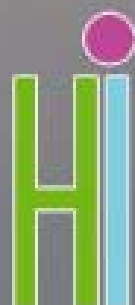


ISSN 1818-4820

ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HAEMATOPOÏESIS
IMMUNOLOGY



1/
2010

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
1/2010 Том 7

Учредитель: РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН (лаборатория иммунология гемопоэза)

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОА Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY
Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турьянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошь (Франция)
Дж. Видженес (Франция)
Л.Ю. Гривцова (Москва)
Дж. Джаносси (Великобритания)
И.С. Долгополов (Москва)
Т.Н. Заботина (Москва)
А.М. Ковригина (Москва)
А.М. Копылов (Москва)
Л.В. Мазурок (Курган)
А.А. Михайлова (Москва)
Д.Ш.Османов (Москва)
А.И. Павловская (Москва)
С.В. Петров (Казань)
Б.В. Пинегин (Москва)
А.В. Попа (Москва)
Н.А. Пробатова (Москва)
Р.М. Рамазанова (Казахстан)
И.Н. Серебрякова (Москва)
Г.С. Тумян (Москва)
С.А. Тюляндин (Москва)
А.В. Филатов (Москва)
М.А. Френкель (Москва)
С.А. Шинкарев (Липецк)
Е.Н. Шолохова (Москва)
А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписано в печать 05.11.2009. Формат 60×90/8.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Печать офсетная.
Уч.-изд. листов 5,5. Тираж 1000 экз.
Подписной индекс № 36915
Отпечатано в типографии «Огни Москвы»
Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна
Издательская группа РОНЦ
Координатор: Е.Г. Турьянская. Макет: Б.Б. Крюков

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
1/2010 Vol.7

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (HAEmatopoiesis Immunology Laboratory)

EDITORS-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN, G. JANOSSY
Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.G. Turmianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtsova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgopopolov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopylov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
A.A. Mikhailova (Moscow)
D.Ch. Osmanov (Moscow)
A.I. Pavlovskaja (Moscow)
S. V. Petrov (Kazan)
B.V. Pinegin (Moscow)
A.V. Popa (Moscow)
N.A. Probatova (Moscow)
R.M. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzsk)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478. Tel/fax 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru
www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.
License № ФС 77-23551 от 06.03.2006
License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915
Published «Ogny Moskvyy»
Printrun 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal Haematopoiesis immunology
Co-ordinator: E.G. Turmianskaya. Design: B.B. Krukov

ОГЛАВЛЕНИЕ**ОТ РЕДАКТОРА**

Майкл Р. Локен, Денис А. Уэллс

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ8

*А. М. Попов^{1,2,3}, Т. Ю. Вержбицкая^{1,2}, Г. А. Цаур^{1,2}, Е. В. Шориков^{1,2},
Л. И. Савельев^{1,2,3}, Л. Г. Фечина^{1,2}*

**МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ У ДЕТЕЙ
С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
ИЗ В-ЛИНЕЙНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ
ПРИ ПОМОЩИ УПРОЩЕННОГО ПОДХОДА:
ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ.....38**

**Организация 7-й Российской с международным участием конференции
«Иммунология гемопоэза» и публикация данного тома периодического
издания «Иммунология гемопоэза» поддержаны Российским фондом
фундаментальных исследований грант № 10-04-06059-г**

CONTENTS

FROM THE EDITOR

Michael R. Loken, Ph.D. Denise A. Wells, MD
ENUMERATION OF PROGENITOR CELLS.....9

Michael J. Borowitz
MINIMAL RESIDUAL DISEASE DETECTION IN CHILDHOOD ALL.....26

ОТ РЕДАКТОРА

Все более актуальным в терапии гемобластозов является молекулярный контроль эффективности лечения. Одним из наиболее точных методов оценки молекулярной ремиссии является иммунологический метод с использованием многоцветной проточной цитометрии. Именно этому актуальному вопросу посвящена 7 Российская с международным участием конференция «Иммунология гемопоэза» (7-8 июня 2010 г.). Обсуждено значение минимальной остаточной болезни (МОБ) при В-клеточном хроническом лимфолейкозе, острых лейкозах и множественной миеломе. В 2007 году группой ERIC (European Research Initiative in B-CLL) разработан стандартный протокол оценки МОБ при В-ХЛЛ. Этот метод рекомендован для определения МОБ международным рабочим совещанием по В-ХЛЛ (IW-CLL; Blood, 2008), на котором были уточнены критерии полной ремиссии с учетом МОБ. На конференции проблема МОБ при В-ХЛЛ детально изложена создателем стандартизованного протокола A. Rawstron.

В настоящем номере журнала российские (А.М. Попов с соавторами) и американские (M. Borowitz) ученые представили собственный опыт определения и оценки клинической значимости МОБ при острых лейкозах у детей. Важным выводом этих статей и докладов стало то, что определение МОБ должно проводиться современными высокотехнологичными методами (основное внимание уделено многоцветной проточной цитометрии), является информативным и важным, так как позволяет выделять группы риска больных, у которых может использоваться терапия различной интенсивности.

Особое значение имеет качество исследований костного мозга, точность количественной оценки клеток-предшественников и коррекция разбавления периферической кровью на основе иммунологических критериев (статья M. Loken, США).

Хочу отметить огромный вклад профессора G. Janossy (London, UK) в подготовку конференции и журнала. Все статьи англоязычных авторов, а также переводы русских статей на английский язык были рецензированы им. Являясь в течение последних 5 лет почетным председателем конференции, G. Janossy сумел придать ей международный уровень. Этот крупный ученый является создателем направления и биомедицинской платформы иммунофенотипирования в онкогематологии. Основы современных протоколов иммунодиагностики лейкозов и определения МОБ были во многом заложены G. Janossy в созданном им отделе клинической иммунологии Королевского свободного госпиталя в Лондоне. По поручению лаборатории иммунологии гемопоэза и редакции выражаю G. Janossy огромную благодарность за конференцию и журнал и поздравляю с юбилеем!

*Главный редактор журнала «Иммунологии гемопоэза»
Заслуженный деятель науки России, профессор*

Н.Н. Тупицын

FROM THE EDITOR

Molecular control of treatment efficacy is an increasingly important problem of therapy in patients with hematology malignancies. Immunologic multicolor flow cytometry is a most accurate approach to evaluation of molecular remission. It is this important problem that is in the focus of the 7th Russian Conference with International Participation on Haematopoiesis Immunology (June 7 to 8, 2010). The conference will discuss significance of minimal residual disease (MRD) in B-cell chronic lymphocytic leukemia, acute leukemias and multiple myeloma. In 2007 the European Research Initiative in B-CLL (ERIC) developed a standard protocol for MRD evaluation in B-CLL. The International Workshop in B-CLL defined more precisely criteria of complete response with respect to MRD and recommended this method to monitor MRD (IW-CLL; Blood, 2008). At the conference the issue of MRD in B-CLL is considered in detail by A. Rawston, the originator of the standard protocol.

In the current journal issue Russian (A.M. Popov et al.) and American (M. Borowitz) investigators present their own experience in detection and evaluation of clinical significance of MRD in children with acute leukemia. The important conclusion of these presentations is that MRD monitoring should be done by up-to-date high-technology assays (with emphasis on multicolour flow cytometry), is an informative and important technique as it allows selection of risk groups to receive therapy of different intensities. Of much importance is quality of bone marrow analysis, accuracy of quantification of precursor cells and correction for haemodilution on the basis of immunologic criteria (M. Loken, USA).

A should like to emphasize the tremendous contribution of Professor G. Janossy (London, UK) into the journal and the conference preparatory activities. He reviewed all papers by English-speaking authors and all translations from Russian into English. As the Honorary Chairman of the conference over the last 5 years, G. Janossy rendered the conference international value. This outstanding scientist is the author of a new field and a biomedical immunophenotyping platform in oncohaematology. Fundamentals of current protocols for immunodiagnosis of leukemias and MRD monitoring were to a large extent developed by G. Janossy at the department of clinical immunology at Royal Free Hospital (London) headed by him. On behalf of the Haemopoiesis Immunology Laboratory and the editorial board I heartily thank G. Janossy for the conference and the journal, and wish him all the best on the occasion of his jubilee!

*Honored Scientist of Russia
Editor-in-Chief Haemopoiesis Immunology journal*

N.N. Tupitsyn

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген,

Ауто-, алло-ТКМ – аутологичная или аллогенная трансплантация клеток костного мозга или мобилизованных стволовых клеток периферической крови,

БСВ – бессобытийная выживаемость

β -ХЛЛ – В-клеточный хронический лимфолейкоз,

ИГ – иммуноглобулин,

ИФА – иммуноферментный анализ,

ИФТ – иммунофенотипирование,

ЛДГ – лактатдегидрогеназа,

МК – моноклональный компонент,

МКА – моноклональные антитела,

ММ – множественная миелома,

МНК – мононуклеарные клетки,

МОБ – минимальная остаточная болезнь,

МРБ – минимальная резидуальная болезнь,

НХЛ – неходжкинская лимфома

РБ – резидуальная болезнь,

РМЖ – рак молочный железы

КМ – костный мозг

РИФ – реакция иммунофлуоресценции,

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз,

ПК – плазматические клетки,

ПР – полная ремиссия

ПЦ – проточная цитометрия,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

СОЭ – скорость оседания эритроцитов,

СРБ – С-реактивный белок.

ТПЛ – тумор-пенетрирующие лимфоциты

ЧР – частичная ремиссия

ABBREVIATIONS

Ag, antigen.

ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Auto-/allo-BMT, autologous or allogeneic transplantation of bone marrow cells or mobilized peripheral stem cells.

B-CLL, B-cell lymphocytic leukemia.

BSA, bovine serum albumin.

BC, breast cancer

CD (cluster of differentiation) – кластер лейкоцитарных дифференцировочных антигенов.

CRP, C-reactive protein.

EIA, enzyme immunoassay.

ESR, erythrocyte sedimentation rate.

FC, flow cytometry.

FISH, fluorescent hybridization *in situ* (флюоресцентная гибридизация *in situ*).

IG, immunoglobulin.

IFR, immunofluorescence reaction.

IPT, immunophenotyping.

LDH, lactate dehydrogenase.

MC, monoclonal component.

Mab, monoclonal antibodies.

major histocompatibility complex (MHC)

MNC, mononuclear cells.

MRD, minimal residual disease.

NHL, Non-Hodgkin's lymphomas

PNAS (Proceedings of National Academy of Sciences of the USA)

RD, residual disease.

PBS, phosphate buffered saline.

PC, plasma cells.

PCR, polymerase chain reaction.

Майкл Р. Локен, Денис А. Уэллс

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Гематолоджикс, Инк. 3161 Эллиот Авеню 200, Сизтл

E-mail: mrloken@hematologics.com

Резюме

Определение клеток-предшественников в аспиратах костного мозга методом проточной цитометрии не сможет получить широкого распространения в гематологии до тех пор, пока не будет найдено адекватное средство подсчета числа клеток-предшественников, независимое от лаборатории, в которой проводится исследование.

Результаты анализа зависят от различных факторов на всех этапах анализа, поэтому необходимо стандартизировать каждый этап, чтобы добиться единообразия результатов во всех лабораториях.

Использование того или иного антикоагулянта, размер и способ подготовки образца могут сильно влиять на возможность определения клеток-предшественников.

Целесообразно применять несколько реагентов, т.к. в процессе злокачественной трансформации может исчезнуть любой отдельный антиген. Использование нескольких реагентов является независимым средством достижения единообразия результатов. Определение соответствующего знаменателя, а также выявление гемодилуции и внесение соответствующих поправок позволит снизить степень неопределенности при математических вычислениях.

Воспроизводимость результатов исследования в разных лабораториях можно обеспечить только путем четкого определения процедуры на каждом этапе анализа. Со временем, если удастся стандартизировать процесс, эта технология получит признание гематологов как стандартный метод определения числа незрелых клеток в аспиратах костного мозга.

Ключевые слова: клетки-предшественники, лимфобласты, миелобласты, проточная цитометрия, костный мозг.

Введение

Пропорция незрелых клеток является ключевым параметром анализа аспиратов костного мозга.

Обычно ее определяют путем микроскопического исследования препарата: подсчитывают число бластных клеток и результат выражают по отношению к подсчитанным ядросодержащим клеткам, обычно на 500 клеток и менее [1]. При использовании метода проточной цитометрии подсчитывают число клеток-предшественников на основе фенотипа и характеристик светорассеяния.

Michael R. Loken, Ph.D. Denise A. Wells, MD

ENUMERATION OF PROGENITOR CELLS

HematoLogics, Inc 3161 Elliot Avenue, Suite 200, Seattle, WA, 98040

Email: mrloken@hematologics.com

Abstract

The enumeration of progenitor cells in a bone marrow aspirate by flow cytometry will not achieve wide spread acceptance within the hematology field until there is a consistent means of arriving at this number that is independent of the laboratory reporting the results.

All steps taken to obtain this value can affect the results, therefore, each must be standardized to insure consistency from laboratory to laboratory. Specimen anti-coagulant, size and processing can cause dramatic differences in the ability to detect progenitor cells.

Redundant reagent combinations are necessary as any single antigen can be lost during neoplastic transformation. The use of multiple reagents provides an independent measure of consistency of the result. Defining an appropriate denominator as well as detecting and correcting for hemodilution reduce the variability introduced in the mathematical calculations.

Only by defining each and every step in the analysis can the results be replicated from laboratory to laboratory. With standardization, over time, this technology will gain acceptance by the hematologists as a standard means of enumerating the immature cells in a bone marrow aspirate.

Key words: Progenitor cells, Lymphoblasts, Myeloblasts, Flow cytometry, Bone marrow,

Introduction

A key parameter in the assessment of a bone marrow aspirate is the determination of the proportion of immature cells.

Routinely this is performed by microscopic examination of a spicule squash, counting the blast cells and expressing the results per nucleated cell counted, usually 500 total cells or less [1]. The analogous parameter determined by flow cytometry is the enumeration of progenitor cells based on phenotype and light scattering properties.

Исследование методом проточной цитометрии имеет важные преимущества по сравнению с морфологическим подсчетом бластных клеток: например, общее число подсчитанных клеток, определение числа клеток-предшественников разных линий, объективность критериев идентификации клеток-предшественников и возможность дифференцировать нормальные и патологически измененные клетки-предшественники. Морфологический подсчет бластных клеток остается стандартным методом клинической практики из-за существующих несоответствий между критериями идентификации клеток-предшественников и определения их пропорций методом проточной цитометрии в разных лабораториях. Пока в гематологии не будут приняты единые параметры выявления клеток-предшественников и способы выражения результатов, этот мощный метод не сможет полностью реализовать свои возможности и будет оставаться на вторых ролях в диагностике гематологических нарушений. Если удастся стандартизировать подходы в разных лабораториях, чтобы использовались одни и те же фенотипические маркеры, одни и те же гейты и способы подсчета пропорций клеток, то тогда число клеток-предшественников станет стандартным гематологическим параметром, аналогичным уровню гемоглобина или лейкоцитов. Морфологический подсчет бластных клеток основан на совершенно другом подходе по сравнению с проточнocyтoмeтpичeским анализом клеток-предшественников, поэтому трудно ожидать, что полученные значения будут одинаковыми. С течением времени, когда будут стандартизированы методы подсчета клеток-предшественников, число бластных клеток и число клеток-предшественников могут рассматриваться как отдельные и независимые показатели клеточного состава КМ, которые не должны обязательно быть идентичными. Одним из шагов в этом направлении может стать уточнение терминологии при регистрации результатов анализа при использовании этих двух методик. Предлагается, в этом плане, использовать термин «число бластных клеток» только в контексте морфологического исследования аспиратов КМ, а термин «число клеток-предшественников» применять только при использовании проточной цитометрии для определения незрелых клеток в аспирате КМ. Тогда, при подсчете клеток-предшественников требуется определить, какая клеточная линия оценивается (т. е. какие реагенты используются для определения), и выбрать адекватный способ выражения результатов, независимый от методики обработки клеток. В данной работе представлены новые особенности адекватного подсчета клеток-предшественников как одного из шагов в направлении определения параметров, необходимых для получения таких же значений в случае исследования данного образца в другой лаборатории.

