

Ассоциация лабораторной медицины Санкт-Петербурга
и Ленинградской области

**ДИАГНОСТИКА
ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

Под редакцией профессора В. Л. Эмануэля

*Рекомендовано к печати в качестве учебно-методического пособия
Методическим советом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова
(протокол № 38 от 04.04.2016 г.)*

Санкт-Петербург
СпецЛит
2017

Авторы:

Зуева Екатерина Евгеньевна — доктор медицинских наук, ведущий сотрудник научно-методического центра молекулярной медицины МЗ РФ на базе Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Ariel University, Israel 40700;

Куртова Антонина Владимировна — кандидат биологических наук;

Русанова Екатерина Борисовна — биолог лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, кандидат биологических наук;

Слободняк Константин Юрьевич — аспирант лаборатории сигналинга и клеточного цикла отдела онкологии Института биомедицинских исследований г. Барселона, Испания;

Горгакова Маргарита Валерьевна — биолог лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова;

Голубева Вера Игоревна — биолог лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова;

Салогуб Галина Николаевна — заведующая кафедрой внутренних болезней СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова, врач-гематолог, кандидат медицинских наук, доцент

Рецензент:

Н. Н. Тупицын — доктор медицинских наук, профессор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» (ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»)

Диагностика онкогематологических заболеваний с помощью

Д44 проточной цитометрии / Е. Е. Зуева, А. В. Куртова, Е. Б. Русанова [и др.] ; под ред. В. Л. Эмануэля. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2017. — 327 с.

ISBN 978-5-299-00735-0

В справочнике освещены вопросы современной диагностики онкогематологических заболеваний с помощью многоцветной проточной цитометрии. Каждый раздел проиллюстрирован схемами, клиническими примерами и дополнен развернутыми диагностическими таблицами. Базовые вопросы иммунофенотипирования представлены в приложении к практической диагностике на этапе постановки первичного диагноза, мониторинга эффективности терапии и трансплантации стволовых клеток. Подробно рассмотрены этапы получения биологического материала, его анализа и интерпретации получаемых данных. Справочник проиллюстрирован клиническими примерами и дополнен практическими рекомендациями по иммунологической диагностике. Издание адресовано специалистам КЛД, биологам, терапевтам, гематологам, инфекционистам, пульмонологам, аллергологам-иммунологам и врачам других специальностей.

УДК 616-006.04-07-08

СОДЕРЖАНИЕ

Условные сокращения	4
Предисловие	12
Введение	13
Проточная цитометрия: основные принципы, программное обеспечение	23
Показания к проведению проточной цитометрии	56
Информативность проточной цитометрии для диагностики гемобластозов	64
Диагностика острых лейкозов	98
Диагностика хронических лимфопролиферативных заболеваний	191
Диагностика и мониторинг множественной миеломы (А. В. Куртова, Е. Б. Русанова, Г. Н. Салозуб, Е. Е. Зуева)	220
Минимальная остаточная болезнь (Е. Б. Русанова, М. В. Горгакова, К. Ю. Слободнюк, Е. Е. Зуева)	239
Гемопоэтические стволовые клетки, количественное определение (А. В. Куртова, В. И. Голубева, К. Ю. Слободнюк, Е. Е. Зуева)	258
Приложения	277
Приложение 1. Практикум по проточной цитометрии	277
Приложение 2. Обеспечение качественной работы цитометра ..	299
Приложение 3. Некоторые производители проточных цитометров ..	304
Диагностические задачи по иммунофенотипированию в онкогематологии	305
Литература	314

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

Аг	— антиген
АКЛ	— анапластическая крупноклеточная лимфома
аллоТКМ	— аллогенная трансплантация клеток костного мозга
аутоТКМ	— аутологичная трансплантация клеток костного мозга
БГЛ	— большие гранулярные лимфоциты
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ВКЛ	— волосатоклеточный лейкоз
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
В-ОЛЛ	— острый лимфобластный лейкоз/лимфома из В-клеток-предшественников
ВПЛЛ	— В-клеточная пролимфоцитарная лимфома
В-ХЛЛ	— В-клеточный хронический лимфолейкоз
В-ХЛПЗ	— хроническое лимфопролиферативное заболевание В-клеточного происхождения
ВЭБ	— вирус Эпштейна — Барр
ГКС	— главный комплекс гистосовместимости
Г-КСФ	— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГСК	— гемопозитические стволовые клетки
ДВС	— диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ДВККЛ	— диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома
ДНК (DNA)	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГ (Ig)	— иммуноглобулин
ИГХ	— иммуногистохимия
ИФ	— интенсивность флюоресценции
ИФТ	— иммунофенотипирование
ИЦХ	— иммуноцитохимия
К ₂ ЭДТА (К ₃ ЭДТА)	— калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
КВ	— коэффициент вариации
КМ	— костный мозг
КТ	— компьютерная томография
ЛБ	— лимфома Беркитта
ЛБГЛ	— лимфома из больших гранулярных лимфоцитов
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛМЗ	— лимфома маргинальной зоны
ЛПЗ	— лимфопролиферативное заболевание
ЛПЛ	— лимфоплазмоцитарная лимфома

