

## **Стандартизация молекулярной диагностики ХМЛ**

Е.В. Аксенова, А.А. Крутов, И.Н. Солдатова, Т.В. Ахлынина, Н.А. Лапшина, А.В. Мисюрин

ГУ РАМН «Гематологический научный центр РАМН»

**Реферат.** Метод ПЦР в реальном времени позволяет осуществлять молекулярный мониторинг хронического миелолейкоза, что является обязательным при современной оценке ответа на терапию. Методологические различия применяемого метода затрудняют участие лабораторий в совместных клинических и научных исследованиях, адекватную сравнимую интерпретацию получаемых результатов. Существует несколько подходов к стандартизации метода. Переход на международную шкалу (IS), который осуществляется путем обмена образцами и вычисления фактора конверсии для каждой лаборатории, признан наиболее универсальным инструментом стандартизации. Лаборатория генной инженерии ГНЦ является референсной в России, применяемый в ней метод молекулярной диагностики стандартизован по международной шкале. Получены первые результаты по стандартизации других российских лабораторий.

**Ключевые слова:** Хронический миелолейкоз, молекулярный мониторинг, стандартизация, международная шкала (IS), *BCR-ABL*.

## **Standardisation of molecular diagnostics for CML**

E.V. Aksenova, A.A. Krutov, I.N. Soldatova, T.V. Akhlynina, N.A. Lapshina, A.V. Misyurin

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

**Summary.** Real Time PCR enables an adequate molecular monitoring of the chronic myeloid leukemia (CML) without which in the case of this disease it is impossible to thoroughly evaluate therapy response especially when modern target inhibitory molecules involved. Unfortunately, discrepancy and methodological deviations of the results obtained by different researches hinder a proper involvement of different labs and clinics into international research protocols and makes it impossible to compare the data obtained. In this paper we discuss the different approaches to standardize Real Time PCR technique and stress the significance of the international effort to incorporate International Scale (IS) into *BCR-ABL* gene expression monitoring of CML as well as a great importance of the regular sample exchange between participating labs and necessity of the calculation of individual conversion factor (CF) for each lab involved. Nowadays CF is the only way to turn the data collected from different labs into the universal and comprehensive IS scale. The Lab for Genetic Engineering of Research Center for Hematology (Moscow) is the only one in Russia that successfully fulfilled all necessary steps of standardization procedure and obtained a position of the national reference lab for Russia. We report here the preliminary results of the Russian program of *BCR-ABL* Real Time PCR standardization that has been started under our supervision.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia, molecular monitoring, standardization, International Scale, *BCR-ABL*

[e.aletris@gmail.com](mailto:e.aletris@gmail.com)

## Введение

Основным методом молекулярной диагностики и молекулярного мониторинга хронического миелолейкоза является количественное определение экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* методом ПЦР в реальном времени. Молекулярный мониторинг *BCR-ABL* приобрел важнейшее значение с появлением лекарств – ингибиторов тирозинкиназ, первым из которых явился иматиниб, поскольку при этой терапии у пациентов достаточно быстро достигается полный цитогенетический ответ, и дальнейшее отслеживание динамики опухолевого клона цитогенетическими методами становится невозможным. Современная концепция лечения ХМЛ включает обязательную оценку молекулярного ответа [1,2].

Методика ПЦР в реальном времени была предложена более 10 лет назад, и существует множество вариаций этого исследования [3]. Основные этапы анализа экспрессии химерных онкогенов включают выделение тотальной РНК из периферической крови или костного мозга, проведение реакции обратной транскрипции с получением к-ДНК и реакцию ПЦР в реальном времени. Реакция ПЦР в реальном времени основана на использовании специфических олигонуклеотидных последовательностей - прямого и обратного праймеров и флуоресцентного зонда, которые комплементарны последовательности к-ДНК изучаемого гена. По уровню флуоресцентного сигнала, продуцируемого в ходе реакции, можно судить о количестве копий гена в исходной матрице. Для определения экспрессии *BCR-ABL* вычисляется не только число копий химерного гена, но и число копий контрольного гена или гена сравнения. Экспрессия *BCR-ABL* представляется как отношение числа копий *BCR-ABL* к числу копий контрольного гена в образце, выраженное в процентах или умноженное на коэффициент  $10^n$