Обработка [2;3]

При аспирационной трепанобиопсии в качестве антикоагулянта используют гепарин, а не EDTA, т.к. некоторые клеточные поверхностные антигены (например, CD11b) являются кальций-зависимыми, и их интенсивность будет снижена, если обработка образца не проводится немедленно.

The flow cytometric determination has significant advantages over morphologic blast counts in terms of total number of cells counted, enumeration of progenitor cells of different lineages, objective criteria to identify progenitors and the ability to distinguish between normal and abnormal precursor cells. The morphologic blast count remains the standard in clinical practice because of a lack of consistency between laboratories in identifying progenitor cells and calculating their proportions by flow cytometry. Without consistency throughout the hematology field in the parameters used to identify progenitor cells and a definition of how to express the results, this powerful technology will not achieve its full potential and will be shunted to a minor role in the assessment of hematologic disorders. If standardization between laboratories can be achieved, so that the same phenotypic markers are used with the same gating strategies and with calculations of proportions, then the progenitor cell count will become a standard hematology parameter similar to hemoglobin concentration, whole blood count, or differential count. Since the morphologic blast count is obtained in a completely different manner than flow cytometric analysis of progenitor cells, it should not be expected for these parameters to be the same. Over time, with consistency in the methods of obtaining progenitor cell counts, blast counts and progenitor cell counts will be viewed as separate and independent measures of bone marrow composition without the expectation that they must be identical. One step in achieving this goal is to distinguish the two measurements by the terminology used to report the results. Therefore, it is suggested that the term **blast count** be used only in the context of morphologic examination of a bone marrow aspirate while **progenitor cell count** be applied to a flow cytometric determination of immature cells in the marrow aspirate. The progenitor cell count, then, requires a definition of which lineage is being assessed (i.e., which reagents were used) and a consistent means of expressing the results, independent of the technique used to process the cells. This manuscript will highlight the salient features of consistent progenitor cell counts as a step towards establishing the parameters required for obtaining the same value when a specimen is processed in different laboratories.

Processing [2;3]

Trephine bone marrow aspirates should be collected using heparin as an anti-coagulant rather than EDTA, as some cell surface antigens, e.g. CD11b, are calcium dependent, and if the specimen is not processed immediately, will show decreased intensity.

Лучше использовать небольшие по объему образцы, т.к. на конечный результат подсчета может влиять разбавление КМ периферической кровью. Для иммунофлюоресцентного окрашивания используют такие титры реактивов, которые позволяют получить максимальную и воспроизводимую интенсивность флюоресценции. Для лизиса эритроцитов необходимо использовать реагенты, которые не влияют на свойства светорассеяния [2;3]. Методики с использованием последовательности операций окрашивание, лизис, промывка, фиксация имеют то преимущество, что метить клетки антителами можно в присутствии высоких концентраций нормальной человеческой плазмы, что приводит к снижению риска неспецифического связывания. Все образцы должны быть фиксированы в 0,5 % параформальдегиде для снижения воздействия биологических факторов и обеспечения сохранности образца. Проточнo-цитометрический анализ нужно проводить как можно скорее после окрашивания для снижения возможности появления повышенной аутофлюоресценции, которая появляется с течением времени после фиксации.

Стандартизация приборов

Устройство и работа проточного цитометра в определенной степени зависит от производителя и модели прибора. Необходимо использовать определенные процедуры, обеспечивающие оптимальную и одинаковую чувствительность каждого канала изо дня в день. Контроль качества прибора, включая спектральную компенсацию флюоресценции, должен регистрироваться ежедневно. (Представленные в рукописи данные получены на приборе FACS Calibur, Becton Dickinson Biosciences, Сан-Хосе, США).

Выбор реагентов

Панели реагентов для анализа костного мозга отличаются таким же разнообразием, что и лаборатории, которые проводят такой анализ. К настоящему времени стандартизация комбинаций реагентов находится на низком уровне, вследствие отсутствия консенсуса по использованию данных в клинической практике. Клетки-предшественники можно определять, используя несколько комбинаций антител в составе более широкой панели реагентов для оценки клеточного состава КМ. Для определения клеток-предшественников требуется большое число антител, т.к. любой единственный АГ может быть потерян или экспрессирован незначительно в процессе злокачественной трансформации [2]. Поэтому просто регистрировать пропорции CD34-положительных клеток как единственный показатель незрелых клеток в образце некорректно, поскольку этот АГ может присутствовать на поверхности лимфоидных и миелоидных предшественников, а также слабо эк на рис. 1.заться зрелыми базофилами [4]. Выделение гейта CD45/SSC (боковое светорассеяние) рекомендуется для облегчения анализа данных и полного исключения других линий [5–8]. Преимущество CD45/SSC как параметра выделения гейта при анализе аспиратов КМ состоит в возможности получения максимальной информации при использовании единственного реагента [9].

Smaller volumes of aspirated specimens should be encouraged as hemodilution affects the final calculations. Immunofluorescence staining should be performed using reagents titred to yield maximum and reproducible fluorescence intensities. Erythrocyte lysis should be performed using reagents that do not affect the light scattering properties [2; 3]. A procedure using the sequence of stain, lyse, wash, fix has the advantage of the antibody exposure to the cells in the presence of high concentrations of normal human plasma reducing non specific staining. All specimens should be routinely fixed with 0.5% paraformaldehyde to reduce biohazard exposure and to preserve the sample. Analysis on the flow cytometer should be accomplished as soon as possible after staining to reduce the increase in autofluorescence that occurs over time after fixation.

Instrument Standardization

The set up and operation of the flow cytometer is somewhat dependent on the manufacturer and model of the instrument. Procedures must be in place to insure optimal and consistent sensitivity in each channel from day to day. The quality control (QC) of the instrument including fluorescence spectral compensation must be documented demonstrating identical results on a daily basis. (The data presented in this manuscript were collected on a FACS Calibur, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA.)

Reagent Selection

The panels of reagents used in the analysis of bone marrow are as varied as the laboratories that perform these tests. Little standardization of reagent combinations has been achieved as a consequence of a lack of consensus of how to use these data in a clinical setting. Progenitor cells can be identified using several combinations of antibodies, as part of a more extensive panel of reagents used to assess bone marrow composition. The detection of progenitor cells requires redundancy as any single antigen may be lost or inappropriately expressed during neoplastic transformation [2.] Therefore, it is inadequate to simply report the proportions of CD34 positive cells as the only measure of immature cells in the specimen as this antigen is expressed on lymphoid and myeloid precursors as well as dimly expressed on mature basophils [4.] CD45/SSC (right angle light scatter) gating is recommended to facilitate data analysis and full discrimination of different lineages [5–8]. The advantage of CD45/SSC as a gating parameter in the analysis of bone marrow aspirates is derived from the maximum information obtained from a single reagent [9.]

При помощи этой комбинации можно выделить любую из основных клеточных линий в составе КМ, можно определить различия между клетками одной и той же линии. Поскольку динамический диапазон SSC для различных клеток в КМ настолько широк, этот параметр следует представлять скорее в виде логарифмической, а не линейной оси. Данные показаны на рис. 1А. Аспират КМ с нормальным фенотипом можно разделить на клеточные кластеры, соответствующие зрелым лимфоцитам, созревающим моноцитам, созревающим миелоидным клеткам (в том числе эозинофилам, нейтрофилам от промиелоцитарной стадии и далее, и отдельным тучным клеткам), ядродержащим эритроидным клеткам и клеткам-предшественникам. Для сравнения, образец периферической крови будет иметь только клетки в лимфоидной, моноцитарной и миелоидной областях и небольшое число базофилов в области клеток-предшественников. В образцах нормальной периферической крови отсутствуют незрелые клетки-предшественники и ядродержащие эритроидные клетки, которые могут появляться в разных пропорциях при патологических состояниях. Использовать одну комбинацию CD45/SSC для выявления незрелых клеток не рекомендуется, т.к. данная область отличается большим разнообразием и различается по составу при различных патологических состояниях и стрессе КМ. Таким образом, идентифицировать и подсчитать истинные клетки-предшественники различных линий можно используя эту комбинацию вместе с другими реагентами [4].

CD11b и HLA-DR

Все клетки-предшественники экспрессируют антиген второго класса HLA-DR. Следовательно, после определения более зрелых клеток, способных экспрессировать этот АГ, он становится отличным маркером для выделения незрелых клеток. Зрелые лимфоидные клетки, моноциты и миелоидные клетки исключаются из анализа в результате использования гейта CD45/SSC. Незрелые моноциты экспрессируют АГ CD11b на ранних стадиях развития и, следовательно, исключаются из подсчета (рис. 1В). Клетки-предшественники (CD11b⁻, HLA-DR⁺) включают клетки, которые находятся в нижней правой области графика (2,4 %) и легко отличаются от базофилов (CD11b-положительные, HLA-DR-отрицательные), которые группируются в верхней левой части графика. Клетки-предшественники, выявленные в результате использования данной комбинации, включают предшественники В-лимфоидной, моноцитарной и миелоидной линий. Для определения числа клеток-предшественников одной миелоидной линии, необходимо вычесть число В-лимфоидных предшественников (см. последующее обсуждение).

CD34 и HLA-DR

Показано, что CD34 экспрессируется на ранних клетках-предшественниках всех гематологических линий, однако использование этого АГ в качестве единственного маркера клеток-предшественников при проточной цитометрии ограничено, поскольку этот АГ может отсутствовать на всех неопластических клетках-предшественниках, либо сохраняться на более зрелых клетках.

Each of the major lineages of cells in the bone marrow can be distinguished from this combination as well as maturational differences between cells of the same lineage. Since the dynamic range of SSC for different cells is so large in bone marrow, the parameter should be displayed as a log rather than linear axis. These data are illustrated in Fig. 1A where a phenotypically normal bone marrow aspirate can be divided into cell clusters corresponding to mature lymphocytes, maturing monocytes, maturing myeloid cells (including eosinophils, neutrophils, from the promyelocyte stage onwards, and the occasional mast cell), nucleated erythroid cells, and progenitor cells. In comparison, a peripheral blood specimen will only have cells in the lymphoid, monocyte and myeloid cell regions with a few basophils residing in the progenitor cell region. Immature progenitor cells and nucleated erythroid cells are absent from normal peripheral blood specimens while they may appear at different proportions in diseased states. The combination of CD45/SSC alone to detect immature cells is not recommended as this region is heterogeneous and changes in composition with different diseases or marrow stress. Therefore, in combination with other reagents, the true progenitor cells of different lineages can be identified and enumerated [4].

CD11b vs HLA-DR

All progenitor cells express the class II antigen, HLA-DR. Therefore, by discriminating the more mature cells that express this antigen, this becomes an excellent marker for identifying these immature cells. The mature lymphoid cells, monocytes, and myeloid cells are excluded from the analysis based on the CD45/SSC progenitor cell gate. Immature monocytes express CD11b early in development, and therefore are eliminated from the enumeration (Fig. 1B). The progenitor cells (CD11b negative, HLA-DR positive) are comprised of cells that lie in the lower right region of the graph (2.4%) and can be clearly separated from basophils (CD11b positive, HLA-DR negative) which are confined to the upper left portion of the graph. The progenitor cells identified using this combination include precursors of the B lymphoid, monocyte, myeloid lineages. To obtain a progenitor count for the myeloid precursors, alone, the number of B lymphoid progenitor cells must be subtracted, see following discussion.

CD34 vs HLA-DR

Although CD34 has been shown to be expressed on early progenitor cells of all hematopoietic lineages, its utility as the sole measure of progenitor cells in flow cytometry is limited as this antigen may be lost from neoplastic progenitor cells, or it may be retained on more maturing cells.

Кроме того, зрелые базофилы экспрессируют CD34 в малых количествах, что может привести к существенным различиям в результатах анализа в зависимости от того, включены в анализ эти клетки или нет. Базофилы не экспрессируют HLA-DR и поэтому могут определяться при использовании этой комбинации в верхней левой части графика (рис. 1С). Тогда, истинные CD34-положительные клетки-предшественники находятся в верхней правой области графика и включают предшественники лимфоидных и миелоидных клеток. И опять, по этому графику необходимо различить миелоидные и В-лимфоидные предшественники, т.к. клетки обеих этих линий экспрессируют CD34.

CD117

Миелоидные и эритроидные предшественники экспрессируют CD117, впоследствии на промиелоцитарной стадии развития нейтрофилов и нормобластной стадии созревания клеток эритроидной линии этот антиген теряется. Он также утрачивается на ранних этапах созревания моноцитов, дендритных клеток и базофилов. Преимущество CD117 по сравнению с другими двумя комбинациями реагентов состоит в том, что он не экспрессируется на В-лимфоидных предшественниках. Однако очень важно определить предшественники гранулярных нейтрофилов, экспрессирующих CD117 (повышение уровня SSC), т.к. этот АГ сохраняется на данных клетках после исчезновения CD34 и HLA-DR (Рис. 1D). Аналогично, исключаются эритроидные клетки с низким уровнем экспрессии CD45, т.к. этот АГ экспрессируется также и созревающими клетками эритроидного ряда. Гейт CD45/SSC при анализе клеток-предшественников используется для исключения этих более поздних клеток, что обеспечит сравнение результатов по этому и другим АГ.

Подсчет клеток-предшественников по рассмотренным трем комбинациям дает три независимых показателя для незрелых клеток в составе КМ. Как видно из Рис. 1B–D, пропорции клеток-предшественников должны быть довольно сходными. Регистрируют среднее число клеток-предшественников или максимальное значение. В заключении лабораторного исследования необходимо указать метод подсчета, например, миелоидные предшественники, 2,1 % (CD117-положительные клетки).

Определение В-лимфоидных предшественников

В-лимфоидные клетки-предшественники в составе костного мозга легко определяются при помощи АГ CD19 в комбинации с CD45/SSC (рис. 2A). Эти предшественники В-клеток объединяют стадии I и II развития В-лимфоидных клеток [10]. Следует отметить, что CD34 экспрессируется только на той части предшественников В-клеток, которая находится в первой стадии развития [10]. Поскольку предшественники В-клеток экспрессируют HLA-DR в стадиях как I, так и II, для получения числа миелоидных предшественников необходимо подсчитать обе группы указанных клеток и вычесть полученные значения из числа CD11b/HL-DR⁺клеток.