МБ	— моноклональный белок
МГНЗ	— моноклональная гаммапатия неопределенного значения
МДС	— миелодиспластический синдром
МЕ	— международная единица
МКАТ	— моноклональное антитело
МКЛ	— мантийноклеточная лимфома
ММ	— множественная миелома
МНК	— моноклеары
МОБ	— минимальная остаточная болезнь
МПО	— миелопероксидаза
НК	— натуральные киллеры
НХЛ	— неходжкинская лимфома
ОВ	— общая выживаемость
ОЛ	— острый лейкоз
ОЛЛ	— острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ	— острый миелоидный лейкоз
ОНЛЛ	— острый нелимфобластный лейкоз
ОПЛ	— острый промиелоцитарный лейкоз
ОРВИ	— острая респираторно-вирусная инфекция
ПК	— плазматические клетки
ПЛЛ	— пролимфоцитарный лейкоз
ПНГ	— пароксизмальная ночная гемоглобинурия
ПОХ	— пероксидаза хрена
ПР	— полная ремиссия
ПХТ	— полихимиотерапия
ПЦ	— проточная цитометрия
ПЦР (PCR)	— полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	— полимеразная цепная реакция в реальном времени
РА	— рефрактерная анемия
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РТПХ	— реакция трансплантата против хозяина
СИФ	— средняя интенсивность флюоресценции
СПИД	— синдром приобретенного иммунодефицита
СРБ	— С-реактивный белок
Т/НК ХЛЛ	— хронический лимфоцитарный лейкоз Т/НК-клеточного происхождения
Т/НК ХЛПЗ	— хроническое лимфопролиферативное заболевание Т/НК-клеточного происхождения
ТБГЛ	— Т-клеточная лимфома из больших гранулярных лимфоцитов
ТГСК	— трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ТКМ	— трансплантация костного мозга
Т-НХЛ	— неходжкинская лимфома Т-клеточного происхождения

Т-ОЛЛ	— острый лимфобластный лейкоз/лимфома из Т-клеток-предшественников
Т-ПЛЛ	— Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз
Т-ХЛЛ	— Т-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз
Т-ХЛПЗ	— Т-клеточное хроническое лимфопролиферативное заболевание
УЗИ	— ультразвуковое исследование
УФ	— ультрафиолетовый
ФАБ	— Франко-американо-британская классификация
ФЛ	— фолликулярная лимфома
ФСБ	— фосфатно-солевой буфер
ХМЛ	— хронический миелолейкоз
ХМЛ-БК	— бластный криз хронического миелолейкоза
ХММЛ	— хронический миеломоноцитарный лейкоз
ХТ	— химиотерапия
ЦНС	— центральная нервная система
ЧР	— частичная ремиссия
ШИК	— реакция с шифф-йодной кислотой
ЭМП	— экстрамедуллярное поражение
ЯСК	— ядросодержащие клетки
7-ААД	— 7-аминоактиномицин D
AF4-MLL	— транслокация t(4;11) с образованием химерного гена AF4-MLL
AFF1-MLL	— транслокация t(4;11) с образованием химерного гена AFF1-MLL
AML1	— протеин 1 острых миелобластных лейкозов (ген RUNX1)
AML1/ETO	— транслокация с хромосомы 8 на хромосому 21 с формированием слитого гена AML1/ETO
AOR-STG	— американский онкологический ресурс группы по изучению стволовых клеток (American Oncology Resources Stem Cell Group)
АРС	— аллофикоцианин (allophycocyanin)
API2-MALT1*	— транслокация с хромосомы 11 на хромосому 18, приводящая к формированию слитого гена API2-MALT1
ВС	— Бекман Культер (Beckman Coulter)
BCR-ABL	— гибридный белок, продукт гибридного гена BCR-ABL1, формирующегося в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22 (филадельфийская хромосома)
BCR-ABL1	— транслокация с хромосомы 9 на хромосому 22, приводящая к формированию слитого гена BCR-ABL и продукции соответствующего белка