В лабораториях могут использоваться разные методики детекции флуоресцентного сигнала, приборы для амплификации, праймеры и зонды, ферменты для проведения обратной транскрипции, протоколы анализа и способы вычисления количества копий генов [4]. Наиболее существенным фактором, вносящим различия в значения относительной экспрессии *BCR-ABL*, является использование различных контрольных генов. Нормализация результатов экспрессии *BCR-ABL* по значениям контрольного гена

позволяет компенсировать вариации в количестве РНК в каждой реакции и различия в эффективности реакции обратной транскрипции. Кроме того, по количеству копий контрольного гена можно судить о качестве исходного генетического материала и отсеивать образцы с низким содержанием РНК.

В идеале, контрольный ген должен одинаково экспрессироваться в клетках различных типов, экспрессия его должна быть сходна с экспрессией *BCR-ABL* у первичных пациентов ХМЛ, на нее не должны влиять терапевтические воздействия [4]. Наиболее широко в настоящее время используются гены *ABL*, *BCR*, *GUSB* и  $\beta 2m$  ( $\beta 2$ -микроглобулина), каждый из которых соответствует предъявляемым требованиям лишь отчасти. При использовании гена *ABL* возникает проблема занижения уровня реальной экспрессии для высоких значений *BCR-ABL*, вызванная тем, что амплифицируется не только сам контрольный ген, но и часть *ABL*, входящая в состав химерного гена. Относительная экспрессия *BCR-ABL* выражается как  $BCR-ABL/ABL \times 100\%$ , при этом значение знаменателя складывается из двух частей – число копий самого гена *ABL* и число копий *ABL*, включенного в *BCR-ABL* как фрагмент слитого гена. Таким образом, в действительности формула выглядит как  $BCR-ABL/(ABL + BCR-ABL) \times 100\%$ , при низких значениях *BCR-ABL* дополнительное слагаемое в знаменателе изменяет общее значение экспрессии незначительно, а при высоких значениях *BCR-ABL* знаменатель существенно увеличивается, а общее значение экспрессии соответственно занижается. Для тест-систем с геном *BCR* в качестве контрольного тоже характерно нелинейное изменение экспрессии на высоких уровнях, но здесь наблюдается завышение значений, поскольку нормальные клетки имеют два транскрипционно активных аллеля этого гена, а клетки с химерным *BCR-ABL* - только один аллель. Ген  $\beta 2m$  экспрессируется на уровне примерно на два порядка выше, чем *ABL* и *GUSB* [5], но при этом было показано, что при его использовании можно детектировать изменения экспрессии *BCR-ABL* в гораздо более широком диапазоне значений, что позволяет точнее отслеживать динамику изменения экспрессии при терапии ХМЛ [6].

После нескольких лет использования технологии ПЦР в реальном времени для определения экспрессии *BCR-ABL* возник вопрос о сравнении результатов, получаемых в разных лабораториях, о выработке общих подходов к оценке результатов молекулярного анализа. Методологические различия не позволяли оценить вклад молекулярной диагностики в процесс клинического мониторинга заболевания и выработать общие руководства по ее использованию. Стало понятно, что для участия в совместных клинических и научных проектах по ХМЛ методика мониторинга *BCR-ABL* должна быть приведена к каким-то общим стандартам.

Существует несколько возможных подходов к стандартизации метода. Один подход – это унификация всех этапов методики или большинства из них. Такой подход достаточно трудоемкий и может включать ограниченное число лабораторий. При этом степень свободы лабораторий резко ограничивается использованием только определенных реактивов, приборов, протоколов. Другой подход заключается в строгом закреплении какого-либо одного существенного параметра – использование одной и той же плазмиды в качестве стандартного положительного контроля или использовании универсального метода оценки результатов. И, наконец, третьим подходом является переход на общую международную шкалу представления результатов, который осуществляется путем обмена образцами со стандартизованными лабораториями.