In addition, mature basophils do express low levels of CD34 which can cause significant differences in results between laboratories depending on whether or not these cells are included in the analysis. Basophils lack expression of HLA-DR and therefore can be identified in this combination in the upper left portion of the data (Fig. 1C). True CD34 positive progenitor cells, then, lie in the upper right cell cluster and include precursors of lymphoid and myeloid cells. Again, distinction between myeloid and B lymphoid progenitor cells must be calculated from this plot as cells from both lineages express CD34.

CD117

Myeloid and erythroid precursors express CD117 which is then lost during the promyelocyte stage of neutrophil development and normoblast stage of erythroid maturation. This antigen is lost early in the maturation of monocytes, dendritic cells and basophils. CD117 has the advantage over the other two reagent combinations in that it is not expressed on B lymphoid precursors. However, it is essential to distinguish granular neutrophil precursors that express CD117 (increased SSC) as this antigen remains on these cells after CD34 and HLA-DR are lost (Fig. 1D). Similarly, the erythroid cells that express lower levels of CD45 must also be excluded as this antigen is retained on the maturing erythroid cells as well. The CD45/SSC gate on progenitor cells is used to exclude these later cells from the analysis thereby providing a means of comparing results of this antigen to the others.

The enumeration of progenitor cells using these three combinations provides three independent measures of the immature cells of the marrow. The proportions of progenitor cells should be very similar as illustrated in Fig. 1B–D. The average progenitor cell count or the highest number can be used for the report. The method used for enumeration should be noted in subsequent laboratory reports, e.g. myeloid progenitors, 2.1% (CD117 positive cells).

Identifying B lymphoid precursors

The B lymphoid progenitor cells in a bone marrow are easily identified using CD19 in combination with CD45/SSC, Fig. 2A. These B cell precursors comprise both Stage I and Stage II of B lymphoid development [10]. It should be noted that only a portion of the B cell progenitor cells, restricted to Stage I, express CD34 [10]. As both Stage I and Stage II B cell precursors express HLA-DR, both must be counted to be subtracted from the CD11b/HLA-DR determination to achieve a myeloid progenitor cell count.

Предшественники В-клеток, экспрессирующие CD19 и CD34, можно также определить и дифференцировать от CD34-положительных миелоидных клеток по низкому уровню SSC (рис. 2B). Таким образом, клетки, экспрессирующие CD34, можно классифицировать как лимфоидные или миелоидные. Затем пропорции CD34⁺ миелоидных клеток можно сравнить с пропорциями клеток, экспрессирующих HLA-DR без CD11b, и CD117⁺ клеток-предшественников.

Вычисления

В связи с тем, что число ядросодержащих эритроидных клеток, сохранившихся после лизиса зрелых эритроцитов, может варьировать, для выражения пропорции клеток-предшественников необходимо использовать стандартную, воспроизводимую основу. Если использовать отношение клеток-предшественников к **неэритроидным клеткам**, можно обойти проблему вариабельности эритроцитарного состава костного мозга в образце. Несмотря на преимущество подсчета числа предшественников в отношении к ядросодержащим клеткам, такой способ подсчета использовать нельзя из-за переменного числа эритроидных клеток, обусловленного обработкой образца. Как показано на рис. 1A, пропорцию неэритроидных клеток в КМ легко получить из графика CD45/SSC. Знаменатели (т. е. CD45⁺ клетки и ядросодержащие клетки), использованные в расчетах, определяют значительную разницу между числом клеток-предшественников и числом бластных клеток, полученным в результате морфологического анализа. Число бластных клеток, полученное морфологически, можно непосредственно привести к значению, сходному с числом клеток-предшественников, полученным проточноцитометрическим методом, путем пересчета по отношению к неэритроидным ядросодержащим клеткам.

Гемодилюция

Свой вклад в расхождение значений числа бластных клеток, полученного в результате морфологического анализа, и числа клеток-предшественников, полученного проточноцитометрическим методом, вносит и сам образец. Морфологи выбирают из образца ту часть, в которой хорошо представлены костномозговые элементы и хорошо выражена морфологическая структура. Влияние гемодилюции можно минимизировать, если выбрать для анализа только часть образца в непосредственной близости к щетке.

В то же время, образец проточной цитометрии отличается гетерогенностью и часто содержит разное количество периферической крови. Это особенно явно при анализе второго, третьего и последующих аспириатов. Таким образом, очень важно выявлять разбавление образца периферической кровью и вносить соответствующую поправку на данный артефакт. Достаточно просто различить зрелые нейтрофилы от созревающих нейтрофилов по интенсивности (рис. 3) флюоресценции CD16 (и/или CD13) [11]. Среднее содержание зрелых нейтрофилов в биоптатах КМ (при минимальном содержании крови) составляет $17 \pm 6,7$ % [11].

The B cell precursors expressing CD19 and CD34 can also be identified and discriminated from myeloid cells expressing CD34 by their low SSC. Figure 2B. Therefore, the cells expressing CD34 can be readily classified as to lymphoid or myeloid based on this display. The proportions of myeloid cells expressing CD34 can then be compared to the proportions expressing HLA-DR without CD11b and to the CD117 positive progenitor cells.

Calculations

Since there is variable recovery of nucleated erythroid cells after lysis of the mature erythrocytes, the proportions of progenitor cells must be expressed based on a standard, reproducible basis. The problem of variable erythrocyte composition of the specimen can be circumvented by calculating the progenitor cells per **non-erythroid cell**. Although it would be advantageous to calculate the proportions of progenitor cells per nucleated cell, the variation due to sample processing of included erythroid cells precludes this calculation. The proportion of non-erythroid cells in the bone marrow can be easily obtained from the CD45/SSC plot as shown in Fig. 1A. Therefore, a significant difference arises between progenitor cell counts and morphologic blast counts based on the denominators (i.e. CD45⁺ cells vs nucleated cells) used for the calculation. It is straight forward to convert the morphologic blast count to be similar to the flow cytometry progenitor cell count by recalculating the blast cell count to be based on non-erythroid nucleated cells.

Hemodilution

An additional difference between morphologic blast counts and flow cytometric progenitor cell counts is the specimen itself. The morphologist selects a portion of the slide with a good spicule and good morphology. Hemodilution is minimized by assessing only a portion of the slide that is in close proximity to the spicule.

In contrast, the specimen provided to flow cytometry is heterogeneous and often variably contaminated with blood. This is especially true for second and third, or the larger, aspirate pulls. Therefore, it is important to recognize when a specimen has been diluted with blood and attempt to correct for this artifact. Using the intensity of CD16 (and/or CD13) it is relatively easy to distinguish mature neutrophils from maturing (Fig. 3) neutrophils, [11]. The average proportion of these mature neutrophils in bone marrow biopsies (assumed to have minimal blood contamination) is $17\% \pm 6.7$ [11].

Следовательно, выявить избыточное количество зрелых нейтрофилов в образце для проточной цитометрии можно просто подсчитав число ярких CD16⁺ миелоидных клеток. Если число ярких CD16⁺ зрелых нейтрофилов меньше 30 % (± 2), образец не отличается от биоптата КМ и не сильно разжижен кровью. Однако, если ярких CD16⁺ клеток больше 30 %, образец скорее всего разбавлен кровью. Для «нормализации» числа клеток-предшественников необходимо внести поправку на гемодилуцию, чтобы довести образец до состояния, соответствующего биоптату КМ. Для корректировки числа клеток-предшественников на гемодилуцию можно использовать простую формулу, в основе которой лежит допущение, что пропорция dimCD16 созревающих миелоидных клеток (незрелых миелоидных клеток) в биоптате составляет 80 % .

$$\frac{80\% \times \text{число клеток - предшественников}}{\% \text{dimCD16 миелоидных клеток}} = \text{нормализованное число клеток - предшественников}$$

При использовании этой формулы исходят из предположения, что в периферической крови не содержится dimCD16⁺ клеток, что легко проверить, путем обработки образца крови пациента с образцом КМ.

Заключение

Подсчет числа клеток-предшественников методом проточной цитометрии представляет собой мощный инструмент определения состава аспиратов КМ. Этот способ имеет преимущества объективной оценки клеток-предшественников разных линий, получения высоких значений числа клеток, что исключает статистические погрешности, и возможности дифференциации нормальных и патологически измененных предшественников. Метод позволяет получить совокупность параметров, отличных от результатов подсчета бластных клеток при морфологическом исследовании, и не следует ожидать, что эти показатели будут идентичными. Тем не менее, необходимо стремиться к тому, чтобы свести значения числа бластных клеток и числа клеток предшественников как можно ближе друг к другу, например, путем морфологического определения незритроидных популяций. Добиться того, чтобы данная методика стала единообразной и была принята в клинической практике, можно только путем стандартизации процедуры подсчета в разных лабораториях. Когда процедура подсчета будет согласована между лабораториями, корреляция лабораторных данных и исхода заболевания продемонстрирует возможности и преимущества этой технологии, а также ее роль в диагностике гематологических нарушений. Одним из дополнительных важных преимуществ единой технологии проточной цитометрии является то, что она может стать основой для детальных сравнений КМ в норме и при различных патологиях (злокачественные заболевания и миелодиспластические состояния). Эти исследования совместно с определением скорости сокращения числа бластных клеток в процессе лечения и диагностикой минимального остаточного заболевания станут основой современной лабораторной службы в гематологии.

Therefore, it is possible to assess whether or not the flow cytometric specimen has excess mature neutrophils simply by counting the bright CD16 positive myeloid cells. If there are less than 30% bright CD16 mature neutrophils (± 2 SD), the specimen is indistinguishable from a bone marrow biopsy and therefore is not diluted significantly with blood. However, if there are more than 30% bright CD16 positive cells, the specimen most likely has been diluted by blood. A correction for the amount of dilution can be made in order to «normalize» the progenitor cell counts to what would be expected if the specimen were a biopsy. A simple formula used to adjust the progenitor cell count to help account for the hemodilution is based on the proportion of dim CD16 maturing myeloid cells (the immature myeloid cells) for biopsies to be 80%.

$$\frac{80\% \times \text{Progenitor Cell Count}}{\% \text{dimCD16 myeloid cells}} = \text{Normalize Progenitor Cell Count}$$

In using this formula, it is assumed that there are no immature, dim CD16 positive cells in the peripheral blood, which can easily be tested by processing the patient's blood sample with the marrow specimen.

Summary

Flow cytometric enumeration of progenitor cells is a powerful method of determining the composition of bone marrow aspirates. This procedure has the advantages of objective definition of progenitor cells of various lineages, high cell numbers to reduce statistical errors, and the ability to distinguish between normal and abnormal precursors. This measure should be considered to provide a different set of parameters from the morphologic blast counts and should not be expected to be identical. Nevertheless, efforts can be made, e.g. by evaluating the percentages of non-erythroid populations by morphology, to bring the blast counts and progenitor counts closer to each other. Only by standardizing this counting of progenitor cells between laboratories will the technology be consistent enough to be accepted as a uniform clinical test. Once there is consistency in the determination of this important population, the correlation between the laboratory data and patient outcome will demonstrate both the power and the advantages of the technology and its value in assessing patients with hematologic abnormalities. One particular extra advantage of the uniform flow cytometric technology is that it then forms the basis of detailed comparisons between the normal bone marrow with the various disease states such as malignancies and myelodysplastic conditions. These steps, together with the detection of the speed of how the blasts cells are decreased in number on treatment as well as the identification of residual minimal disease, form the basis of the modern laboratory service in hematopathology.

Литература

1. *Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
2. *Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA.* Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk Res* 2007.
3. *van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124-34.
4. *Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA.* Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 2008;32:5-17.
5. *Stelzer GT, Shults KE, Loken MR.* CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:265-80.
6. *Loken MR, Wells DA.* Normal antigen expression in hematopoiesis: Basis for interpreting leukemia phenotypes. . In: Stewart C, Nicholson J, eds. *Immunophenotyping*. New York: Wiley Liss, Inc; 2000:133-60.
7. *Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT.* Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 1993;100:534-40.
8. *Lacombe F, Durrieu F, Briais A, et al.* Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1878-86.
9. *Shah VO, Civin CI, Loken MR.* Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol* 1988;140:1861-7.
10. *Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI.* Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;70:1316-24.
11. *Loken MR, Chu SC, Fritschle W, Kalnoski M, Wells DA.* Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;76B:27-36.

References

1. *Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
2. *Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA.* Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk Res* 2007.
3. *van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124-34.
4. *Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA.* Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 2008;32:5-17.
5. *Stelzer GT, Shults KE, Loken MR.* CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:265-80.
6. *Loken MR, Wells DA.* Normal antigen expression in hematopoiesis: Basis for interpreting leukemia phenotypes. . In: Stewart C, Nicholson J, eds. *Immunophenotyping*. New York: Wiley Liss, Inc; 2000:133-60.
7. *Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT.* Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 1993;100:534-40.
8. *Lacombe F, Durrieu F, Briais A, et al.* Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1878-86.
9. *Shah VO, Civin CI, Loken MR.* Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol* 1988;140:1861-7.
10. *Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI.* Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;70:1316-24.
11. *Loken MR, Chu SC, Fritschle W, Kalnoski M, Wells DA.* Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;76B:27-36.

Michael J. Borowitz

MINIMAL RESIDUAL DISEASE DETECTION IN CHILDHOOD ALL

Johns Hopkins Medical Institutions

Introduction

Although the outcome of children with acute lymphoblastic leukemia has improved, many children still relapse and succumb to their disease. Many biologic factors have been shown to predict which children are more likely to relapse [1–7]. For a long time it has been known that response to initial therapy is of great importance [8; 9]. More recently, it has become clear that one of the most powerful prognostic factors is the presence of small numbers of leukemic cells (minimal residual disease, MRD) following therapy [10–18].

MRD in ALL is typically detected by one of two methods: molecular methods using the polymerase chain reaction (PCR), or flow cytometry. PCR methods take advantage of the fact that essentially all cases of ALL have unique clonal rearrangements that can be specifically amplified and detected even when they are present in very low numbers [19–23]. In order to achieve clinically relevant sensitivity, however, it is necessary to design clone-specific reagents to amplify and detect the unique clonal sequences. Flow cytometry, by contrast, takes advantage of the fact that leukemic cells have a phenotypic signature that differs from those of normal cells, which can be recognized in appropriately designed multiparameter analyses of data [24–27]. Each technique has advantages and disadvantages.

The PCR technique has been standardized and is highly reproducible [20; 23; 28; 29]. It is more sensitive than flow cytometry, and typically able to detect 1 clonal cell in 10^5 normal cells [20; 21; 30; 31]. By contrast, flow cytometry typically only achieves a sensitivity of $1/10^4$ [12; 24; 25; 27; 32; 33], and there has been much less standardization [34; 35], so that interpretation of results is very dependent upon the skill of the laboratory performing the assay.

However, a disadvantage to molecular methods is that they are relatively expensive and time consuming; the initial pretreatment sample must be available, and the clonal rearrangement sequenced and allele-specific oligonucleotides produced that are essential necessary for amplification of the tumor-specific sequence. As a consequence, it is difficult to measure MRD very early in therapy as synthesis and validation of the specific probes takes time.

However, once these are available, the marginal cost of assaying additional specimens at multiple time points is very low. Flow cytometry, on the other hand, can be done rapidly, with results typically available the same day a specimen is received, so that it is feasible to adjust therapy early in the course of treatment based on flow MRD results.

In addition, though it is not desirable, it is possible to do flow MRD even without having a diagnostic signature, as many of the phenotypic aberrancies can be readily recognized even without knowing specifically what one is looking for.

