

Імунофенотипування методом проточної цитометрії у діагностиці множинної мієломи

У рамках міжнародної школи онкогематології з професором Іриною Крячок 1 липня відбувся майстер-клас, присвячений важливим питанням діагностики та 2-ї лінії лікування множинної мієломи. Серед експертів заходу була провідний фахівець з імунодіагностики онкогематологічних захворювань Медичної лабораторії «Діла» Валерія Валеріївна Конашенкова. Вона розповіла про роль імунофенотипування методом проточної цитометрії у діагностиці та моніторингу множинної мієломи.

Стандартними методами діагностики множинної (плазмноклітинної) мієломи (ММ) є цитологічне дослідження пунктату кісткового мозку та гістологічне дослідження трепано-біоптату плоскої кістки та/або плазмцитоми. Їх метою є виявлення субстрату хвороби, а саме моноклональних плазматичних клітин. Однак у 2014 р. були сформульовані біомаркери злоякісності ММ, так звані критерії SLiM CRAB: S (Sixty percents) – 60% моноклональних плазматичних клітин у кістковому мозку; Li – співвідношення легких ланцюгів (Light chains) ≥ 100 (капа) або $\leq 0,01$ (лямбда); M (MRI): зміни на МРТ (>1 літичного вогнища >5 мм у діаметрі). У зв'язку з розширенням діагностичних критеріїв ММ, а також появою високоефективних методів лікування, застосування таргетних препаратів з'явилася необхідність у глибшому аналізі структури та властивостей мієломних клітин. Ключовою характеристикою патологічної трансформації є абераційний фенотип моноклональних плазматичних клітин, який можна визначити за допомогою імунофенотипування клітин кісткового мозку методом проточної цитометрії.

Первинна діагностика ММ

Проточна цитометрія входить до переліку рекомендованих Національною онкологічною мережею США (NCCN) методів первинної діагностики ММ.

Наукові та практичні можливості проточної цитометрії:

- можливість виявити та дати чітку характеристику мієломних клітин, навіть якщо субстрат хвороби є мінімальним;
- можливість встановлення абераційного фенотипу та визначення маркерів, що мають прогностичну цінність;
- диференційна діагностика ММ, моноклональних гаммапатій неясного значення (MGUS), лімфом і реактивних станів;
- моніторинг мінімальної залишкової хвороби після проведеної терапії;
- створення нових таргетних препаратів, мішенями яких можуть бути абераційні маркери мієломних клітин.

Під час обстеження пацієнта, у якого запідозрено ММ, перед фенотипуванням необхідно провести морфологічне дослідження. Його метою є не тільки підрахунок кількості плазматичних клітин і характеристика окремих абераційних змін, а й опис плазматичних клітин, які можуть мати значення для проточної цитометрії.

Експерти Європейської мережі з вивчення мієломи (European Myeloma Network, EMN) розробили рекомендації, які стосуються загальних технічних питань лабораторної діагностики ММ. Однак ця інформація також важлива для практикуючих онкогематологів, які ведуть пацієнтів з ММ.

Обстеження пацієнта включає 3 послідовних етапи: преаналітичний, аналітичний і саме дослідження.

Преаналітичний етап

За допомогою проточної цитометрії можна досліджувати аспірат кісткового мозку, кров, тонкогубковий аспірат, однак еталонним матеріалом для дослідження є зразки кісткового мозку. Оскільки об'єктом дослідження є кістковий мозок, об'єм матеріалу має бути невеликим (щоб уникнути ймовірності розведення матеріалу за периферичною кров'ю). У ході дослідження можна використовувати лише один антикоагулянт – ЕДТА. До складу моноклональних антитіл, які застосовуються для виділення плазматичних клітин, входить гепаринзв'язуючий домен. При застосуванні гепаринових антикоагулянтів відбувається руйнування антитіл, відповідно результати дослідження будуть хибними. Оптимальний час доставки біологічного матеріалу до лабораторії – до 24 годин. Важливо зберігати якісні характеристики біологічного матеріалу (дотримання температурного режиму, уникнення формування згустків, збереження життєздатності клітин вище 85%).