### **Создание стандартных протоколов анализа.**

Первым крупным шагом на пути стандартизации и примером первого подхода к решению проблемы явилось исследование под эгидой программы «Европа против рака» (ЕАС), результаты которого были опубликованы в 2003 году [7,8]. Целью исследования, проводимого в 26 лабораториях 10 европейских стран, явилось создание универсального стандартизованного протокола для определения экспрессии химерных онкогенов при лейкозах методом Taqman ПЦР в реальном времени. В результате интенсивной работы по сравнению различных параметров и условий реакции, были подобраны и оптимизированы праймеры и зонды к соответствующим генам-мишеням, определены температурные и временные параметры реакций обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, установлена чувствительность и воспроизводимость метода. Было признано, что чувствительность метода должна составлять не менее 100 копий плазмидной ДНК и  $10^{-4}$  разведения РНК. Воспроизводимость, которая оценивалась как значение коэффициента вариации для порогового цикла (Ct), в этом исследовании составила менее 6% для разведений РНК  $-3/-4$  степени и менее 4% для 10 копий плазмидной ДНК. Эффективность реакции, определяемая наклоном калибровочной кривой, должна быть максимально близкой к 100%, что соответствует наклону  $-3,32$ . В этой работе была достигнута эффективность  $-3,45 \pm 0,3$  для разведений РНК и  $-3,3 \pm 0,3$  для разведений плазмидной ДНК. Для варианта p210 гена *BCR-ABL*, являющегося маркером ХМЛ, оптимальный набор праймеров и зондов был выбран из 6 вариантов. Прямой праймер располагается на 13 экзоне гена *BCR*, а обратный праймер и зонд – на 2 экзоне гена *ABL*, что позволяет в одной реакции определять оба типа транскрипта – b3a2 и b2a2. В качестве контрольных генов были предложены гены *ABL*, *GUS* и  $\beta 2$ микроглобулин и определены параметры экспрессии этих генов и гена *BCR-ABL* в образцах первичных пациентов с ХМЛ и клетках

линии K-562. Таким образом, были определены основные ориентиры, на которые необходимо полагаться в оценке качества работы лаборатории при мониторинге экспрессии гена *BCR-ABL*. Внедрение общих наборов праймеров и зондов и лабораторных протоколов, которые сейчас используются большинством европейских лабораторий, явилось существенным продвижением на пути получения сравнимых результатов. Однако различия между лабораториями, использующими одну и ту же методику и реактивы, все равно оставались, что было показано как в этом, так и в последующих исследованиях [8, 9].

### **Использование стандартных плазмид и разведений.**

Было осуществлено несколько исследований с использованием одинаковых плазмид в качестве положительного контроля, одних и тех же разведений образцов клеточных линий или образцов пациентов. В исследовании, проведенном с участием 38 лабораторий в Северной Америке, экспрессия определялась в одинаковых образцах разведений клеточной линии K562, содержащей ген *BCR-ABL*, разными методами. При оценке экспрессии, выраженной в логарифмической шкале, разброс между лабораториями оказался весьма значительным – от 1,56 до 3,04 порядков для разных разведений. Наиболее существенный вклад в различия результатов, по мнению исследователей, внесло использование гена *ABL* в качестве контрольного гена [10]. В работе японских авторов значения экспрессии *BCR-ABL* в одних и тех же образцах пациентов для 4 лабораторий различались в пределах от 1,3 раза до 714,2 раза [11]. Европейским исследователям при использовании одинаковых образцов разведений клеток пациентов и универсальной плазмиды в качестве контроля удалось достичь хорошей схожести результатов между 37 лабораториями, но и здесь разница в экспрессии между крайними точками могла в отдельных случаях составлять более двух порядков. Были продемонстрированы значительные различия при использовании двух разных методов детекции флуоресцентного сигнала [12].

### **Оценка результатов по логарифмической шкале.**

В рамках масштабного международного исследования IRIS был предложен метод универсального сравнения результатов молекулярного мониторинга между лабораториями с использованием базовой линии и логарифмической шкалы представления данных. В этом исследовании молекулярный анализ методом ПЦР в реальном времени проводился в трех центрах с использованием различных лабораторных процедур и двух различных контрольных генов [13,14]. Было отмечено, что между

центрами наблюдаются существенные различия в уровнях экспрессии *BCR-ABL* у пациентов в одних и тех же временных точках. Между тремя лабораториями был осуществлен обмен образцами 30 первичных пациентов, и в каждой лаборатории своим вариантом метода ПЦР в реальном времени была определена базовая линия, являющаяся медианой экспрессии *BCR-ABL* в этих 30 образцах. Значение экспрессии на фоне терапии представлялось как разница между текущим и базовым уровнем, выраженным в десятичных логарифмах ( $\Delta\log$ ). Таким образом, базовая линия в каждой лаборатории могла быть разной в численном выражении, но значение изменения экспрессии в логарифмической шкале позволило адекватно сравнивать ответ на терапию у различных пациентов.