Both techniques have the potential pitfall of changes in the unique signature over time. In the case of PCR the effect of this clonal evolution is mitigated by monitoring more than one marker [21; 22; 36]; with flow cytometry, analysis strategies need to be tailored to look for any abnormal population, rather than just a population with a phenotype identical to that seen at diagnosis [24; 25; 37; 38].

In this article, we will further discuss applications of flow cytometry, emphasizing the experience that we have had doing ALL MRD studies in the Children's Oncology Group (COG).

Technical considerations

Bone marrow is the preferred sample for MRD analysis. In T-ALL, blood and marrow give approximately similar results, but this is not true for B-ALL so marrow is essential for that disease [39]. Hemodilution from blood is a potential problem if a large volume of marrow is aspirated, so that this should be avoided. Studies have been published using either ficoll samples, or lysed whole marrow, though the latter is faster.

Critical to MRD studies is the acquisition of sufficient T-cells to achieve a sensitivity of at least $1/10^4$ (0.01 %). We typically collect at least 500,000–750,000 total events, which gives us a significant margin for achieving this sensitivity in case there is debris that is acquired along with cells.

Typically we can detect abnormal populations of as few as 10–20 events, so that in practice our sensitivity is considerably greater than 0.01 %; however, we only report as positive populations that are >0.01 %.

Also critical is the design of informative combinations of antibodies, and appropriate multiparameter analysis. Our original studies of B-ALL in the COG used 4-color flow cytometry with two tubes providing diagnostic information in the great majority of cases [27].

Combinations included CD20-FITC/CD10-PE/CD45-PerCP/CD19-APC; and CD34-FITC/CD9-PE/CD45-PerCP/CD19-APC. Additional informative markers used in some cases included CD58, CD38 and TdT. More recently, the COG has incorporated additional markers in 6 color flow cytometry and has improved the specificity of detection of abnormal populations.

These combinations include:

CD20-FITC/CD10-PE/CD38-PerCPCy5.5/CD58-APC/CD19-PECy7/CD45-APCH7;
CD9-FITC/CD13+33-PE/CD34-PerCPCy5.5/CD10-APC/CD19-PECy7/CD45-APCH7.

The best analysis strategies rely on sequential multiparameter gates. CD19, vs SSC is a useful initial gate, but this should be further refined using additional markers such as CD45 or CD10.

In some cases, markers can be used to exclude irrelevant populations. For example, if a broad CD19 gate is used as an initial gates myeloblasts that contaminate the gate will have dimmer CD19 and be positive for CD34 and bright CD13 and CD33, and can be excluded in subsequent gates. Examples of flow cytometric plots with MRD populations are shown below.

T-ALL is generally more difficult to analyze than B-ALL, and although recommendations have been made for standard panels[26], 4 and 6-color combinations are less well standardized in our laboratory. Most T-ALLs express markers of immaturity including CD99[40], TdT, or, in some cases, CD34. In contrast to B-ALL, there are essentially never normal immature T-cells seen in marrow [41]. However, as discussed further below, administration of steroids to children with ALL will frequently result in maturation of leukemic blasts so that MRD may have a more mature phenotype than at diagnosis [38]. A consequence of this in T-ALL patients is that these useful immature markers are lost, so even though they are relatively tumor-specific, they may not be optimal for MRD detection. Most cases of T-ALL, however, either lack surface CD3(sCD3) or express it at low levels, so it can be combined with other T-cell markers such as CD5, or especially cytoplasmic CD3 (cCD3) to identify abnormal populations; in other cases, CD5 is abnormally expressed(42) and this may be a useful marker of MRD as well. Care must also be taken in quantitation of MRD. While it is relatively easy to use multiparameter gating to identify and count events that fulfill criteria for abnormal cells, the problem of what to use for the denominator is more challenging than it might seem at first glance. In our studies, though we use a whole-marrow-lysis technique, we report our results as a percentage of mononuclear cells, which we determine on a display of CD45 vs right angle scatter, excluding cells that fall in the myeloid window. This has the advantage of making our numbers more directly referable to molecular studies that employ only ficolled cells (as well as to other flow cytometry studies that use ficoll), and also is less subject to problems related to variable loss of granulocytes in specimens shipped to our lab. Early in therapy there is typically little granulocyte recovery and values obtained using all cells compared to mononuclear cells are not that different; however later in therapy, large numbers of granulocytes may result in a significant correction with this method.

The other concern we have is making sure that we exclude events that represent debris; for this purpose we use a DNA-binding dye. Because we have not found a satisfactory dye that works with our existing 6 color combinations, we use a third tube containing SYTO16, which emits in FL1, as first employed by Dworzak [18]. This tube also contains CD19, so that we can express CD19 as a percent of nucleated cells; our MRD results are then expressed as a % of CD19 positive cells and then overall MRD percent calculated. We also add CD45, CD3 and CD71 to the tube as this allows us to estimate the numbers of T-cells and nucleated red cells, as these two parameters give us some idea about hemodilution and thus the quality of the sample.

Interpretation of flow cytometry results for MRD in bone marrow samples

Before undertaking MRD analysis, it is important to obtain a good working knowledge of the patterns seen in normal, and also in regenerating marrows. The latter show increased numbers of B cell precursors (hematogones), but the pattern of antigen expression of these is very consistent. Different stages of B cell development can be identified, and while all regenerating marrows will follow the same path of maturation, the proportion of cells in different stages may differ between cases.

Fig. 1 and 2 show an example of a bone marrow with an increase in normal B cell precursors (red). Also shown are examples of 2 cases of B-ALL (blue or green) superimposed on the pattern seen in normal marrow. It can be seen that the phenotype of these cases, and indeed most cases of ALL, differs significantly from that of normal marrow precursors in some, though not necessarily all, dual-parameter projections. In Fig. 1, CD20 expression in the leukemia shows the same broad pattern of expression that characterizes normal maturation. However, CD10 is overexpressed relative to CD20. CD45 in this case is relatively bright, so that this is not a particularly useful marker for distinguishing normal and abnormal. However, CD38, either in combination with CD10 and especially with CD58, are the best displays in this case for separating normal and abnormal, because CD58 is relatively overexpressed and CD38 underexpressed compared to normal.

In fig. 2 the display of CD45 vs CD10 is useful for distinguishing normal and abnormal; this is typical of the majority of cases of ALL. This case also overexpresses CD10. Also, this case has relatively homogeneous expression of CD34 and CD9. This is in contrast to what is seen in normal, where these two markers are typically variably expressed so that seeing a complex pattern on a CD34 vs CD9 display favors normal.

When analyzing a case for MRD it is important to take advantage of the knowledge of normal differentiation, and also useful to know the initial phenotype. An example of B ALL MRD is shown in Fig. 3. Gating was first done on CD19 vs SSC and then refined on a gate of CD19 vs CD45, and only B cells displayed. In this case there is a small amount of MRD (about 0.6%) displayed in blue. Normal mature B cells are in green, and the pretreatment phenotype of the leukemia displayed in orange. In this case the phenotype of the MRD is clearly abnormal (compare to the normal cells in fig. 1) and very similar to that seen initially.

However, in many cases, patients who are treated with steroids will show maturation of their leukemic blasts, so that MRD can have a phenotype that is considerably different from that seen before treatment. This is particularly true when this is measured at the end of induction. Such a case is shown in Fig. 4. Here there has been considerable maturation of the MRD cells (blue), with acquisition of both CD45 and CD20, giving a pattern that is much closer to normal hematogones. Fortunately, looking at other markers makes it easier to recognize the MRD. CD58 and CD38 are essentially unchanged from diagnosis, and very different from normal, while CD34 is only slightly decreased in intensity, and the aberrant expression of myeloid antigens seen at diagnosis is retained.

Fig. 4 shows an example of T ALL MRD. CD7 is used for gating purposes. Normal T-cells and NK cells (CD3-negative, CD7+) are shown in green, and the MRD in blue. In this case the leukemic blasts are slightly dimmer CD45 and brighter CD7 compared to normal cells, but this is not seen in all cases. However, CD3 is typically underexpressed in most cases of T-ALL, so that MRD can often be recognized on displays of CD5 vs CD3, or especially cytoplasmic CD3 vs surface CD3.

Some NK cells can show up in these regions, however, so to achieve high sensitivity MRD detection it is good to add NK markers including CD56 and CD16, as these are rarely seen in T-ALL and so can be used to exclude small numbers of NK cells in multiparameter gating. Finally, CD99 overexpression is preserved in this case and makes identification of MRD relatively easy. However, as noted above, maturation of MRD is often seen, and CD99 frequently lost, so absence of CD99 does not exclude MRD.

Clinical significance of MRD detection

MRD has been shown to be a strong prognostic factor that predicts relapse [10; 12; 13; 16–18; 31; 43–51]. In our own studies, patients with B-ALL who had MRD at the end of induction therapy fared significantly worse than those who didn't, with those having higher levels having a worse outcome than those with lower levels. Specifically, in our series of nearly 2000 patients [13], those with MRD < 0.01 % had an 88 ± 1 % 5 year event free survival; those between 0.01 % and 0.1 % 59 ± 5 %; 0.1 % and 1 % 49 ± 6 %; and > 1% 30 ± 8 % ($p < 0.001$).

Prognostic significance was maintained when the effect was looked at separately in good or poor risk patients, or among patients with favorable prognostic features. Interestingly, not all patients who were MRD positive relapsed early; MRD at the end of induction was equally predictive of both early and late (>3 years) relapse. However, bone marrow MRD predicted marrow, but not CNS relapse.

In multivariate analysis that included NCI risk group, presence of favorable cytogenetic features, or presence of marrow response by morphology, MRD was the most powerful prognostic factor, with a hazard ratio of 4.3.

These results are very similar to those of several other studies looking at MRD at the end of induction therapy using either flow cytometry [10; 17; 18; 44; 52] or molecular methods [11; 16; 31; 43; 45; 48].

When should MRD be measured?

MRD has been shown to be prognostic in ALL almost any time it is measured, even late in therapy [46] though generally speaking, more informative measurements are made earlier in therapy. There are two reasons for this. First, the longer you go out into therapy, the fewer patients who are MRD positive, so that you may miss patients destined to relapse. Second, most successful interventions in therapy have come from intensification relatively early in the course [53].

In addition, the cutoff level for prognostic significance may be different at different points in therapy.

With molecular methods of MRD detection, the BFM group divides children into three risk groups based on MRD measurements at day 33 and day 78 after the start of therapy: patients who are MRD negative below 1×10^{-4} at day 33 are categorized as standard risk, those who are $> 10^{-3}$ at day 78 as high risk, while others are intermediate risk [16]. Note that the significance of positivity at a particular level of MRD is different at different time points.

In our current studies, patients who are $>0.1\%$ at day 29 are considered higher risk and offered intensive therapy, while those who are $>1\%$ at day 43 are considered very high risk and removed from standard therapy; a similar strategy is also used at day 42 in St. Jude studies that also use flow cytometry [54].

More recently, laboratories using flow cytometry to detect MRD have taken advantage of its ease of performance to study samples even earlier in therapy. Studies have been done at day 15 or day 19 of therapy looking at bone marrow[10; 44], and in our studies, at day 8 of therapy looking at blood. Because patients with MRD tend to have higher levels earlier in therapy, and because B cell regeneration is less of a problem at these times, the relatively lower sensitivity of flow compared to molecular methods is less of an issue; thus, relatively straightforward analytical approaches are useful here[55–57]. In contrast to studies performed later in therapy, patients with low levels of MRD at these times do not fare that poorly; a major use of these measurements is to identify patients who fare very well. In BFM studies, patients with $<0.1\%$ MRD at day 15 had a 7.5 % relapse rate [10]; in the St. Jude studies those with $<0.01\%$ at day 19 had a 4.8 % relapse rate [44]; in the COG studies we found patients with $<0.01\%$ MRD at day 8 to have a 10 % relapse rate, though when we looked only at standard risk patients with favorable genetics the rate fell to 3 % [13]. Patients with very high levels of MRD early in therapy do have a high probability of relapse, however [10;13], and while such patients are also more likely to continue to be MRD positive at later time points, in our studies patients who had day 8 blood $>1\%$ but day 29 marrow $<0.01\%$ had only a $79\pm 4\%$ 5 y EFS rate compared to $90\pm 1\%$ ($p<0.001$) for those who were end induction marrow negative and also day 8 blood $<1\%$.

Our plans for risk assignment in our future studies will incorporate both day 8 blood MRD measurements and day 29 marrow MRD measurements, along with standard age and white count criteria as well as cytogenetic findings. Patients with favorable cytogenetics and good age and white count criteria who are MRD negative at both day 8 and day 29 will be considered good risk and treated with minimal therapy, while all patients with day 29 MRD $>0.01\%$ will be considered very high risk. The remaining patients will be divided into two different risk groups based on age, white count, cytogenetics and day 8 MRD levels. In this way we hope to tailor intensive therapy to those who need it most, and not give patients with a high probability of cure more toxic therapy than would be necessary.

Conclusions

MRD in ALL is a clinically relevant measurement that is readily performed by flow cytometry. However, correct interpretation of results requires a good understanding of phenotypic properties of normal cells, as well as changes in phenotype of leukemic cells that are likely to occur following therapy. However, once these are understood, relatively simple antibody panels and relatively straightforward analysis can provide information that is very important for patient management.

Acknowledgements

I am grateful to my collaborators in the Children's Oncology Group who have worked with me in all our MRD studies. These include especially Drs. Brent Wood, my flow MRD collaborator; the large number of clinical investigators who direct the various clinical studies, and most especially Drs. Stephen Hunger, Elizabeth Raetz, Mignon Loh and William Carroll; our statistician Dr. Meenakshi Devidas; and Drs Cheryl Willman and Drew Carroll responsible for developing all the genetic studies that also contribute to classification.

Reference

1. *Clausen N, Scheibel E, Nyboe J.* Prognostic factors for relapse-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Scand J Haematol* 1984;33:295-300.
2. *Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, Look AT, Borowitz MJ, Crist WM, et al.* Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1992 Jun 15;79(12):3316-24.
3. *Pieters R, Kaspers GJ, van Wering ER, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, et al.* Cellular drug resistance profiles that might explain the prognostic value of immunophenotype and age in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993;7:392-7.
4. *Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA, Raimondi SC, Evans WE, et al.* TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol* 1997 Mar;15(3):1150-7.
5. *Schrapppe M, Arico M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V, et al.* Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood* 1998 Oct 15;92(8):2730-41.
6. *Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al.* Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007 Feb 1;109(3):926-35.
7. *Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996 Jan;14(1):18-24.
8. *Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, et al.* Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer* 1997 Nov 1;80(9):1717-26.

9. *Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, Cherlow JM, Grossman NJ, Kersy JH, et al.* Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia—the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996 Feb;14(2):389-98.
10. *Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, et al.* Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009 Nov 1;27(31):5168-74.
11. *Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, d'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, et al.* Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 2000 Nov;14(11):1939-43.
12. *Bjorklund E, Mazur J, Soderhall S, Porwit-MacDonald A.* Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003 Jan;17(1):138-48.
13. *Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008 Jun 15;111(12):5477-85.
14. *Campana D, Coustan-Smith E.* Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol* 2004;112(1-2):8-15.
15. *Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al.* Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998 Dec;16(12):3774-81.
16. *Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, et al.* Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010 Feb 12.
17. *Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al.* Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000 Oct 15;96(8):2691-6.
18. *Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al.* Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002 Mar 15;99(6):1952-8.

