анти-CD20). У 73 пациентов В-ХЛЛ при финальной оценке МРБ после окончания терапии проведено параллельное исследование периферической крови и костного мозга на наличие МРБ. Результаты иммунофенотипирования показали, что молекулярная ремиссия была достигнута у 60% больных. В 24% наблюдений ВХЛЛ опухолевый клон выявлялся только в костном мозге и не определялся в периферической крови, что делает целесообразным его исследование после завершения терапии. Таким образом, использование стандартизованного подхода определения МРБ при В-ХЛЛ методом проточной цитометрии позволяет быстро и с высокой чувствительностью определять кинетику элиминации опухолевых клеток и проводить мониторинг противоопухолевого ответа, тем самым оценивая эффективность терапии.

На рисунке 1 показана кинетика элиминации опухолевого клона после 3 и после 6 курсов лечения В-ХЛЛ по протоколу FCR (флюдарабин, циклофосфан, ритуксимаб). Большинство случаев В-ХЛЛ выявляется еще в асимптоматической форме, а лечение, согласно современным стандартам, начинают проводить при появлении признаков прогрессирования или на поздних клинических стадиях. Поэтому при первичной диагностике В-ХЛЛ важным является определение индивидуального прогноза. Наиболее значимым прогностическим фактором В-ХЛЛ является мутационный статус генов переменного региона тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgVH*-генов). Однако технология определения данного параметра остается трудоемкой и дорогостоящей, в связи с чем для оценки прогноза В-ХЛЛ используются иммунофенотипические маркеры, т.к. ZAP-70 и CD38. Тирозинкиназа ZAP-70 в норме представлена в Т- и НК- лимфоцитах, эозинофилах и тучных клетках и участвует в проведении сигнала с Т-клеточного рецептора в ядро клетки. В нормальных циркулирующих В-лимфоцитах ZAP-70 не экспрессируется, однако, в ряде случаев В-ХЛЛ ее экспрессия возрастает, что ассоциируется с усилением передачи сигналов от В-клеточного рецептора, активацией клетки и может способствовать более тяжелому клиническому течению заболевания.

Анализ полученных нами данных выявил корреляцию экспрессии ZAP-70 с мутационным статусом *IgVH*-генов в 88% случаев В-ХЛЛ, что позволяет использовать оценку данного

маркера для выделения вариантов В-ХЛЛ с агрессивным течением. Исследование данного маркера представляет интерес и с точки зрения поиска мишени для последующей терапии В-ХЛЛ — блокада экспрессии ZAP-70 может останавливать пролиферацию клеток, экспрессирующих данный маркер. Согласно литературным данным экспрессия CD38 на более 20% опухолевых клеток коррелирует с более короткой выживаемостью больных. Сложность в интерпретации этого показателя заключается в том, что в различных лабораториях мира не существует единой точки cut-off, (вариабельность от 6-30%), что затрудняет сравнительный анализ данных. Нами показано, что при пороге экспрессии CD38 >20% опухолевых клеток В-ХЛЛ получены согласующиеся данные с мутационным статусом *IgVH*-генов в 62% случаев. В настоящее время авторами высказывается точка зрения, что CD38 является маркером прогноза, независимым от мутационного статуса *IgVH*-генов. Таким образом, сочетанный анализ экспрессии ZAP-70 и CD38 позволяет использовать их для определения прогностических групп В-ХЛЛ, выделяя более неблагоприятные варианты заболевания.

Диагностические возможности проточной цитофлуориметрии достаточно многогранны: от прямого подсчета основных популяций клеток иммунной системы и выявления иммунодефицитных состояний, до обнаружения лейкозных клеток в биологических жидкостях и тканях и контролирования их элиминации на фоне комбинированной химиоиммунотерапии. Все более нарастающая терапия моноклональными антителами диктует необходимость разработки стандартных подходов к оценке плотности интересующих молекул (CD20, CD52, CD19, CD200 и др.) и мониторингованию опухолевой лейкозной популяции.