Исследование IRIS внесло огромный вклад в доказательство важности молекулярного мониторинга при терапии ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ и определило базовые параметры молекулярного ответа [1,14]. Был предложено использование параметра «большой молекулярный ответ» (БМО), который является уменьшением экспрессии на три порядка ( $\log$ ) от базовой линии, и доказано, что БМО является важным прогностическим фактором и показателем успешной терапии иматинибом.

### **Международная шкала**

На международном совещании экспертов в Бетесде в 2005 году были обобщены данные по молекулярному мониторингу ХМЛ и выработаны рекомендации по оптимизации методики детекции транскрипта *BCR-ABL* [15-17]. Рекомендации по оптимизации методики мониторинга *BCR-ABL* включают все параметры анализа: качество образцов для анализа и выделение РНК, ферменты и праймеры для реакции обратной транскрипции, требования к праймерам для ПЦР-анализа, подходящие контрольные гены и стандарты, определение чувствительности и воспроизводимости анализа.

Экспертами было предложено заменить представление результатов экспрессии *BCR-ABL* в виде логарифма снижения концентрации от базовой линии на вид *BCR-ABL*/контрольный ген  $\times 100\%$ , и перейти на международную шкалу. Под международной шкалой (International Scale, IS) подразумевается универсальная шкала представления результатов, в которой базовой линии соответствует значение 100%, а значению БМО соответствует значение 0,1%. Для перехода на международную шкалу для каждой лаборатории должен быть вычислен фактор конверсии. Это коэффициент, умножение на который переводит значение экспрессии *BCR-ABL*, полученное в лаборатории, в значение международной шкалы. Представление результатов в виде *BCR-ABL*/контрольный ген  $\times 100\%$  еще не является представлением результатов в международной шкале, как иногда ошибочно

полагают. Вычисление фактора конверсии происходит путем обмена образцами со стандартизованными лабораториями и сравнения получаемых результатов определения экспрессии.

Необходимость перехода на международную шкалу вызвана тем, что, как было сказано выше, между лабораториями во всем мире существуют широкие вариации в методике анализа, а полную унификацию метода невозможно осуществить в глобальном масштабе, так же, как и распространить одинаковые образцы для вычисления базовой линии. Во многих лабораториях используется понятие базовой линии и представление результатов в виде  $\Delta\log$ , но каждая базовая линия вычислена на основании экспрессии у разных групп пациентов и поэтому сравнение таких результатов между собой невозможно. Различия между лабораториями в определении экспрессии наблюдаются и при использовании одинаковых подходов и реактивов. Концепция международной шкалы позволяет каждой лаборатории использовать свой метод детекции экспрессии *BCR-ABL*, при условии, что метод обладает достаточной чувствительностью, специфичностью и линейностью. По рекомендациям экспертов, чувствительность анализа должна быть как минимум 0,01% по международной шкале, что соответствует уменьшению экспрессии *BCR-ABL* на 4 log от базового уровня [15].

### **Определение фактора конверсии**

Для подтверждения концепции международной шкалы был осуществлен большой международный проект по определению фактора конверсии, в котором принимали участие 38 лабораторий из 15 стран [18]. В качестве референсной лаборатории выступила лаборатория в Аделаиде, одна из трех, принимавших участие в исследовании IRIS. Определение фактора конверсии осуществлялось в два этапа. На первом этапе каждая из лабораторий вычисляла значение экспрессии *BCR-ABL* у пациентов своим методом, эти же образцы – в среднем 20 из каждой лаборатории, передавались в референсную лабораторию, в которой тоже определялось значение экспрессии. Поскольку при высоких значениях экспрессии *BCR-ABL* наблюдаются существенные искажения результатов, и эти искажения различны при использовании разных контрольных генов, фактор конверсии вычисляется и является приемлемым только для образцов с уровнем экспрессии менее 10%.