19. *Bruggemann M, Van DV, V, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, et al.* Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004 Apr;18(4):709-19.
20. *Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al.* Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999 Jan;13(1):110-8.
21. *Szczepanski T, Flohr T, Van DV, V, Bartram CR, van Dongen JJ.* Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002 Mar;15(1):37-57.
22. *Van Der Velden V, Cazzaniga G, Schrauder, et al.* Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007 Apr;21(4):604-11.
23. *Van Der Velden V, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ.* 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.
24. *Dworzak MN, Fritsch G, Panzer-Grumayer ER, Mann G, Gadner H.* Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: method and significance. *Leuk Lymphoma* 2000 Jul;38(3-4):295-308.
25. *Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al.* BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001 Aug;15(8):1185-92.
26. *Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, et al.* BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7⁺ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000 May;14(5):816-25.

27. *Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ.* A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. *Leukemia* 1999 Apr;13(4):558-67.
28. *Van Der Velden V, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, et al.* Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007 Apr;21(4):706-13.
29. *Bruggemann M, Schrauder A, Raff T, et al.* Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010 Mar;24(3):521-35.
30. *Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, et al.* Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004 May;18(5):934-8.
31. *van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al.* Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998 Nov 28;352(9142):1731-8.
32. *Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al.* Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998 Feb 21;351(9102):550-4.
33. *Dworzak MN, Panzer-Grumayer ER.* Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003 Sep;44(9):1445-55.
34. *Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al.* Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008 Nov;74(6):331-40.
35. *Irving J, Jesson J, Virgo P, Case M, Minto L, Eyre L, et al.* Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009 Jun;94(6):870-4.
36. *Li AH, Rosenquist R, Forestier E, et al.* Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Leuk Res* 2001 Dec;25(12):1033-45.
37. *Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N, et al.* Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the children's oncology group. *Cytometry B Clin Cytom* 2005 Nov;68(1):18-24.

38. *Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al.* Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005 Jan;19(1):49-56.
39. *Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, et al.* Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002 Oct 1;100(7):2399-402.
40. *Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Zen LD, Gaipa G, Ratei R, et al.* CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2004 Apr;18(4):703-8.
41. *Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G.* The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990;76:163-71.
42. *Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al.* Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009 Feb;10(2):147-56.
43. *Cave H, van der Werff ten Bosch, et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998 Aug 27;339(9):591-8.
44. *Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, et al.* Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002 Jul 1;100(1):52-8.
45. *Jacqy C, Delepaut B, Van DS, Vaerman JL., et al.* A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997 Jul;98(1):140-6.
46. *Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, et al.* Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003 Feb 15;21(4):704-9.
47. *Motwani J, Jesson J, Sturch E, Jones S, Eyre L, Short P, et al.* Predictive value of flow cytometric minimal residual disease analysis in childhood acute lymphoblastic leukaemia at the end of remission induction therapy: results from a single UK centre. *Br J Haematol* 2009 Jan;144(1):133-5.

48. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N, et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 2002 Feb 15;99(4):1253-8.
49. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000 Feb 1;95(3):790-4.
50. Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002 Jun 15;99(12):4386-93.
51. zur SU, Harms DO, Schluter S, Schrappe M, Goebel U, Spaar H, et al. MRD at the end of induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: outcome prediction strongly depends on the therapeutic regimen. *Leukemia* 2001 Feb;15(2):283-5.
52. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of minimal residual disease in leukemia. *Int J Oncol* 2000 Dec;17(6):1277-87.
53. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med* 1998 Jun 4;338(23):1663-71.
54. Campana D, Neale GA, Coustan-Smith E, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: the St Jude experience. *Leukemia* 2001 Feb;15(2):278-9.
55. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):97-102.
56. Howard SC, Campana D, Coustan-Smith E, Antillon FG, Bonilla M, Fu L, et al. Development of a regional flow cytometry center for diagnosis of childhood leukemia in Central America. *Leukemia* 2005 Mar;19(3):323-5.
57. Grivtsova LY, Popa AV, Serebryakova IN, Bozhieva MG, Tupitsyn NN. Detection of Minimal Residual Disease in Children with B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia with Simplified Protocol. *Haematopoiesis Immunology* 2, 9-33. 2008.

А. М. Попов^{1,2,3}, Т. Ю. Вержбицкая^{1,2}, Г. А. Цаур^{1,2}, Е. В. Шориков^{1,2},
Л. И. Савельев^{1,2,3}, Л. Г. Фечина^{1,2}

**МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ У ДЕТЕЙ
С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
ИЗ В-ЛИНЕЙНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ
ПРИ ПОМОЩИ УПРОЩЕННОГО ПОДХОДА:
ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ**

¹Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, РФ

²ГУЗ Центр организации специализированных видов медицинской помощи
«Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, РФ

³Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург, РФ

Резюме

Одним из основных методов оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) при остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) является проточная цитометрия. *E. Coustan-Smith et al.* предложили использовать для определения МОБ в середине индукционной терапии так называемый «упрощенный» трехцветный анализ с использованием комбинации антител CD19/CD10/CD34.

Сравнение результатов «упрощенного» и стандартного (4–9-цветная проточная цитометрия) подходов производилось в 134 образцах костного мозга, взятых на различных этапах терапии у 55 детей с ВП-ОЛЛ. Сравнение результатов определения МОБ двумя методами выявило, что качественно МОБ «упрощенным» методом была некорректно определена у 8,0 %, 17,6 % и 75,8 % пациентов на 15-й, 36-й и 85-й дни терапии, соответственно. Кроме того, в некоторых истинно позитивных образцах был выявлен некорректный подсчет количества остаточных опухолевых клеток относительно пороговых значений, чаще всего предлагаемых для стратификации пациентов. Таким образом, при применении «упрощенного» подхода в случае использования результатов определения МОБ для стратификации пациентов на группы риска, неправильную информацию дали бы 16,0 %, 27,4 % и 81,8 % образцов 15-го, 36-го и 85-го дней терапии соответственно.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, острый лимфобластный лейкоз, проточная цитометрия.

Результаты лечения острых лимфобластных лейкозов из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) у детей в последние десятилетия заметно улучшились [1]. Однако примерно у четверти пациентов развиваются рецидивы опухоли, что связано с сохранением опухолевых клеток в количестве, не распознаваемом стандартными цитологическими методами [2]. Совокупность этих клеток получила название минимальной остаточной болезни (МОБ).

Одним из основных методов оценки МОБ является проточная цитометрия. Прогностическая значимость уровня МОБ, определяемого данным методом, показана в рамках различных протоколов терапии [3–7]. В течение долгого времени для определения МОБ наиболее часто применялась 4-цветная проточная цитометрия [3–11]. Соответственно, четырехцветный анализ и является наиболее стандартизованным [10;11]. Однако в настоящее время все чаще применяется проточная цитометрия высокого разрешения, позволяющая одновременно анализировать экспрессию 5–9 антигенов [8;10]. При определении МОБ методом проточной цитометрии у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ), в некоторых случаях при анализе данных могут возникать сложности. Чаще всего это связано с наличием в образце нормальных ВП [3;12–15], имеющих фенотип, сходный по экспрессии многих маркеров с бластами (CD19+CD10+CD34+/-CD45dim) [3; 12; 13; 16; 17]. Считается, что во время индукционной терапии нормальные ВП в костном мозге отсутствуют [3; 14]. В области расположения бластов на точечных графиках также может регистрироваться флюоресценция, являющаяся результатом неспецифического связывания антител [3; 8; 18].

E. Coustan-Smith et al. предложили использовать для определения МОБ в середине индукционной терапии упрощенный 3 цветный анализ с использованием комбинации антител CD19/CD10/CD34 [14]. Это делается для того, чтобы существенно снизить стоимость анализа и сделать определение МОБ повсеместно возможным [14]. Данный подход основан на том, что на 19 день индукционной терапии по протоколам терапии TOTAL нормальные ВП в КМ отсутствуют, следовательно, все CD19⁺ клетки, экспрессирующие CD10 и/или CD34, являются опухолевыми [14]. Предложенный метод был позднее использован для определения МОБ на 15 день терапии у пациентов, получавших терапию по протоколу ALL-IC [15]. Однако большинство протоколов предусматривает определение МОБ также на момент окончания индукционной терапии и в одной или нескольких временных точках во время консолидации/интенсификации [3–6]. Применимость «упрощенного» подхода для мониторинга МОБ во всех временных точках, предусмотренных терапевтическими протоколами, остается невыясненной.

Цель

Оценить возможности применения метода проточной цитометрии с использованием трехцветного «упрощенного» подхода для определения МОБ на различных этапах терапии ОЛЛ у детей.

Материалы и методы

Исследование проводилось в лабораторном отделении отдела детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1 г. Екатеринбурга с января 2008 г. по ноябрь 2009 г. Были исследованы 134 образца КМ 55 пациентов с ВП-ОЛЛ, получавших терапию по протоколам ALL-MB 2002 [18], ALL-MB 2008 [18] и MLL-Baby [19].

Диагностика иммунологических вариантов ОЛЛ осуществлялась согласно общепринятым критериям [20]. В исследуемой группе у 11 пациентов диагностирован VI иммунологический вариант ОЛЛ, у 43 – VII, у 1 – VIII.

Исследовали 50 образцов, взятых на 15 день индукционной терапии, 51 образец, взятый на момент окончания индукционной терапии (36-й день терапии) и 33 образца, взятых на 85 день терапии. МОБ на 15-й и 36-й дни терапии определяли у всех пациентов. На 85 день МОБ оценивали только у пациентов групп стандартного и промежуточного риска. Сравнение производилось в образцах, которые окрашивали 6–8 моноклональными антителами в комбинациях, которые всегда включали CD19, CD10 и CD34. Проточная цитометрия выполнялась на приборах “FACS Canto II” и “FACS Aria” (Becton & Dickinson (BD), США).

Настройка проточных цитометров производилась с использованием калибровочной системы “Comp Beads” (BD). Мониторинг стабильности работы приборов осуществлялся при помощи калибровочных систем “Cytometer Setup and Tracking” (BD), “7-color Setup Beads” (BD) и “DAKO Fluorospheres” (Dako, Дания). Результаты иммунофенотипирования оценивались при помощи программного обеспечения FACS Diva 4.0–6.1 (BD). Для определения МОБ применялись моноклональные антитела, представленные в табл.

Таблица

Применявшиеся моноклональные антитела

Флуорохром	Моноклональные антитела
FITC	CD10, CD58, CD58□, CD45, CD38, CD99, CD15
PE	CD10, CD45, CD58, CD11a, CD34, CD38, CD133□□
PerCP	CD45, CD20
PerCP-Cy5.5	CD19, CD20, CD38
PE-TexasRed	CD34□
PE-Cy7	CD10, CD34
APC	CD19, CD10
APC-Cy7	CD20, CD45
AmCyan	CD45
Все антитела, если это не указано специально, произведены BD.	
– антитела производства Beckman Coulter (BC) (США);	
– антитела производства Miltenyi Biotec (Германия);	

Окрашивание первичномеченными моноклональными антителами производилось согласно инструкции производителя. После инкубации суспензии костномозговых клеток с моноклональными антителами взвесь обрабатывалась лизирующим раствором («FACS Lysing solution» BD), а затем отмывалась фосфатно-солевым буфером («Cell Wash», BD).

Позитивными считались образцы, в которых на точечных графиках определялась группа из 10 и более клеток, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, характерные для лимфоцитов/лимфобластов [3; 10]. При «упрощенном» анализе на точечных графиках CD19/CD10 и CD19/CD34 выделяли В-клетки, экспрессирующие CD10 и/или CD34. Эти клетки отображались на графике FSC/SSC (обратное гейтирование), на котором выделялись только бласты, попадающие в «лимфоцитарно-лимфобластный регион». При определении МОБ 6–8-цветной цитометрией применялся подход, основанный на рекомендациях группы AIEOP-BFM [10]. Сначала на точечном графике CD19/SSC выделяли В-клетки, а затем с учетом экспрессии всех применявшихся маркеров выделяли опухолевые клетки. После этого производили обратное гейтирование. Результат рассчитывали в виде процента содержания опухолевых клеток среди всех ядросодержащих клеток КМ.

После этого производилось качественное и количественное сопоставление результатов, полученных 3 цветной и 6–8-цветной проточной цитометрией. Количественное сравнение уровня МОБ производилось относительно величин 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, так как для разделения пациентов на группы с разным риском развития рецидива исследователи используют именно эти пороговые значения МОБ [3–7]. Ошибкой количественного определения МОБ «упрощенным» методом считался результат, отличающийся от результата 6–8-цветной проточной цитометрии относительно какого-либо из данных пороговых значений. Наличие в образце ВП определялось по типичному для нормального развития В-лимфоцитов распределению клеток на точечных графиках (рис. 1) [13;16;17].

Результаты

Качественная сходимость результатов определения МОБ при помощи «упрощенного» и стандартного подходов значительно варьировала в зависимости от этапа терапии (рис. 2). На 15 день терапии 5 (10,0 %) образцов были негативными, а 41 (82,0 %) — позитивным при использовании обоих подходов. При применении 3 цветного анализа по 2 (по 4,0 %) образца оказались ложноположительными и ложноотрицательными. Ни в одном из образцов 15 дня не были обнаружены нормальные ВП.

На 36 день терапии по результатам 3 цветной цитометрии истинно позитивными и истинно негативными были 29 (56,9 %) и 13 (25,5 %) образцов соответственно, в то время как были выявлены 1 ложнонегативный (1,9 %) и 8 ложнопозитивных (15,7 %) образцов (рис. 2). В 6 образцах (11,8 %) 36-го дня были обнаружены нормальные ВП. В 3 из 8 ложнопозитивных образцов именно нормальные ВП и были интерпретированы при использовании «упрощенного» подхода как опухолевые клетки. На 85 день терапии при помощи стандартного подхода остаточные опухолевые клетки были обнаружены в 5 (15,1 %) образцах, в то время как в 25 (75,8 %) образцах нормальные ВП были расценены при 3-цветном анализе как лейкоэмические бласты (рис 3.).

Еще у 3 (9,1 %) пациентов МОБ не была обнаружена ни одним из методов. У всех пациентов, кроме этих 3, в КМ присутствовали нормальные ВП. Среди 98 образцов, в которых не было нормальных ВП, было выявлено 3 ложноотрицательных (3,1 %) и 7 ложноположительных (7,1 %) результатов «упрощенного метода» (рис.3). Среди 36 ВП-положительных образцов истинно позитивными были только 8 образцов (22,2 %), остальные оказались ложноположительными (рис. 3). Количественное сравнение истинно позитивных результатов выявило ошибки в определении уровня МОБ «упрощенным» методом в 4 (8,0 %), 5 (9,8 %) и 2 (6,0 %) образцах на 15, 36 и 85 дни терапии соответственно.

Таким образом, при сравнение двух способов оценки МОБ («упрощенного» подхода и 6–8 цветной цитометрии) обнаружены расхождения в 16,0 %, 27,4 % и 81,8 % образцов на 15, 36 и 85 день терапии ОЛЛ соответственно.

Примеры корректного и некорректного выделения опухолевых клеток «упрощенным» методом представлены на рис. 4.