Аналітичний етап

За допомогою методу проточної цитометрії виділяють плазматичні клітини на основі експресії маркерів CD45/SSC, CD138+/CD38+.

Для подальшої детальної характеристики пухлинної популяції клітин використовують адекватно підібрану широку панель моноклональних антитіл. Більшість дослідницьких груп застосовують стандартизовану панель моноклональних антитіл Європейського консорціуму із стандартизації проточної цитометрії EuroFlow.

Дослідження

Нормальні плазматичні клітини можуть мати абераційні фенотипи. Виділяють 4 категорії нормальних плазматичних клітин:

- 1) CD19+/CD59- – класичний варіант (nBMPC);
- 2) CD19-/CD56+ – абераційний варіант (aBMPC);
- 3) CD19-/CD56- – подвійний негативний варіант (dnBMPC);
- 4) CD19+/CD56+ – подвійний позитивний варіант (dpBMPC).

CD19 – це маркер, який у нормі присутній на В-лімфоцитах, однак близько 1/3 плазматичних клітин є CD19-. Зазвичай трансформовані плазматичні клітини є CD19-, однак описані випадки, коли клітини при ММ є CD19+ (як правило, такі пацієнти мають гірший прогноз). Раніше вважалося, що CD56 є специфічним маркером ММ, однак нещодавно було виявлено, що 6-9% нормальних плазматичних клітин є CD56+.

Маркери абераційного фенотипу при ММ характеризуються гетерогенністю, тому вони мають прогностичне значення при комплексному оцінюванні. Наприклад, експресію маркера CD27 слід оцінювати разом з маркером CD56. У пацієнтів з ММ та CD27- або CD27-/CD56+ спостерігається нижча загальна виживаність, ніж в осіб з іншими комбінаціями маркерів CD27 та CD56 (Н.Л. Салогуб, 2020).

CD117 – це маркер, який у нормі присутній на всіх В-клітинах (від ранніх попередників до зрілих плазматичних клітин). Однак CD117 експресується у близько 50% хворих на ММ та є маркером сприятливого прогнозу.

Таким чином, плазматичні клітини мають нормальний фенотип, і в межах нормального фенотипу допустимі певні відхилення. Пухлинні клітини при ММ мають абераційний фенотип, і в межах абераційного фенотипу також можливі певні відхилення.

Діагноз множинна мієлома встановлюють на основі результатів морфологічного (вміст плазматичних клітин у кістковому мозку не перевищує 10%, наявні морфологічні ознаки атипії) та фенотипічного (є докази абераційного фенотипу та/або клонально трансформованих плазматичних клітин) дослідження. Результати фенотипування також мають прогностичне значення.

Мінімальна залишкова хвороба при ММ

Важливим незалежним маркером виживаності пацієнтів з ММ є мінімальна резидуальна (залишкова) хвороба (MRD). За цим показником також оцінюють відповідь на хіміотерапію та трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин, проводять моніторинг ефективності лікування. У 2011 р. Міжнародна робоча група з мієломи (IMWG) запровадила такі параметри MRD-негативного статусу:

- імунофенотипічна ремісія, яка підтверджується методом проточної цитометрії;
- молекулярна ремісія, яка підтверджується молекулярно-біологічними методами дослідження.

Згідно з клінічними настановами NCCN щодо ведення пацієнтів з ММ, для оцінювання MRD рекомендоване проведення проточної цитометрії NGF (next generation flow) – високочутливої проточної цитометрії наступного покоління. Це пов'язано з певними особливостями оцінки MRD. Абераційність фенотипу не можна оцінювати за одним маркером, дослідження має бути комплексним, а з одного зразка біологічного матеріалу необхідно визначити сукупну експресію різних маркерів. Для цього використовують широкі панелі маркерів. Крім того, щоб отримати достовірні дані, слід підрахувати достатню кількість клітин. Цитометрія NGF дозволяє дотриматися вищеперелічених умов. Панелі EuroFlow™ NGF були розроблені в різних центрах з урахуванням доступності

клонів специфічних антитіл і кон'югантів флуорохромів, літератури, а також досвіду та знань всіх учасників центру. Лабораторний робочий процес повністю стандартизований від підготовки проб до аналізу даних.