Если анализ экспрессии в лабораториях является стабильным и воспроизводимым, результаты между двумя лабораториями будут отличаться на одинаковую величину. Значение фактора конверсии вычислялось по методу Bland and Altman, исходя из

средней разницы между значениями, полученными в референсной и исследуемой лабораториях и выраженных в логарифмической шкале. При этом для самой референсной лаборатории для перехода на международную шкалу тоже был определен фактор конверсии, равный 1,25. Это коэффициент, умножение на который позволяет привести значение БМО в этой лаборатории, равное 0,08%, к значению 0,1%.

Вторым этапом этой работы является валидация, т.е. подтверждение значения фактора конверсии для каждой лаборатории. Для этого осуществляется повторная передача образцов в референсную лабораторию. Было показано, что до конверсии разброс средних значений между референсной и исследуемыми лабораториями варьировал в пределах от - 7.7 раз до +8.1 раз, а после конверсии для 17 из 19 лабораторий различия в средних укладывались в промежуток +/- 1,2 раза. Из 38 лабораторий, в которых использовались 19 различных методов и 5 разных контрольных генов, для 22 (58%) вычисление фактора конверсии оказалось успешным. Для остальных лабораторий вычисление фактора конверсии не смогло осуществиться либо вследствие нелинейности выполняемого ими анализа, либо вследствие его нестабильности в течение времени исследования.

Таким образом, было подтверждено, что вычисление фактора конверсии и представление результатов экспрессии *BCR-ABL* в международной шкале позволяет значительно снизить различия в данных лабораторий, использующих отличающиеся аналитические системы. Это дает возможность адекватно сравнивать результаты исследований разных лабораторий, что в большой мере облегчает им совместную научную и клиническую работу, участие в международных исследованиях.

### **Концепция региональных референсных лабораторий. Стандартизация молекулярного мониторинга в Европе**

Одна референсная лаборатория не в состоянии справиться с работой по вычислению фактора конверсии для лабораторий всего мира, поэтому было предложено развивать сеть национальных или региональных референсных лабораторий. Первой линией таких лабораторий могут быть те, для которых был определен и подтвержден фактор конверсии путем обмена образцами с лабораторией в Аделаиде. В Европе такой лабораторией является лаборатория в Мангейме, Германия, действующая в рамках программы EUTOS в European LeukemiaNet, которая провела исследование по вычислению фактора конверсии для 57 европейских лабораторий.

Лаборатория в Мангейме предложила несколько измененный подход к вычислению фактора конверсии, чем лаборатория в Аделаиде [19]. На первом этапе в исследуемую

лабораторию передаются закодированные образцы разведений клеток первичного пациента ХМЛ клетками здорового донора в соотношениях 0,01%, 0,1%, 1% и 10%, каждый в трех повторах. На основании данных экспрессии *BCR-ABL* в этих образцах определяется зависимость значений между собой, полученных в двух лабораториях, и вычисляется уравнение линейной регрессии. Если зависимость оказывается линейной ( $R^2 > 0.98$  для данных в логарифмической шкале), исследуемая лаборатория включается в работу по определению фактора конверсии. Исходя из параметров уравнения регрессии, для лаборатории вычисляется предварительный фактор конверсии. На втором этапе происходит обмен образцами пациентов и вычисление фактора конверсии по методу Bland and Altman. Сходимость между результатами исследуемой и референсной лабораторий считается приемлемой, когда результаты с учетом фактора конверсии достигают двух из трех следующих характеристик: 1) более 50 % образцов пациентов находятся в пределах двукратного разброса; 2) более 75% образцов в пределах трехкратного разброса; 3) более 90% образцов в пределах пятикратного разброса. Первый этап позволил отсеять лаборатории с недостаточной эффективностью амплификации ПЦР в реальном времени (6 из 57). Предварительный фактор конверсии, вычисленный на первом этапе, позволяет улучшить сходимость между результатами двух лабораторий, но сходимость при использовании фактора конверсии, полученного на втором этапе, оказалась значительно выше. Во втором этапе вычисления фактора конверсии приняли участие 48 лабораторий, для 43 из них результаты с учетом фактора конверсии отвечали заявленным критериям: для 72 % лабораторий данные находились в пределах двукратного разброса, для 90% - в пределах трехкратного, для 96% - в пределах пятикратного.