BD	– Бектон Дикинсон (Becton Dickinson)
BEST	– Рабочая группа по обеспечению безошибочного переливания крови (Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party)
CALLA-антиген	– общий антиген острого лимфобластного лейкоза (common acute lymphoblastic leukemia antigen)
CBF α	– альфа-субъединица комплекса (белок Aml1), осуществляет связь с ДНК
CBF β	– бета-субъединица усиливает аффинность альфа-субъединицы
CBF	– фактор транскрипции, ДНК-связывающий белковый комплекс
CBF β /MYH11	– транслокация с хромосомы 11 на хромосому 18, приводящая к формированию слитого гена CBF β /MYH11
CCND1	– ген циклина D1
CCND1/BCL1	– транслокация с хромосомы 11 на хромосому 14, приводящая к формированию слитого гена CCND1/BCL1 и соответствующего белка
CD	– кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
CDKN2A	– ингибитор 2A циклин зависимой киназы (cyclin dependent kinase inhibitor 2A)
C-MYC	– протоонкоген, кодирующий белок Мус (фактор транскрипции)
CXCR	– хемокиновый рецептор
Cy3	– цианин, соединенный с флюорофором в третьем положении (Cyanine3 fluorophore)
Cy5	– цианин, соединенный с флюорофором в пятом положении (Cyanine5 Fluorophore)
cyIgM	– цитоплазматический иммуноглобулин М
суMPO	– цитоплазматическая миелопероксидаза
DAPI	– 4,6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорид
DEK/CAN	– транслокация t(6;9) с образованием химерного гена DEK-CAN
E2A-PBX1	– транслокация с хромосомы 1 на хромосому 19, приводящая к формированию слитого гена E2A-PBX1 с продукцией соответствующего белка
EBFP	– усиленный голубой флюоресцентный белок (Enhanced Blue Fluorescent Protein)
ECD	– конъюгат фикоэритрина с техасским красным (phycoerythrin-Texas Red conjugate (energy coupled dye))
ESFP	– усиленный синий флюоресцентный белок (Enhanced Cyan Fluorescent Protein)

EGIL	– Европейская группа по иммунологической классификации лейкозов (European Group for the Immunological classification of Leukemias)
ETO (eight twenty one)	– ген на хромосоме 8, принимающий участие в транслокации t(8;21)(q22;q22)
ETV6-RUNX1	– транслокация t(12;21) с образованием химерного гена ETV6-RUNX1
EWGCCA	– Европейская рабочая группа клинического клеточного анализа (European Working Group on Clinical Cell Analysis)
EYFP	– усиленный желтый флюоресцентный белок (Enhanced Yellow Fluorescent Protein)
FACS fcs	– флюоресцентно активированный сортинг клеток – стандартный формат данных цитометрии (Flow Cytometry Standart)
FISH	– флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i>
FITC	– флюоресцеин изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)
FL	– детектор флюоресценции
FLT3/ITD	– внутренний тандемный повтор FLT3
FSC	– прямое светорассеяние
GlyA	– гликофорин А
HLA	– человеческий лейкоцитарный антиген
HLA-DR	– антигены тканевой совместимости второго класса, локус DR (Human Leukocyte antigens)
HTLV-1	– Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых
IgH	– тяжелая цепь иммуноглобулина
IgH-C-MYC	– слитный ген, сформировавшийся при слиянии гена тяжелой цепи иммуноглобулина и C-MYC
IGK/MYC	– транслокация с хромосомы 2 на хромосому 8, приводящая к формированию слитого гена IGK/MYC
IgVH	– вариабельный фрагмент гена тяжелой цепи иммуноглобулина
ISCN	– Международная система номенклатуры в цитогенетике (International System of Cytogenetic Nomenclature)
ISHAGE	– Международное общество генотерапии и разработки трансплантата (International Society of Hemotherapy and Graft Engineering)
ITD	– внутренний тандемный повтор (internal tandem duplicate)