Важливою вимогою до лабораторного аналізу MRD є висока чутливість методу, що дозволяє відрізнити позитивний і негативний статус MRD. Для цього користуються показниками LOD (limit of detection) – найменший рівень величини, який надійно відрізняється від «пустої проби», та LOQ (limit of quantification) – найменший рівень величини, що може бути визначений із заявленою точністю. Величини LOD та LOQ враховують за статичними таблицями для вимірювання рідкісних популяцій Rumke. Відповідно до вимог сучасних протоколів, які стосуються діагностики MRD при ММ, для виявлення подій потрібно подолати поріг чутливості 0,0001. Щоб подолати цей поріг, необхідно нарахувати 3 млн подій, а для того, щоб отримана величина вважалася достовірною, слід подолати поріг LOQ, для якого потрібно нарахувати 5 млн подій. Якщо обсяг MRD менше ніж LOD, то результат MRD-. Якщо обсяг MRD >LOQ, то результат MRD+. Якщо обсяг MRD знаходиться в діапазоні між LOD та LOQ, то результат MRD не видається.

Визначення MRD у пацієнтів, які отримують таргетну терапію

Даратумумаб – анти-CD38 агент, який застосовується для лікування пацієнтів з ММ. CD38 експресується на клітинах ММ. Даратумумаб індукує клітинну цитотоксичність за допомогою різних імуноопосередкованих механізмів, що призводить до лізису CD38+ клітин. Тому ефективність даратумумабу залежить від рівня експресії CD38.



В.В. Конашенкова

Тривале насичення рецепторів CD38 даратумумабом перешкоджає виявленню мієломи методом проточної цитометрії, оскільки у пацієнтів з рефрактерними до даратумумабу захворюваннями всі стандартні моноклональні діагностичні антитіла до CD38 зв'язуються з епітопами, які перекриваються з сайтом зв'язування даратумумабу. Це може заважати виявленню резидуальних CD38+ клітин протягом кількох місяців після останньої інфузії антитіл, що становить діагностичну проблему, особливо в контексті MRD, коли фенотип має важливе значення. Цю проблему було вирішено шляхом створення нових реагентів із важких ланцюгів імуноглобулінів лам і верблюдів (anti-CD38 nano ab, CD38 Rb JK36, CD38 JK36, CD229), що, на відміну від людських і мишачих важких ланцюгів імуноглобулінів, можуть виявити прихований епітоп. Ці антитіла можуть використовуватися у пацієнтів, які отримували терапію даратумумабом.

Таким чином, імунофенотипування методом проточної цитометрії – це важлива діагностична опція у веденні пацієнтів з ММ як на етапі первинного обстеження, так і в процесі терапії для оцінювання ефективності лікування та прогнозу.

Підготувала Ілона Цюпа



Доступна лабораторна діагностика для вирішення клінічних задач у реальній лікарській практиці

-  Система менеджменту якості (TQM)
-  Міжнародні стандарти ISO 9001; ISO 15189
-  Міжнародні системи оцінки якості EQAS і RIQAS (Великобританія і США)
-  Актуальні рішення клінічних задач
-  Клінічна верифікація результатів
-  Термінове повідомлення про критичні показники
-  Індивідуальний професійний консалтинг 0 800 21 96 96, consult@dila.com.ua

- Автоматизована мікробіологія
- Інноваційні методики, передові технології
- Обладнання від світових лідерів: Siemens, Abbott, bioMérieux, Beckman Coulter
- Моніторинг виробничих процесів з матеріалами Randox, BIO-RAD, Siemens
- Інформаційно-сервісна служба ДІЛА: 0 800 21 78 87

www.dila.ua

Система управління якістю сертифікована відповідно до міжнародного стандарту ISO 9001:2015. Сертифікат на відповідність до стандарту ISO 15189:2013. Ліцензія на медичну практику МОЗУ АД № 071280 від 22.11.2012. Авторизаційний сертифікат вищої категорії МОЗУ АД № 014752 від 27.05.2020. Ліцензія на медичну практику МОЗУ АД № 071280 від 22.11.2012.