### **Дальнейшие пути стандартизации**

Развитие системы вычисления факторов конверсии и переход на международную шкалу несомненно является большим шагом вперед в вопросе стандартизации. Однако этот подход является некоторым компромиссом между тем, чего хочется достичь, и тем, что доступно в настоящий момент. Наилучшим вариантом для каждой лаборатории могло бы стать наличие доступных референсных стандартов, которые позволили бы конвертировать результаты непосредственно в международную шкалу. О необходимости таких стандартов специалисты по молекулярной диагностике ХМЛ говорят на протяжении последних нескольких лет. Однако в настоящее время такие референсные материалы еще не доступны, и нет единого мнения о том, какими они должны быть. Задача довольно сложная – эти материалы должны достаточно точно имитировать образцы пациентов,

контролировать все этапы анализа, должны быть применимы ко всем существующим вариантам методик [20]. Всемирной организацией здравоохранения опубликованы рекомендации по вопросам характеристики биологических реферсных материалов, их подготовке и внедрению [21].

### **Характеристики метода молекулярной диагностики в ГНЦ РАМН**

В лаборатории генной инженерии Гематологического научного центра РАМН регулярная молекулярная диагностика и мониторинг экспрессии *BCR-ABL* при ХМЛ методом ПЦР в реальном времени были начаты в 2005 году. За 5 лет работы исследовано более 9 тысяч образцов, это около 3 тысяч пациентов со всей России, более чем у 1 тысячи пациентов осуществляется мониторинг.

Определение экспрессии *BCR-ABL* в лаборатории проводится методом TaqMan ПЦР в реальном времени. В качестве образцов в основном используется периферическая кровь в объеме 5-10 мл, консервант ЭДТА, образцы из регионов России доставляются в течение суток при температуре +4<sup>0</sup>С. Выделение РНК проводится по методу Homchinsky со своими вариациями. Реакция обратной транскрипции проводится в 40 мкл с использованием random гексамеров в конечной концентрации 10мкМ, обратной транскриптазы М-MLV, 2 мкг тотальной РНК. Тест-системы были разработаны на основе рекомендаций программы ЕАС по количественному мониторингу экспрессии химерных онкогенов.

Реакция ПЦР в реальном времени проводится на приборе IQ-Cicler компании Bio-Rad, каждый образец ставится в трех повторах для гена *BCR-ABL* и для контрольного гена. В качестве контрольного гена с 2005 года по апрель 2007 года использовался ген *β2микроглобулин*, с апреля 2007 года по настоящее время - ген *ABL*. Как положительные контроли (стандарты) используются десятикратные разведения плазмидной ДНК, содержащей вставку фрагмента соответствующего гена. Клонирование фрагментов осуществлялось в собственной лаборатории с использованием вектора pGEM-T Easy, Promega. Стандарты используются в каждой ПЦР реакции для построения калибровочной кривой, для *BCR-ABL* диапазон стандартов составляет 10<sup>6</sup> - 10<sup>2</sup> копий, для *ABL* 10<sup>6</sup> - 10<sup>4</sup> копий.

Параметры реакции ПЦР в реальном времени: эффективность в пределах 95-105%, коэффициент корреляции не менее 0,98, Чувствительность метода по разведениям клеточных линий составила 0,01%, по разведениям РНК первичного пациента ХМЛ РНК

здорового донора  $10^{-4}$ , воспроизводимая чувствительность по контрольным плазмидам составила 10 копий/мкл ( $CV\%=1,86$ ).

Представление результатов при использовании  $\beta 2$ микроглобулина осуществлялось в виде  $BCR-ABL/\beta 2m*10^7$  и  $\Delta\log$ , при использовании  $ABL$  в виде  $BCR-ABL/ABL*100\%$  и  $\Delta\log$ . Нужно отметить, что в обоих случаях определяется число копий каждого гена –  $BCR-ABL$  и контрольного, и вычисляется относительная экспрессия как частное этих значений.  $10^7$  и 100 являются лишь коэффициентами, которые вводятся для удобства представления результатов. Базовая линия была определена как медиана значений экспрессии у 30 первичных пациентов, она составила 75,16%.