MALT	– лимфоидные скопления, ассоциированные со слизистой
MALT1-IgH	– транслокация с хромосомы 11 на хромосому 18, приводящая к формированию слитого гена MALT1-IgH
MFI	– средняя интенсивность флюоресценции (mean fluorescence intensity)
MIFlowCyt	– минимально необходимая информации в ПЦ (Minimum Information about a Flow Cytometry Experiment)
MLL	– острый лейкоз из клеток-предшественников, дающих начало разным линиям гемопоэза (mixed lineage leukemia)
MLL/ENL	– белок, продукт слитного гена MLL/ENL (ген MLL – ген миелоидно-лимфоидного лейкоза или лейкоза смешанной линейности, ENL – белок, кодируемый геном MLLT1)
MLL-AF4	– перестройка гена MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia) с геном-партнером AF4
MPO	– миелопероксидаза (myeloperoxidase)
MYC/IGH	– транслокация с хромосомы 8 на хромосому 14, приводящая к формированию слитого гена MYC/IGH
MYC/IGL	– транслокация с хромосомы 11 на хромосому 18, приводящая к формированию слитого гена MYC/IGL
NAD	– краситель для выявления нуклеиновой кислоты (nucleic acid dye)
НК-клетки	– натуральные киллеры (natural killers)
NPM-ALK	– транслокация t(2;5) с образованием химерного гена NPM-ALK
NPM-RAR α	– транслокация t(5;17) с образованием химерного гена NPM-RAR α
NUMA1-RAR α	– транслокация t(11;17) с образованием химерного гена NUMA1-RAR α
PAS-реакция	– реакция с периодной кислотой (periodic acid reaction)
PAX5	– транскрипционный фактор коммитирования лимфоидной линии
PAX5/IGH	– транслокация с хромосомы 9 на хромосому 14, приводящая к формированию слитого гена PAX5/IGH и соответствующего белка
PBX-1	– ген пре-B-клеточного лейкоза
PC-5	– фикоэритрин цианин 5
PC-7	– фикоэритрин цианин 7
PE	– фикоэритрин (phycoerythrin)

PerCP	— перидинин хлорофилл (peridinin chlorophyll)
PE-tandem	— тандемные фикоэритрин-содержащие флюорохромы
PI	— пропидия йодид (propidium iodide)
PLZF-RAR α	— транслокация t(11;17) с образованием химерного гена PLZF-RAR α
PML	— промиелоцитарный лейкоз
PML-RAR α	— транслокация с хромосомы 15 на хромосому 17 с формированием слитого гена PML-RAR α
PTD	— частичное тандемное удвоение (partial tandem duplication)
RAR α	— α -рецептор ретиноевой кислоты
RPMI	— среда для культивирования клеток и тканей <i>in vitro</i>
RUNX1	— ген, принадлежащий к семейству runt (runt-related gene family)
sIgM	— поверхностный иммуноглобулин М
SCF	— фактор стромальных клеток (stromal cell factor)
SIHON	— Общество онкологов-гематологов Нидерландов по иммунофенотипированию (Stichting Immunophenotyping Hematologische Oncologie Nederland)
SIL-TAL1	— делеция 1p32 с образованием химерного гена SIL-TAL1
SMMHC	— ген тяжелой цепи миозина гладких мышц (smooth muscle myosin heavy chain)
SPE	— электрофорез белков сыворотки
SSC	— боковое светорассеяние
SYTO	— коммерческое название группы красителей blue nucleic acid dye
TAL1	— белок острого лимфобластного лейкоза из Т-клеток (T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia Protein)
TCF-PBX1	— транслокация t(1;19) с образованием химерного гена TCF-PBX1
TCR	— Т-клеточный рецептор
TdT	— терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза
TEL-AML1	— транслокация с хромосомы 12 на хромосому 2, приводящая к появлению слитого гена TEL-AML1 с продукцией соответствующего белка
TLGL	— Т-клеточная лимфома из больших гранулярных лимфоцитов
ZAP-70	— zeta-цепь ассоциированный протеин 70 (zet chain associated protein 70)
ZBTB16	— RAR α транслокация t(11;17) с образованием химерного гена ZBTB16- RAR α

*С бесконечной благодарностью и любовью моим
маме и папе — Тамаре и Евгению Зуевым,
моим волшебным детям Дине и Мите Смирновым,
моим братикам Андрею, Максиму, Диме и Косте*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Бурное развитие лабораторных технологий по оценке свойств и состава биологических материалов является одним из оснований смены парадигмы: «*Medicina ars nobilissima*» (Медицина — высочайшее из искусств) на позицию, высказанную терапевтом Ослером: «Медицина — это наука неопределенности и искусство вероятности», поскольку именно лабораторная диагностика благодаря своей объективности и информативности позволяет уменьшить клиническую неопределенность и обеспечить правильность диагностики заболеваний.

Лабораторная медицина является трансляционной и формирует базу для доказательной и персонифицированной медицины, обеспечивающей оказание высокотехнологичных видов медицинской помощи. В ряду таких информативных лабораторных технологий все большее применение получает метод проточной цитометрии, без которого сегодня невозможно существование онкогематологии, трансплантологии, да и принятие клинических решений по большому числу заболеваний, требующих коррекции иммунологической реактивности организма.