Обсуждение полученных результатов

Для успешного использования «упрощенного» подхода необходимо быть уверенным, что в данной точке наблюдения в костном мозге отсутствуют нормальные ВП. Однако, по нашим данным, уже на момент окончания индукционной терапии (36-й день) у 11,8 % пациентов начинается В-линейная регенерация. На 85 день терапии уже у подавляющего большинства детей (90,9 %) КМ заселяют ВП.

Сравнение результатов определения МОБ двумя методами выявило, что качественно МОБ «упрощенным» методом была определена неправильно у 8,0 %, 17,6 % и 75,8 % пациентов соответственно на 15, 36 и 85 дни терапии.

Причин некорректных результатов при применении «упрощенного» подхода несколько. Меньше чем в половине случаев ВП-ОЛЛ все опухолевые клетки экспрессируют оба используемых маркера [22; 23]. Хотя чаще всего опухолевая популяция гомогенно экспрессирует как минимум либо CD10, либо CD34 [22; 23], встречаются случаи, когда не все бласты экспрессируют эти антигены [14; 22; 23]. В связи с этим применение «упрощенного» подхода у таких пациентов представляется некорректным. Кроме того, экспрессия CD10 и CD34 может существенно снижаться под действием противоопухолевых препаратов [24–27], прежде всего кортикостероидов [26]. В этом случае либо вообще нельзя использовать эти антигены для определения МОБ, либо становится сложным четкое выделение всех опухолевых клеток на точечных графиках. Кроме того, для достижения рекомендованной чувствительности исследования (1×10^{-4} – 1×10^{-5}) [3–11] необходим анализ большого количества клеток [10; 11]. При этом могут определяться продукты неспецифического связывания антител [3; 8; 18]. Анализ экспрессии 6–8 антигенов позволяет четко отличить опухолевые клетки от неспецифической флюоресценции, в то время как при применении всего трех маркеров это может быть затруднительно.

Наконец, по окончании индукционной терапии КМ начинают заселять нормальные ВП. По экспрессии CD10 и CD34 эти клетки похожи на лейкозные бласты, что приводит к появлению ложноположительных результатов.

Кроме того, в некоторых истинно позитивных образцах был выявлен некорректный подсчет количества остаточных опухолевых клеток относительно пороговых значений, чаще всего предлагаемых для стратификации пациентов. Таким образом, при применении «упрощенного» подхода в случае использования результатов определения МОБ для стратификации пациентов на группы риска, неправильную информацию дали бы 16,0 %, 27,4 % и 81,8 % образцов 15, 36 и 85 дней терапии соответственно.

«Упрощенный» подход к анализу данных был разработан для определения МОБ во время индукционной терапии [14], однако даже на 15 день у 16 % исследованных пациентов «упрощенный» метод определения МОБ дал неверный результат с точки зрения возможной стратификации. Применение данного подхода на момент окончания индукционной терапии, также предлагаемое авторами [14], возможно у еще меньшего количества больных.

Таким образом, «упрощенный» подход к определению МОБ наиболее применим на 15 день терапии, однако и в этой точке наблюдения могут быть допущены ошибки. Применение данного метода на 36 день еще чаще приводит к некорректным результатам, а на 85 день использование этого подхода неприемлемо.

Литература

1. Stanula M., Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Semin. Hematol.* – 2009. – Vol. 46, – P. 52-63.
2. Moppett J., Burke G. A. A., Steward C.G. et al. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia // *J. Clin. Pathol.* – 2003. – Vol. 56, – P. 249-253.
3. Dworzak M. N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* – 2002. – Vol. 99, N6. – P. 1952-1958.
4. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F. G. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukaemia // *Blood.* – 2002. – Vol. 100, N1. – P. 52-58.
5. Borowitz M. J., Devidas M., Hunger S. P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, N12. – P. 5477-5485.
6. Савва Н. Н., Красько О. В., Белевцев М. В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ) // *Онкогематология* – 2009. – №2. – С. 17-21.

7. *Basso G., Veltroni M., Valsecchi M. G. et al.* Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, - P. 5168-5174.
8. *Campana D., Coustan-Smith E.* Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia // *Best practice & clinical research haematology* – 2002. – Vol. 15, N1. – P. 1-19.
9. *Campana D.* Minimal residual disease studies in acute leukaemia // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2004. – Vol. 122, – P. S47-S57.
10. *Dworzak M. N., Gaipa G., Ratei R. et al.* Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2008. – Vol. 74. – P. 331-340.
11. *Irwing J., Jesson J., Virgo P. et al.* Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting // *Haematologica.* – 2009. – Vol. 94, N6. – P. 870-874.
12. *Dworzak M. N., Fritsch G., Fleischer C. et al.* Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations // *Exp. Hematol.* – 1998. – Vol. 26, – P. 305-313.
13. *Lucio P., Parreira A., van den Beemd M. V. M. et al.* Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL // *Leukemia.* – 1999. – Vol. 13. – P. 419-427.
14. *Coustan-Smith E., Ribeiro R. C., Stow P. et al.* A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome // *Blood* – 2006. – Vol. 108, N1. – P. 97-102.
15. *Гривцова Л. Ю., Пона А. В., Купрышина Н. А. и др.* Оценка минимальной резидуальной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей методом трехцветной проточной цитометрии // *Иммунология гемопоэза* – 2008. – №2. – С. 8-33.
16. *Ciudad J., Orfao A., Vidriales B. et al.* Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection // *Haematologica.* – 1998. – Vol. 83, N12. – P. 1069-1075.
17. *McKenna R. W., Washington L. T., et al.* Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry//*Blood.* – 2001. – Vol. 98, N8. – P. 2498-2507.
18. *Hulspas R., O’Gorman M. R. G., Wood B. L. et al* Consideration for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2009. – Vol. 76B. – P. 355-364.
19. *Румянцева Ю. В., Карачунский А. И., Румянцев А. Г.* Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России // *Педиатрия* – 2009. – №4. – С. 19-27.

20. *Fechina L., Shorikov E., Tsauro G. et al.* Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone // *Blood*. - 2008. - Vol. 110, - P. 832A.
21. *Craig F. E., Foon K. A.* Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms // *Blood* – 2008. – Vol. 111, N8. – P. 3941-3967.
22. *Попов А. М., Вержбицкая Т. Ю., Цаур Г. А. и др.* Изучение минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии с целью своевременного планирования стратегии лечения с трансплантацией гемопоэтических клеток // *Вестник уральской медицинской академической науки* – 2006. – №2. – С. 32-38.
23. *Popov A. M., Verzhbitskaya T. J., Saveliev L. I., Fechina L. G.* Immunophenotypic aberrations applicable for the minimal residual disease monitoring in BII-ALL by flow cytometry // *Ann. Hematol.* – 2008. – Vol. 87, – P. S7.
24. *Gaipa G., Basso G., Maglia O. et al.* Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection // *Leukemia*. – 2005. – Vol. 18. – P. 703-708.
25. *Borowitz M. J., Pullen D. J., Winick N. et al.* Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the Children's Oncology Group // *Cytometry Part B*. – 2005. – Vol. 68B, – P. 18-24.
26. *Gaipa G., Basso G., Aliprandi S. et al.* Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2008. – Vol. 74B, – P. 150-155.
27. *Popov A. M., Verzhbitskaya T. J., Tsauro G. A. et al.* Immunological shift on day 15 of remission induction in children with CD10-positive B-cell precursor ALL treated by ALL-MB 2008 protocol // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, N22. – P. 1039.

*VII Российская с международным участием конференция
Иммунология гемопоэза, Москва, 7-9 июня 2010 г.*

Глубокоуважаемые коллеги!

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российский фонд фундаментальных исследований,

7-9 июня 2010 года

проводят **VII Российскую с международным участием конференцию
«Иммунология гемопоэза»**

Тема конференции:

**«Иммунологический контроль эффективности
современных методов лечения гемобластозов»**

Адрес проведения конференции: г. Москва, Каширское шоссе д.23,
Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН,
конференц-зал клиники. Ближайшая станция метро «Каширская»
На конференции будут представлены доклады ведущих ученых в области
иммунологии гемобластозов.

**Основные научные направления конференции
(подробная программа на сайте www.imhaemo.ru):**

- Вклад фундаментальной науки в разработку наиболее информативных клинических диагностических тестов в онкогематологии (G. Janossy)
- Иммунодиагностика и иммунологический контроль эффективности терапии В-ХЛЛ и зрело-В-клеточных лимфом (A. Rawstron);
- Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (A. Rawstron);
- Иммунодиагностика и иммунологический контроль эффективности терапии острых лейкозов (M. Borowitz);
- Иммунодиагностика и контроль эффективности терапии множественной миеломы (Профессор Е.Е. Зуева);
- Иммунологические критерии разбавления костного мозга периферической кровью (M. Loken);
- Разбор типичных и сложных случаев установления минимальной остаточной болезни

Материалы конференции будут опубликованы в журнале
«Иммунология гемопоэза/Haematopoiesis Immunology», N1, 2010.

Для участия в конференции необходимо прислать регистрационную форму в адрес Оргкомитета. Зарегистрироваться можно по Интернету на сайте конференции www.imhaemo.ru, или выслать регистрационную форму по электронной почте: imhaemo_6june@ronc.ru

По всем вопросам, связанным с участием в конференции, обращаться в Оргкомитет

Председатель Оргкомитета:

Заслуженный деятель науки России

Заведующий лабораторией иммунологии гемопоэза

Централизованного клинико-лабораторного отдела

РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН

доктор медицинских наук, профессор *Тупицын Николай Николаевич*

Секретарь оргкомитета:

Кандидат медицинских наук

Шолохова Елена Николаевна

Тел. (495)-324-14-30

Адрес Оргкомитета: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 23,
НИИ Клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,
конференция *«Иммунология гемопоэза»*

тел.: (495)-324-90-69, факс: (495) 324-90-69,

E-mail: imhaemo_6june@ronc.ru

РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН
Российский фонд фундаментальных исследований

**7 Российская с международным участием конференция
«Иммунология гемопоэза»**

**«ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ
СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОБЛАСТОЗОВ»**

ПРОГРАММА

7 июня 2010 – заезд участников, регистрация

8 июня 2010 – 8.30-9.30 регистрация

9:30-10.30 Открытие конференции

Председатели: профессор З.Г. Кадагидзе; член-корреспондент РАМН, проф. И.В. Поддубная, профессор Д.Ш. Османов, профессор Н.Н. Тупицын

- Вступительное слово директора РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН заслуженного деятеля науки России академика РАН и РАМН профессора М.И. Давыдова
- Зав. кафедрой онкологии РМАПО, член-корреспондент РАМН профессор И.В. Поддубная (Москва) “Молекулярно-иммунологическая оценка эффективности терапии – приоритетная задача онкогематологии”
- Зав. централизованным клинико-лабораторным отделом и лабораторией клинической иммунологии опухолей РОНЦ, профессор З.Г. Кадагидзе
- Заведующий отделением химиотерапии гемобластозов РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН профессор Д.Ш.Османов (Москва) Зав. лабораторией иммунологии гемопоэза Централизованного клинико-лабораторного отдела РОНЦ, профессор Н.Н. Тупицын
- Проф. G. Janossy (Лондон) “ Путь от фундаментальной науки к клинически значимым диагностическим методам”

10:30-14.00 – Утреннее/дневное заседание

«Оценка эффективности таргетной терапии при зрелоклеточных В-клеточных лимфомах (CD20⁺), В-ХЛЛ и множественной миеломе»

Председатели: G. Janossy (Лондон, UK), M. Borowitz (Балтимор, США), A. Rawstron (Лидс, UK)

- Consultant Clinical Scientist, HMDS Department of Haematology St. James's Institute of Oncology (Leeds) A. Rawstron “Минимальная остаточная болезнь при ХЛЛ: клиническое значение и стандартизованная диагностика многопараметровой проточной цитометрией”
- д.б.н. А.М. Ковригина (РОНЦ) «Аберрантные иммунофенотипы при зрело-В-клеточных лимфомах»
- Consultant Clinical Scientist, HMDS Department of Haematology St. James's Institute of Oncology (Leeds) A. Rawstron «Достижения в диагностике и мониторинге В-клеточных опухолей проточной цитометрией»

Coffee-break

- Зав. лабораторией клинической иммунологии и молекулярной диагностики ЦЛД СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, профессор Е.Е. Зуева (С-Петербург) “Множественная миелома. Иммунодиагностика и оценка эффективности лечения”
- Зав. отделением трансплантации костного мозга РОНЦ, к.м.н. К.Н. Мелкова (Москва) “Иммунологические аспекты трансплантации костного мозга при гемобластозах”
- Consultant Clinical Scientist, HMDS Department of Haematology St. James's Institute of Oncology (Leeds) A. Rawstron «Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз: новые данные к патогенезу В-ХЛЛ»

Дискуссия

14.00-15.00 – Обед

15.00-18.00 – Вечернее заседание

«Иммунологическая оценка эффективности лечения острых лейкозов»

Председатели: профессор Н.Н. Тупицын, профессор Е.Е. Зуева, д.м.н. А.В. Попа

- Professor of Pathology and Oncology Johns Hopkins Medical Institutions (Baltimore) M. Borowitz “Clinical Significance of Minimal Residual Disease Detection in Paediatric ALL”
- Зав. отделением ХТ гемобластозов НИИ ДОиГ РОНЦ, д.м.н. А.В. Попа (Москва) «Клиническое значение диагностики минимальной остаточной болезни при острых миелоидных и лимфоидных лейкозах»
- А.М. Попов, Областная детская клиническая больница №1 (Екатеринбург) “Мониторинг минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии в рамках протоколов ALL-MB и MLL-Baby”

Coffee-break

Профессор M. Loken (Сиэтл) «Риск-стратификация при ОМЛ у детей: результаты оценки остаточной болезни по данным молекулярно-биологического исследования, кариотипирования и проточной цитометрии»

Профессор G. Janossy (London) “Pan-Leucocyte antigen CD45 in routine immunohaematology diagnostics”

Дискуссия Зкрытие конференции

Спонсор конференции компания "БиоЛайн"

**7 Russian Conference with International Participation
“Haematopoiesis Immunology” - June 7-8, 2010.**

**IMMUNOLOGIC MONITORING OF THERAPY EFFICACY
IN HEMATOLOGY MALIGNANCIES**

PROGRAMM

June 7, 2010 – arrival of participants, registration

June 8, 2010: 8.30-9.30 registration

9:30-10.30 Opening ceremony

Chairpersons: *prof. Z.G. Kadagidze, Associate Member of RAMS, prof. I.V. Poddubnaya, prof. D.S. Osmanov, prof. N.N. Tupitsyn*

- Introductory words by Academician, Professor M.I. Davydov, Director of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
- Professor I.V. Poddubnaya, *Associate Member of Russian Academy of Medical Sciences* “Molecular immunological assessment of therapy efficacy is a principal task of oncohaematology”
- Professor Z.G. Kadagidze, Head of Centralized Clinical Laboratory Department
- Professor D.Sh. Osmanov, Head of Department of Chemotherapy of Haematology Malignancies; Professor N.N. Tupitsyn, Head of Haematopoiesis Immunology Lab.
- Professor G. Janossy (London, UK), Lecture: “How basic science can lead to simple routine tests for easy interpretation.”