Для продолжения адекватного мониторинга экспрессии при переходе от одного контрольного гена к другому был вычислен коэффициент пересчета. Для этого в 46 образцах пациентов ХМЛ была определена экспрессия  $BCR-ABL$  по отношению к обоим контрольным генам ( $\beta 2$ микроглобулин и  $ABL$ ) и на основании полученных данных построено уравнение линейной регрессии. Полученный коэффициент регрессии составил 0,9562, а вероятность ошибки - 0,00016, что говорит о высокой корреляции результатов по двум контрольным генам между собой и возможности достоверного пересчета и представления данных, полученных с использованием гена  $ABL$  в данные с использованием  $\beta 2$ микроглобулина и наоборот. Таким образом, данные, полученные по гену  $\beta 2$ микроглобулина, после пересчета могли быть объединены с результатами по гену  $ABL$  для одного и того же пациента, что позволило вести непрерывный мониторинг экспрессии  $BCR-ABL$ .

В 2008 году наша лаборатория была включена в работу по вычислению фактора конверсии. В качестве референсной лаборатории выступала лаборатория в Мангейме, работа проводилась по стандартной процедуре в два этапа. На основании сравнения данных экспрессии образцов клеточных разведений была показана линейность полученных результатов ( $R^2=0.9997$ ) и вычислен предварительный фактор конверсии, который составил 0,7852. Для последующей валидации, наша лаборатория передала в референсную лабораторию 40 образцов пациентов, экспрессия в которых была не выше 10%. Значение фактора конверсии, вычисленное по методу Bland and Altman, составило 0,9631. Значения сходимости между результатами двух лабораторий были близки к заявленным критериям и составили: 51% в пределах 2-кратного разброса, 63% в пределах 3-кратного, 88% в пределах 5-кратного. Для представления результатов в параметрах международной шкалы (IS) значения экспрессии, полученные в лаборатории в виде  $BCR-ABL/ABL*100\%$ , необходимо умножать на 0,9631.

Таким образом, метод определения экспрессии *BCR-ABL*, используемый в нашей лаборатории, удовлетворяет предъявляемым требованиям, лаборатория признана стандартизированной, результаты молекулярного мониторинга выражаются в формате международной шкалы. Предполагается регулярная процедура подтверждения (валидации) фактора конверсии.

### **Стандартизация в России**

В настоящее время лаборатория генной инженерии является референсной в России. Помимо этой, в России имеются 8 лабораторий, включенных в программу по молекулярному мониторингу *BCR-ABL* по инициативе и при поддержке компании Новартис. Две из этих лабораторий – в Екатеринбурге и в Ростове-на-Дону стабильно работают уже на протяжении нескольких лет, остальные начали работу по мониторингу *BCR-ABL* в 2009 году. Все лаборатории используют одинаковые наборы реактивов для обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, одни и те же протоколы, стандарты, *ABL* является контрольным геном также во всех лабораториях.

В 2009 году нами начата работа по определению факторов конверсии для этих лабораторий. Были приготовлены 10-кратные разведения клеток линии К-562, экспрессирующей *BCR-ABL*, клетками здоровых доноров. В 7 лабораторий были разосланы закодированные образцы разведений 4 концентраций – от 0,01% до 10%, каждого разведения по 3 повтора. Для каждого образца проводились два независимых эксперимента по определению экспрессии *BCR-ABL*, начиная с этапа обратной транскрипции. В нашей лаборатории были проведены аналогичные измерения на таких же образцах.

На настоящий момент получены результаты из 4 лабораторий. В референсной и только в одной из исследуемых лабораторий (Екатеринбург) чувствительность метода оказалась достаточной для определения экспрессии *BCR-ABL* в разведении 0,01%. В остальных трех лабораториях конечным разведением, в котором детектировалась экспрессия *BCR-ABL*, было 0,1% (таблица 1). Лаборатории отличались друг от друга и по количеству копий контрольного гена *ABL* в образцах. В лаборатории Самары медиана количества копий гена *ABL* составила всего 317,5, в лаборатории Ростова-на-Дону – 1255, что значительно ниже количества копий в трех остальных лабораториях. Во всех исследуемых лабораториях обнаружилась линейная зависимость между их результатами и результатами референсной лаборатории ( $R^2 > 0,99$ ). Были определены предварительные факторы конверсии, исходя из параметров уравнений линейной регрессии для каждой лаборатории, по формуле:

$\log y = (\text{slope} * \log \text{MMR}^{\text{IS}}) + \text{intercept}$ , где  $\log \text{MMR}^{\text{IS}} = -1$