Представляя читателям пособие для врачей различных клинических специальностей по применению проточной цитометрии, подготовленное в коллективе, руководимом доктором медицинских наук Е. Е. Зуевой, выражаем надежду, что материал пособия будет способствовать внедрению этой технологии в практику медицинских учреждений и повышению квалификации медицинского персонала.

В. Л. Эмануэль, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, вице-президент Российской Ассоциации медицинской лабораторной диагностики и Федерации лабораторной медицины, главный специалист по клинической лабораторной диагностике МЗ РФ и Росздравнадзора по Северо-Западному Федеральному округу, академик Российской метрологической академии, д. м. н., профессор

ВВЕДЕНИЕ

Имунофенотипирование (ИФТ) представляет собой способ определения фенотипа клеток, в основе которого лежит классический принцип «антиген — антитело». На сегодняшний день определение фенотипа клеток — как циркулирующих в крови, так и входящих в состав сложных тканей, не составляет особого труда. Специфические антитела могут быть получены практически к любому белку (или его фрагменту) с установленной аминокислотной последовательностью или к нуклеотидной последовательности соответствующей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), т. е. к поверхностным и внутриклеточным маркерам. Возможности традиционной проточной цитометрии (ПЦ) позволяют выявлять и количественно оценивать поверхностные и внутриклеточные антигены клетки, определять плоидность ДНК и уровень функциональной активности клетки (рис. 1).

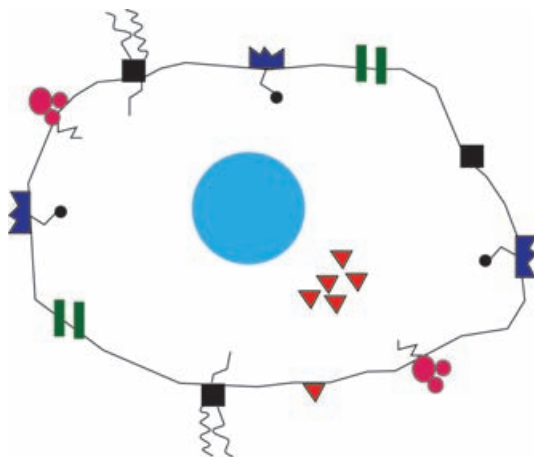


Рис. 1. Типы антигенов клетки. ИФТ позволяет выявлять маркеры на мембране клетки (поверхностные или мембранные), в цитоплазме (внутриклеточные или цитоплазматические) и в ядре (ядерные), а также определять плоидность, хромосомный состав и функциональную активность клеток

ИФТ применяют в клинической медицине по трем основным направлениям:

1. Диагностика:

- острых лейкозов (ОЛ);
- хронических лимфопролиферативных заболеваний;
- злокачественных новообразований;

— первичных и, в некоторых случаях, вторичных иммунодефицитов;

— минимальной остаточной болезни (МОБ).

2. Мониторинг:

— состояния иммунной системы и ответа на иммунотерапию;

— эффективности химиотерапии:

онкологических и онкогематологических заболеваний;

инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)

и другими вирусами;

— при динамическом наблюдении реакции трансплантата против хозяина (РТПХ) и восстановления иммунной системы после трансплантации костного мозга (ТКМ).

3. Учет малоклеточных популяций, в том числе количественное определение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) периферической крови, костного мозга (КМ), пуповинной крови и клеток другого происхождения.

Классическими работами А. Н. Coons, L. A. Sternberg (1979) и Р. Brandtzaeg [et al.] (1997) были заложены два основных направления развития ИФТ: использование флюоресцентной и нефлюоресцентной меток для выявления целевого антигена. Для количественного определения популяционного состава клеток крови и их функциональных особенностей, для идентификации опухолевых клеток в биологическом материале разработаны различные варианты ИФТ. Некоторые из них имеют уже сугубо историческое значение, и применение их на практике может быть объяснено только данью традиции, но не современными требованиями клиники в области диагностики и мониторинга патологических состояний. К ним относятся:

— метод розеткообразования, основанный на сродстве определенных антигенов клеточной поверхности лимфоцитов человека и гликопротеинов мембраны эритроцитов барана;

— лимфоцитотоксический тест, основанный на образовании на поверхностной мембране лимфоцита комплекса «антиген — анти-тело», активирующего комплемент с последующим повреждением мембраны и лимфоцитоллизом, выявляемым методом суправитального окрашивания.