10:30-14.00 Morning/Afternoon session
“Mature B-cell lymphomas (CD20⁺), B-CLL and Multiple Myeloma”

Chairpersons: G. Janossy (London, UK), M. Borowitz (Baltimore, USA), A. Rawstron (Leeds, UK)

- A.V. Shibinskaya (Moscow) "Morphological heterogeneity of B-CLL"
- A. Rawstron, Consultant Clinical Scientist, HMDS Department of Haematology, St. James's Institute of Oncology (Leeds, UK) "Minimal residual disease in CLL: clinical implications and standardized approaches with multiparameter flow cytometry"
- A.M. Kovrigina, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of Dept. of Pathological Anatomy of Human Tumors, Cancer Research Center, Moscow «Aberrant immunophenotypes in mature B-cell Lymphomas»

Coffee-break

- A. Rawstron, Consultant Clinical Scientist, HMDS Department of Haematology, St. James's Institute of Oncology (Leeds, UK) "Improvements in the diagnosis and monitoring in B-cell malignancies using flow cytometry"
- Professor E.E. Zueva, MD, PhD, Head of Clinical Immunology and Molecular Diagnostics Lab., Cancer Research Center, Center of Laboratory Diagnostics, I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University "Multiple Myeloma. Immune diagnosis and evaluation of treatment efficacy"
- K.N. Melkova, MD, PhD, Head of Bone Marrow Transplantation Dept., Cancer Research Center, Moscow "Immunological aspects of bone marrow transplantation in Haematologic malignancies"
- A. Rawstron, Consultant Clinical Scientist, HMDS Department of Haematology, St. James's Institute of Oncology (Leeds, UK) "Monoclonal B-cell Lymphocytosis: insights into the pathogenesis of CLL"

Discussion

14.00-15.00 Lunch

15.00-18.00 Evening session

"Immunological assessment of acute Leukemia treatment efficacy"

Chairpersons: Professor N.N. Tupitsyn, Professor E.E. Zueva, Professor A.V. Popa

- M. Borowitz, prof. of Pathology and Oncology, J. Hopkins MI (Baltimore, USA) "Clinical Significance of MRD Detection in Paediatric ALL" – 45 min
- A.V. Popa, Head of Department of Chemotherapy of Children Hematology Malignancies, Institute of Children Oncology and Hematology, CRC, Moscow «MRD in acute myeloid and lymphoid leukaemias» – 30 min
- A.M. Popov, Regional Childhood Hospital №1, Ekaterinburg, Russia "Flow cytometric monitoring of MRD by treatment protocols ALL-MB and MLL-Baby" – 30 min
- T.Yu. Verzbitskaya, Regional Childhood Hospital №1, Ekaterinburg, Russia "Detection and monitoring of CNS involvement in children with acute leukaemia by flow cytometry" – 10 min

Coffee-break

- Michael R. Loken, Hematologics, Inc, Seattle, USA «Risk stratification in Pediatric AML: Combining Karyotype, Molecular and Flow Cytometry Residual Disease Results"
- Professor G. Janossy (London, UK) "Pan-Leucocyte antigen CD45 in routine immunohaematology diagnostics"

Discussion Closing the Conference

Рисунки к статье:

Майкл Р. Локен, Денис А. Уэллс

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

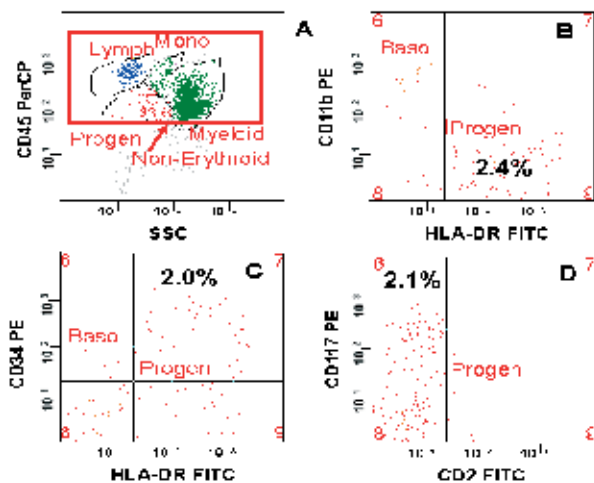


Рис. 1. Анализ аспирата КМ с нормальным фенотипом. Реагенты, использованные для окрашивания клеток КМ: CD45 PerCP и HLA-DR FITC/CD11bPE, HLA-DR/CD34 PE или CD2 FITC и CD117 PE (все реагенты предоставлены Becton Dickinson Biosciences, Сан-Хосе, США).

- A) Анализ по CD45/Log SSC выявил 4 крупных кластера событий, соответствующих зрелым лимфоцитам, созревающим моноцитам, созревающим миелоидным клеткам и клеткам-предшественникам; смесь незрелых лимфоидных и миелоидных клеток. Все незэритроидные клетки выделены красным.
- B) Клетки-предшественники в указанных гейтах (Рис. А), идентифицированы как положительные по HLA-DR, но отрицательные по CD11b (2,4%).
- C) Клетки-предшественники также можно выявить по коэкспрессии HLA-DR и CD34.
- D) Миелоидные клетки-предшественники можно идентифицировать по экспрессии CD117, но с ограничением использования гейта клеток-предшественников, как показано на Рис. А.

Fig. 1. Analysis of a phenotypically normal bone marrow aspirate. Bone marrow cells were stained with CD45 PerCP and HLA-DR FITC/CD11bPE, HLA-DR/CD34 PE or CD2 FITC and CD117 PE (all reagents from Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA).

- A) Analysis of the CD45/Log SSC reveals 5 major clusters of events corresponding to mature lymphocytes, maturing monocytes, maturing myeloid cells, erythroid cells and progenitor cells (mixture of immature lymphoid and myeloid cells), Total non-erythroid cells are identified by the red box.
- B) Progenitor cells, gated as illustrated in Figure A, are identified as positive for HLA-DR but negative for CD11b (2.4%).
- C) Progenitor cells can also be detected as expressing both HLA-DR and CD34.
- D) Myeloid progenitor cells can be identified by expression of CD117 but restricted to the progenitor cell gate in A.

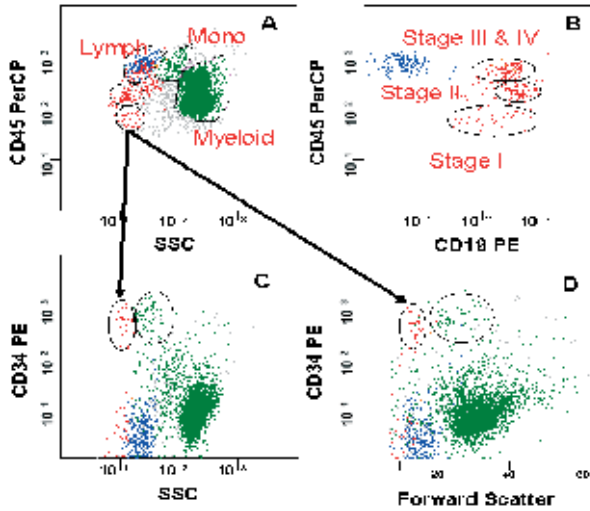


Рис. 2. Различие между лимфоидными и миелоидными клетками-предшественниками. Клетки КМ (другой образец по сравнению с Рис. 1) метили CD45 PerCP, CD19 PE или CD34 PE.

- A) Анализ по CD45/Log SSC выявил лимфоидные клетки-предшественники. События с экспрессией CD19 выделены красным, зрелые T- и NK-клетки показаны синим цветом. Моноциты и миелоидные клетки показаны зеленым цветом.
- B) Три кластера CD19-положительных клеток можно идентифицировать по различным степеням экспрессии CD45, соответствующим I, II стадиям и комбинации III+IV стадий развития B-лимфоидных клеток [10]. Лимфоидные клетки-предшественники представлены стадиями I и II.
- C) B-лимфоидные предшественники, экспрессирующие CD34, ограничены стадией I и имеют меньшее значение log SSC, чем миелоидные клетки-предшественники, обозначенные зеленым цветом.
- D) Лимфоидных клеток-предшественников, экспрессирующих CD34, меньше по данным прямого рассеяния света, чем число соответствующих миелоидных клеток-предшественников, экспрессирующих CD34.

Fig. 2. Discrimination between lymphoid and myeloid progenitor cells. Bone marrow cells (a different specimen than used in Fig. 1 were stained with CD45 PerCP, CD19 PE or CD34 PE.

- A) Analysis of CD45/Log SSC highlighting the lymphoid progenitor cells. Events expressing CD19 are shown in red, while mature T and NK cells are blue. Monocytes and myeloid cells are depicted as green.
- B) Three clusters of CD19 positive cells can be identified based on the differential expression of CD45 corresponding to Stage I, Stage II and a combination of Stage III+IV of B lymphoid development [10]. Lymphoid progenitor cells include both Stages I and II.
- C) The B lymphoid precursors expressing CD34 are restricted to Stage I and have lower Log SSC than the myeloid progenitor cells identified as green.
- D) Lymphoid progenitor cells expressing CD34 are also smaller by forward light scatter than the corresponding myeloid progenitor cells expressing CD34.

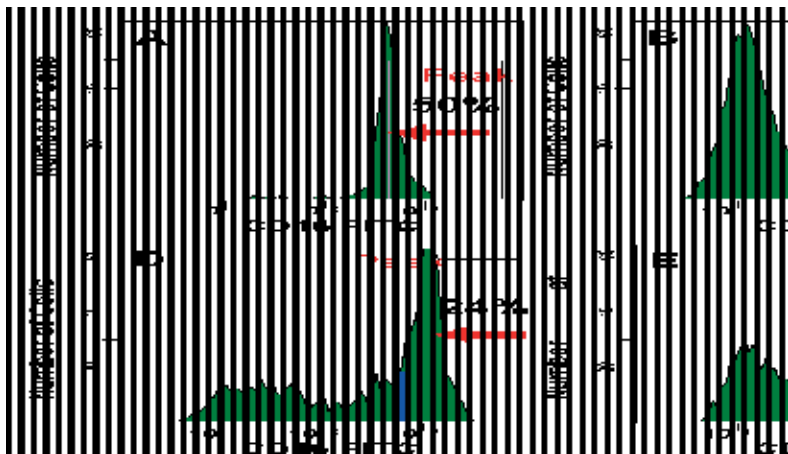


Рис. 3. Гистограммы, показывающие экспрессию CD16 FITC (Pharmingen Сан-Диего, США) на созревающих миелоидных клетках в 6 разных образцах.

А) Периферическая кровь.

В–F) Аспираты КМ, выбранные случайным образом, из образцов с нормальным фенотипом. Миелоидные популяции идентифицированы на основе гейтов, представленных на рис. 1А. Зрелые нейтрофилы можно определить по однородному симметричному пику (А). 50% клеток более ярко окрашены, чем клетки пика – это простой способ определения общего числа ярко окрашенных CD16-положительных клеток в образце по сравнению с пиком (предложен д-ром Jean Feuillard, Лимож). Очевидна вариабельность пропорций ярко окрашенных CD16⁺ клеток в 5 разных аспиратах КМ (В–F). В двух аспиратах В и F контаминация периферической кровью отсутствует, тогда как в образцах С–Е наблюдается избыток зрелых нейтрофилов (более 20%, характерных для биоптатов КМ). Пропорции ярко окрашенных CD16⁺ миелоидных клеток больше, чем пики, показаны на рис. Синей линией показан порог двукратного превышения пика, соответствующего всем «ярко окрашенным CD16⁺ клеткам» в каждом образце. Таким образом, общее число ярко окрашенных CD16⁺ клеток в каждом образце в 2 раза выше пропорции клеток, превышающей пиковое значение.

Fig. 3. Histograms showing expression of CD16 FITC (Pharmingen, SanDiego, CA) on maturing myeloid cells comparing 6 difference specimens.

A) Peripheral blood.

B–F) Randomly selected bone marrow aspirates from phenotypically normal specimens. The myeloid populations were identified based on the gate illustrated in Fig. 1A. Mature neutrophils can be identified as a homogeneous, symmetrical, peak (A). 50% of the cells are brighter than the peak providing a simple method to determine the total bright CD16 positive cells in a specimen based on the peak (Suggested by Dr. Jean Feuillard, Limoges). The variability in the proportions of bright CD16 positive cells in 5 different bone marrow aspirates (B–F) is readily apparent. Two of the aspirates, B & F, have little or no blood contamination while C & E have excess mature neutrophils (>20% expected for bone marrow biopsies). The proportions of bright CD16 positive myeloid cells greater than the peaks are illustrated in the figure. The blue line illustrates the position of a threshold 2 times the peak corresponding to the total “Bright CD16” cells in each specimen. Therefore, the total bright CD16 positive cells in each specimen is 2 × the proportion of cells greater than the peak value.

Рисунки к статье:
Michael J. Borowitz

MINIMAL RESIDUAL DISEASE DETECTION IN CHILDHOOD ALL

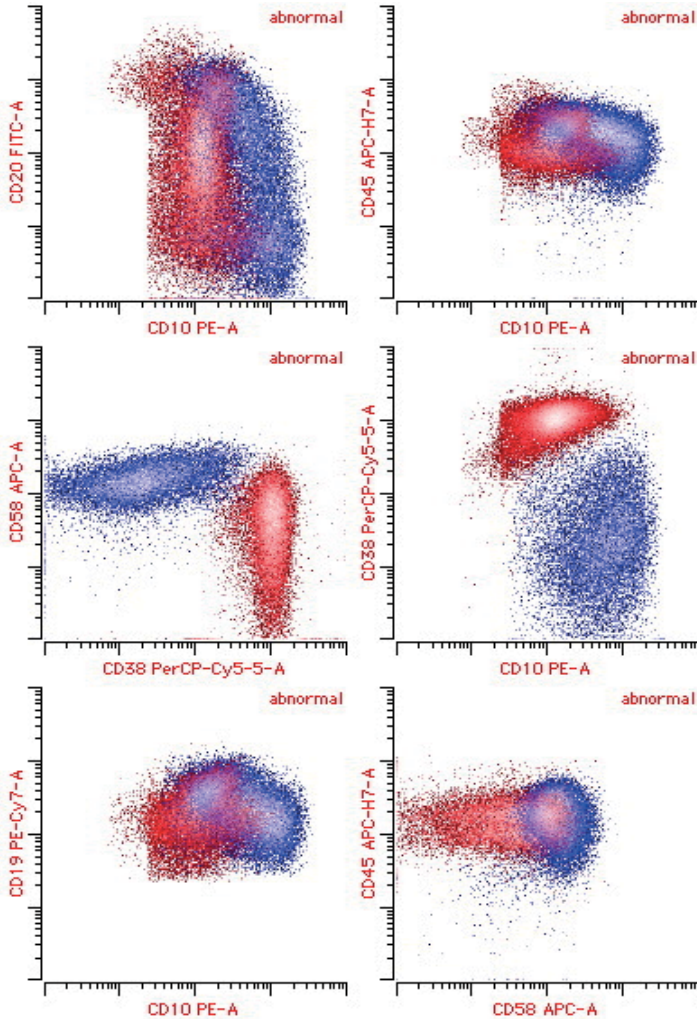


Fig. 1. Characteristic immunophenotypic pattern of normal B cell precursors (red), compared with case of B-ALL (blue). The earliest B cell precursors lack CD20 and have brighter CD10. As they mature, they gain intensity of CD20, CD19 and CD45 with relatively constant CD10, and eventually lose CD10. CD38 is typically brightly expressed while CD58 is variable. In this case the ALL overexpresses CD10 and CD58 with more homogeneous expression of the latter, but is best separated from normal based on underexpression of CD38.