Фактор конверсии =  $\text{MMR}^{\text{IS}} / \text{antilog } y$

## Заключение

Таким образом, несмотря на использование одного и того же метода, значения экспрессии *BCR-ABL* в одинаковых образцах заметно различаются между лабораториями, что еще раз подтверждает необходимость определения для них фактора конверсии. Высокое значение коэффициента регрессии, полученное в каждой лаборатории, доказывает линейную зависимость между результатами референсной и всеми исследуемыми лабораториями. Однако недостаточная чувствительность применяемых в трех лабораториях методов и низкое значение количества копий гена *ABL* в двух из них не позволяют с полной уверенностью утверждать, что результаты этих лабораторий могут быть адекватно переведены в формат международной шкалы. По-видимому, для них требуется как минимум повторная проверка их работы по разведениям клеточных линий, и, если результаты повторных тестов будут такими же, дальнейшее совершенствование применяемого метода.

Таблица 1. Средние значения экспрессии *BCR-ABL* и коэффициент вариации для разведений линии K-562 в 5 лабораториях

Лаборатория/город	параметры анализа	разведения			
		10%	1%	0,10%	0,01%
Москва	среднее	42,57	6,20	0,42	0,03
	коэффициент вариации, %	21,98	21,68	33,92	41,62
Екатеринбург	среднее	15,61	2,63	0,2	0,03
	коэффициент вариации, %	49,63	17,39	22,14	60,96
Ростов-на-Дону	среднее	21,45	3,16	0,17	-
	коэффициент вариации, %	15,81	18,09	54,01	-
Новосибирск	среднее	37,02	4,83	0,4	-
	коэффициент вариации, %	10,51	10,85	21,81	-
Самара	среднее	49,67	2,86	0,14	-
	коэффициент вариации, %	31,01	45,83	75,17	-

Таблица 2. Медиана количества копий гена *ABL* в образцах, определенная в 5 лабораториях, коэффициент детерминации и предварительный фактор конверсии для 4 исследуемых лабораторий

Лаборатория/город	Медиана количества копий гена <i>ABL</i> в образцах	Коэффициент детерминации, $R^2$	Предварительный фактор конверсии
Москва	35600		
Екатеринбург	47750	0,9962	1,3192
Ростов-на-Дону	1255	0,9995	2,4424
Новосибирск	12400	0,9985	1,0053
Самара	317,5	0,9935	4,5709

Литература:

1. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006;355:2404-2417.
2. Вассарани М, Кортес J, Пани F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):6041-51. Epub 2009 Nov 2.
3. ПЦР «в реальном времени». Под общей ред. Д. В. Ребрикова. Москва, «Бином», 2009
4. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003 Jun;17(6):1013-34

5. Rosti G, Martinelli G, Bassi S, et al. Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2284-90
6. Rulcova J, Zmekova V, Zemanova Z, et al. The effect of total-ABL, GUS and B2M control genes on BCR-ABL monitoring by real-time RT-PCR. *Leuk Res* 2007 Apr;31(4):483-91.
7. Beillard E, Pallisgaard N, van dV, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003 Dec;17(12):2474-86.
8. Gabert J, Beillard E, van dV, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003 Dec;17(12):2318-57.
9. Müller MC, Saglio G, Lin F, et al. An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. *Haematologica* 2007 Jul;92(7):970-3.
10. Zhang T, Grenier S, Nwachukwu B, et al. Inter-laboratory comparison of chronic myeloid leukemia minimal residual disease monitoring: summary and recommendations. *J Mol Diagn* 2007 Sep;9(4):421-30.
11. Yamada MF, Fujiwara T, Ishikawa I, et al. Interlaboratory comparison of quantitative RT-PCR based detection for minimal residual disease in leukemias: a standardization approach in Japan. *Tohoku J Exp Med* 2008 Feb;214(2):97-104.
12. Müller MC, Erben P, Saglio G, et al. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):96-102
13. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003 Oct 9;349(15):1423-32.
14. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2006 Jan;20(1):29-41.
15. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):28-37.

16. Branford S, Cross NCP, Hochhaus A, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006 Nov;20(11):1925–30.
17. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1809-20
18. Branford S, Fletcher L, Cross NCP, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008 Oct 15;112(8):3330–8.
19. MC Müller, NCP Cross, P Erben, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML in Europe. *Leukemia*. 2009 Nov;23(11):1957-63
20. Cross NC. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Sep;22(3):355-65
21. WHO Expert Committee on biological standardization. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2007;941:1–340.