Оба метода предназначены для оценки только нормальных лимфоцитов периферической крови *ex tempore*, не могут быть полностью стандартизированы, учет результатов достаточно субъективен и в значительной мере зависит от опыта исследователя. Перечисленные особенности ограничивают диагностические возможности использующих их лабораторий, не позволяя оценивать трансформированные клетки и малоклеточные популяции.

Другие варианты ИФТ, основанные на способности рецепторов взаимодействовать со специфическими антителами с образованием стабильных комплексов на поверхностной мембране клетки, достаточно широко применяются современной диагностической службой, так как максимально адаптированы для практических целей. К ним относятся:

- иммуноцитохимический метод, в том числе
 - иммуноцитохимия (ИЦХ) с оценкой результатов методами световой микроскопии;
 - прямая и непрямая иммунофлюоресценция с оценкой результатов методом люминесцентной микроскопии;
- иммуногистохимия (ИГХ);
- ПЦ.

Однако не только в клинически сложных случаях, но и в повседневной диагностике онкогематологических заболеваний микроскопия все чаще уступает место ПЦ. Это связано с необходимостью быстро получать достаточный объем фактических данных, с тем чтобы основные усилия врача были отданы интерпретации результатов, а не их получению (табл. 1).

Таблица 1

Сопоставление методов ИФТ

Характеристика	Розетко-образование	Лимфоцитотоксический тест	Иммуноцитохимия	Проточная цитометрия
Чувствительность	–	+	++	+++
Воспроизводимость результатов	–	–	++	+++
Низкая себестоимость	+	++	+	–
Универсальность	–	–	++	+++
Возможность автоматизации	–	–	+	+
Высокие требования к оборудованию	–	–	–	++
Биологическая безопасность	–	+	+	+
Возможность диагностики онкогематологических заболеваний	–	–	+	+++
Возможность мониторинга онкогематологических заболеваний	–	–	–	+++

Примечание: «–» — низкая/отсутствует; «+» — умеренная; «+++» — выраженная; «++++» — очень высокая.

Вне зависимости от способа учета результатов (световая, люминесцентная, конфокальная, электронная микроскопия, ПЦ) при ИФТ применяют моноклональные или поликлональные антитела, конъюгированные с меткой. Соединенные с меткой, или меченые, антитела, образующие нерастворимый комплекс с антигеном клетки, создают возможность ее идентификации:

– прямой метод: антитела напрямую конъюгированы с флюоресцентной меткой, а окрашивание клеток осуществляют за один этап (прямая иммунофлюоресценция);

– непрямой метод: первичные антитела не мечены, и для выявления образовавшегося комплекса «антиген – диагностическое антитело» вносят дополнительные, вторичные антитела, специфичные по отношению к первым (диагностическим) антителам и конъюгированные с меткой (флюорохромом) (непрямая иммунофлюоресценция). В качестве метки используют различные вещества, особенности которых определяют способ их выявления и учета (табл. 2).

Таблица 2

Типы меток и их особенности

Тип меток	Особенности практического использования	Качество выявления антигенов клеток крови	Удобство практического применения
Флюорохромы	Нестабильные препараты. Необходимо специальное оборудование и помещение. Затруднено сопоставление с морфологией	+++	+/-
Ферменты	Наличие эндогенных ферментов	++	++
Металлы	Высокая стоимость каждого исследования при относительно небольшом объеме информации	+++	-
Металлопротеины	Электронная микроскопия	+	-
Радиоизотопы	Наукоемкие исследования. Трудность обеспечения биологической безопасности	++	-

Примечание: «-» – низкое/отсутствует; «+» – умеренное; «+++» – выраженное; «++++» – очень высокое.

Причины широкого применения ИЦХ с различными вариантами визуализации метки очевидны: большой выбор качественных реагентов, простота реализации и обучения персонала навыкам учета результатов, а при световой микроскопии — возможность сопоставления с морфологией, хранения и транспортировки препаратов, отсутствие необходимости использовать специализированное оборудование. Недостатками являются субъективность визуальной оценки, трудность организации контроля качества, невозможность учета большого количества клеток и, как следствие, вероятность неадекватной оценки малоклеточных популяций (активированных клеток, бластов при МОБ, ГСК). Визуальный учет результатов ограничивает количество исследований, проводимых в условиях современной гематологической клиники. На практике использование световой микроскопии для учета результатов иммуноцитохимического метода более удобно для исследований в области диагностической онкогематологии по сравнению с люминесценцией, так как дает возможность отсроченного учета, контроля качества и удаленного консультирования препаратов (цитологические и/или гистологические препараты пациента в диагностически трудных случаях могут быть направлены для дополнительной оценки, консультирования в другой медицинский центр, например более высокого уровня). В световой ИЦХ используют различные ферменты и соответствующие им хромогены. Топография окрашенных нерастворимых конечных продуктов ферментативной реакции определяется классическими гистохимическими методами. Так, начиная с работ S. Avrameas [et al.] (1966) и P. K. Nakane [et al.] (1967), применяют фермент пероксидазу хрена (ПОХ), в качестве субстрата ПОХ чаще всего используют диаминобензидин, при окислении полимеризующийся и приобретающий коричневую окраску, хорошо контрастирующий с клетками, докрашенными гематоксилином. Для активного выявления диаминобензидина при необходимости могут быть использованы осмий, хлорид никеля или хрома, имидазол, азотнокислое серебро, железистый ферроцианид и другие, что позволяет значительно повысить чувствительность метода. В целом спектр ферментов и соответствующих им субстратов, применяемых на современном этапе ИЦХ, очень широк и включает: для ПОХ — диаминобензидин, 3-амино-9-этилкарбозол, тетраметилбензидин, дигидрохлорид бензидина, 4-хлор-1-нафтол, для щелочной фосфатазы — прочный синий РР (диазониевая соль 4-бензил-2,5-метоксианилина), нафтол-AS-MX-ацетат (сложный эфир уксусной кислоты и 3-гидрокси-2-нафто-2',4'-ксилидида) нитросиний тетразолий, новый фуксин и т. д. Преимуществом продуктов реакции, основанной на бензидине, является их стабильность во времени и нерастворимость в органических растворителях, но практика его ис-

пользования требует соблюдения определенных мер безопасности. Аналогом диаминобензидина является 3-амино-9-этилкарбозол, способность которого диссоциировать в органических растворителях позволяет использовать для заключения препаратов водорастворимые среды. Это обстоятельство в практике лабораторной службы может быть расценено как положительный фактор, так как значительно сокращает общее время подготовки препарата к учету. С другой стороны, использование 3-амино-9-этилкарбозола исключает длительное, архивное хранение препаратов, создание библиотеки микроскопических препаратов диагностически сложных случаев. Применение высокочувствительного хромогена тетраметилбензидина в ИЦХ ограничено возможностью его кристаллизации на цитологических препаратах и срезах тканей. Хромогены дигидрохлорид бензидина и 4-хлор-1-нафтол дают синий продукт реакции, что может быть использовано в двойном окрашивании, однако двойное окрашивание иммуноцитохимическим методом является довольно трудоемким процессом и редко применяется в диагностических лабораториях. Преимущества использования щелочной фосфатазы в качестве метки связаны с отсутствием этого фермента в морфологически зрелых клетках крови. В результате реакции со щелочной фосфатазой отсутствует неспецифическое фоновое окрашивание, обусловленное наличием эндогенных ферментов, проявляется высокая чувствительность метода для определения единичных положительных клеток в мазках. Однако гистохимический этап выявления данного фермента более трудоемок по сравнению с выявлением ПОХ.

Идея использования ферментов, отсутствующих в тканях млекопитающих и исключающих проблемы эндогенного окрашивания, реализована на примере глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* и β -галактозидазы, однако небольшой выбор хромогенов и высокая требовательность к условиям проведения реакции не способствуют их применению в повседневной клинической практике.

У каждого из упомянутых ферментов и их субстратов есть не только преимущества, но и недостатки, ограничивающие их использование. К самым серьезным недостаткам относятся наличие аналогичных эндогенных ферментов, зависимость результатов (чувствительности) от концентрации первых или вторых антител, субъективность учета результатов, ограниченность времени анализа препаратов и др.

Таким образом, выбор иммуноцитохимического метода для визуализации антигенов лейкоцитов не так уж очевиден. Единственным положением, не вызывающим сомнений, является предпочтение ПОХ для диагностической ИЦХ.

Биологическими материалами для иммуноцитохимических исследований являются мазки, отпечатки, тонкоигольная биопсия, центрифуги-

гаты клеточных суспензий. Для успешного проведения иммуноцитохимического анализа необходимы сохранность антигена (необходимость фиксации клеток), специфичность окрашивания (использование качественных реагентов) и удобная для визуализации метка, позволяющая проводить учет результатов. На сегодняшний день разработана методическая база, позволяющая воспроизвести практически любой метод ИЦХ в исследовательской работе, но ее недостаточно для применения в клинической диагностике и мониторинге онкогематологических заболеваний. Обратной стороной доступности различных методов ИЦХ оказалось отсутствие критериев выбора оптимального подхода, способного обеспечить надежность результатов в условиях конкретной диагностической лаборатории. И более того, отсутствие системы контроля качества проведения методики и учета ее результатов лишает нас возможности сопоставлять данные, полученные при длительном наблюдении за пациентом в разных медицинских учреждениях.

ИГХ представляет собой огромную область знаний, описание которой не входит в задачи данного пособия. Тем не менее необходимо отметить, что значимым преимуществом ИГХ является не только возможность ретроспективной оценки образца, но и возможность непосредственного сопоставления экспрессии маркера с морфологией конкретной клетки/ткани. Ограничения ИГХ связаны только с техническими трудностями в силу ограниченного выбора антител, применимых в ИГХ, и сложностями выявления внутриклеточных маркеров, в настоящее время и те и другие преодолены. Нерешенными пока остаются проблемы, связанные с мониторингом эффективности терапии (табл. 3) (Sun T., 2008).

Таблица 3

Сопоставление ИГХ и ПЦ

Характеристики	Иммуногистохимия	Проточная цитометрия
Сопоставление с морфологией	Оптимально	Относительно
Стоимость оборудования	Более низкая	Высокая, возможно применение дополнительных устройств
Требования к образцам	Парафиновые блоки и замороженный материал	Периферическая кровь, КМ, жидкости организма, аспираты, тонкоигольная биопсия, свежий материал солидных тканей
Спектр доступных антител	Ограничен, но постоянно расширяется	Неограниченный
Двойное окрашивание одной клетки	Ограниченно	5—6-цветное окрашивание

Характеристики	Иммуногистохимия	Проточная цитометрия
Разделение поверхностного и внутриклеточного окрашивания	Трудоемкое	Простое
Время пробоподготовки и получения результатов	Не менее 4 ч после оценки срезов, окрашенных гематоксилином и эозином	2–3 ч

Таким образом, к основным методическим направлениям ИФТ относятся световая и люминесцентная ИЦХ, ИГХ и ПЦ (рис. 2).

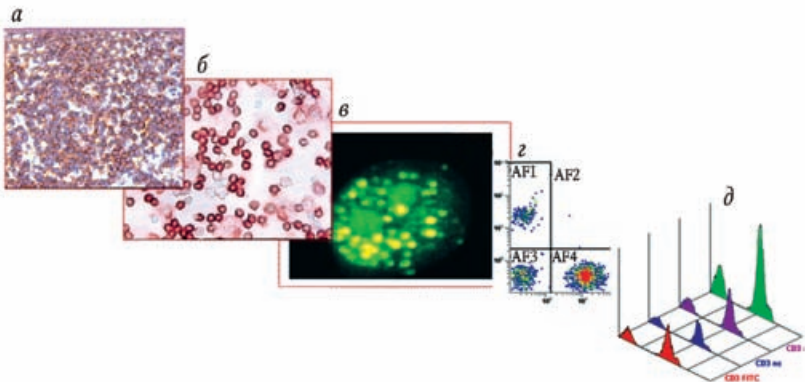


Рис. 2. Основные методические направления ИФТ. Результаты ИФТ могут быть визуализированы, зарегистрированы и оценены с помощью световой, люминесцентной и электронной микроскопии и ПЦ, в том числе с помощью цифровой обработки данных:

a – микроскопия иммуноцитохимической оценки экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45 мононуклеарными клетками костного мозга; *б* – микроскопия иммуноцитохимической оценки экспрессии Т-клеточного маркера CD3 мононуклеарными клетками костного мозга; *в* – микроскопия иммунофлюоресцентной оценки внутриклеточных структур; *г* – дотплот данных проточной цитометрии; *д* – сопоставление интенсивности экспрессии маркеров в серии препаратов

Диагностические возможности ИФТ во многом определяются огромным разнообразием доступных моноклональных антител. Для выявления клеток и уточнения их функционального состояния в качестве антигенов используют собственный рецепторный аппарат клетки,

ДИАГНОСТИКА ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Редактор *Капполь О. С.*
Корректор *Терентьева А. Н.*
Компьютерная верстка *Габерган Е. С.*

Подписано в печать 10.04.2017. Формат 60 × 88 ¹/₁₆.

Печ. л. 20,5

Тираж 1000 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».
190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15
Тел./факс: (812) 495-36-12, 495-36-09
<http://www.speclit.spb.ru>

Отпечатано в типографии «L-PRINT»,
192007, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 201, лит. А, пом. 3Н