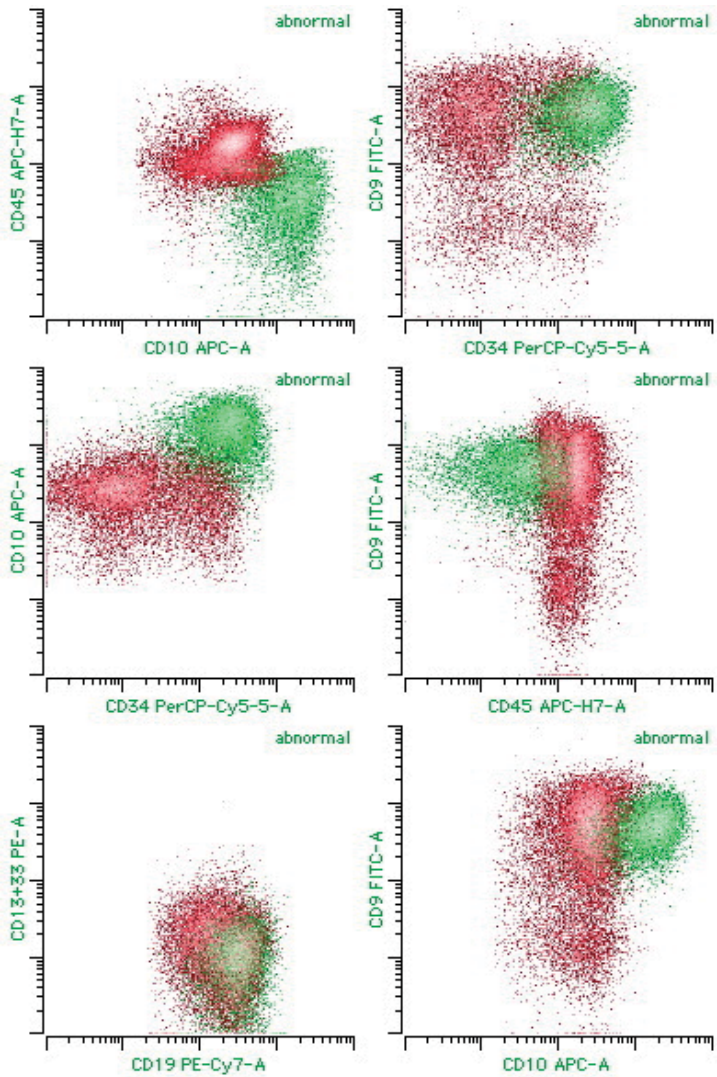


Fig. 2. Comparison of normal B cell precursors (red) tested with a different combination of markers with another case of ALL (green). In normal, CD34 and CD9 are variably expressed so that a typical display with normals shows 4 populations on a display of CD34 vs CD9; there can be great variability in the proportions of different populations, however. Most cases of ALL will be more homogeneous than this. In this case, the leukemic cells are most readily distinguished from normal because of loss of CD45, though there is also overexpression of CD10.

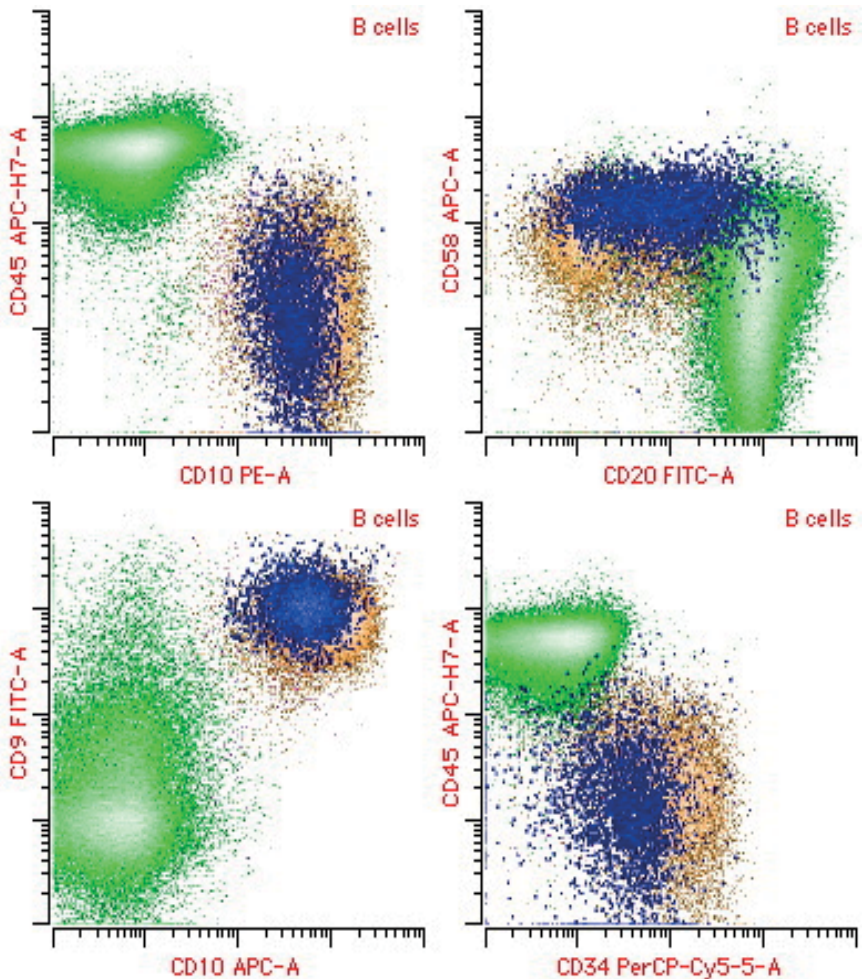


Fig. 3. Detection of MRD in a case of B-ALL. The sample is gated to display only CD19+ B cells. Mature B cells are shown in green, and the MRD in blue. The original pretreatment leukemic phenotype is overlaid in orange. Except for some slight loss of intensity of CD34, the MRD sample is very similar to that of the initial leukemia. While the intensity of CD10 and the variability of CD20 are similar to what would be expected in normal B cell precursors, the loss of CD45, overexpression of CD58, and homogeneous expression of CD34 and CD9 all indicate that this is MRD and not normal cells.

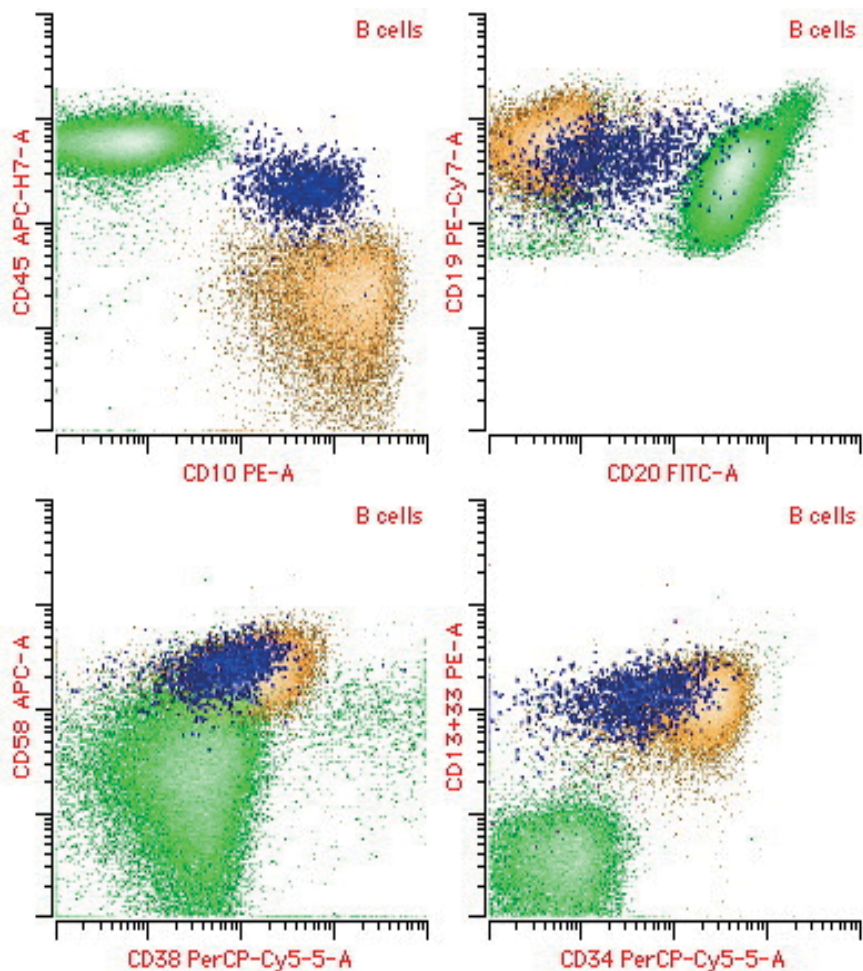


Fig. 4. Detection of MRD in a case of B-ALL. In this case, there has been a significant change in the phenotype between the MRD positive leukemic cells (blue) and the original leukemia (orange). The gain in CD45, slight loss of intensity of CD10 and CD34, and gain of CD20 are all consistent with maturation to a more mature B cell, and with these markers alone it would be difficult to distinguish these from normal B precursors. However, the pattern of expression of CD58 vs CD38 is maintained and is markedly different from what would be expected with normal precursors (see fig. 1).

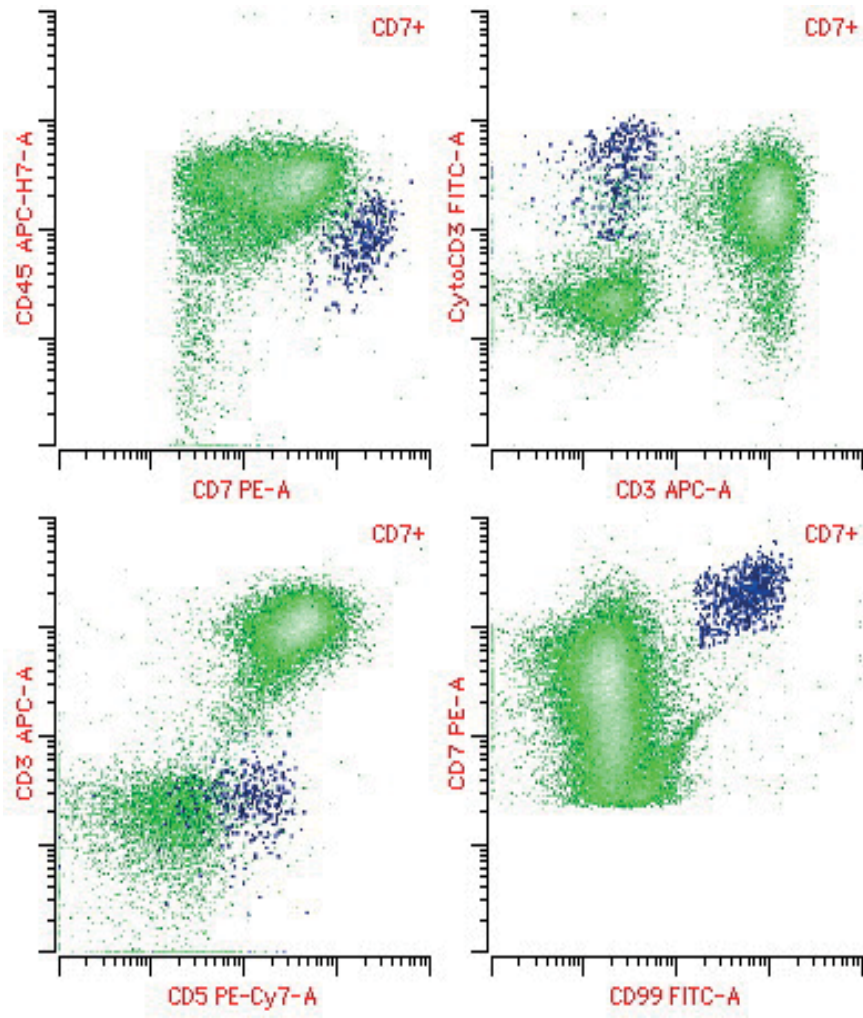


Fig. 5. Detection of MRD in a case of T ALL. The MRD (blue) is readily distinguished from background normal mature T cells and NK cells (green) based on expression of CD5 and cytoplasmic but not surface CD3, and by overexpression of CD99. Not all cases of T-ALL MRD will be as easy to recognize as this (see text).

Рисунки к статье:

*А. М. Попов, Т. Ю. Вержбицкая, Г. А. Цаур, Е. В. Шориков,
Л. И. Савельев, Л. Г. Фечина*

**МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ У ДЕТЕЙ
С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
ИЗ В-ЛИНЕЙНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ
ПРИ ПОМОЩИ УПРОЩЕННОГО ПОДХОДА:
ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ**

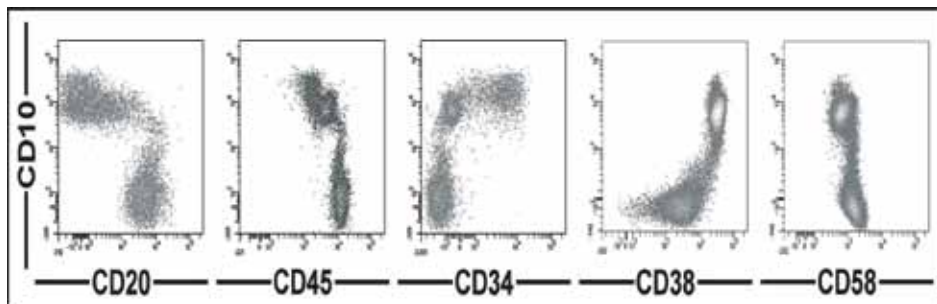


Рис. 1. Типичное для нормального развития В-лимфоцитов распределение CD19-позитивных клеток на точечных графиках.

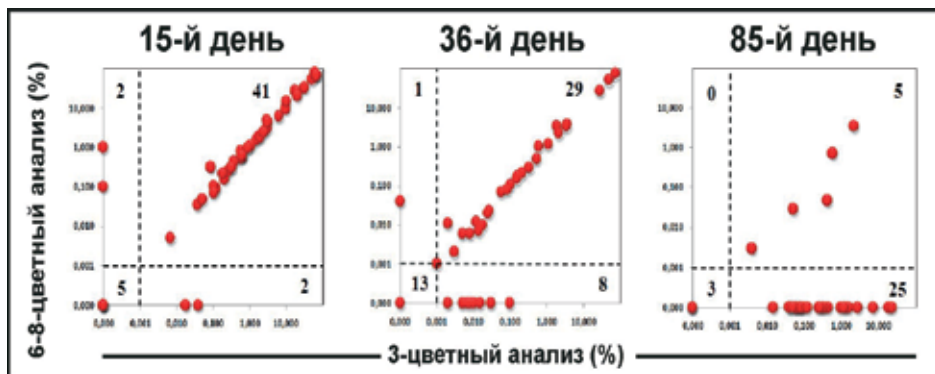


Рис. 2. Сопоставление результатов определения МОБ в разных точках наблюдения при помощи «упрощенного» (3 цветного) и стандартного (6–8 цветного) подхода к анализу данных.

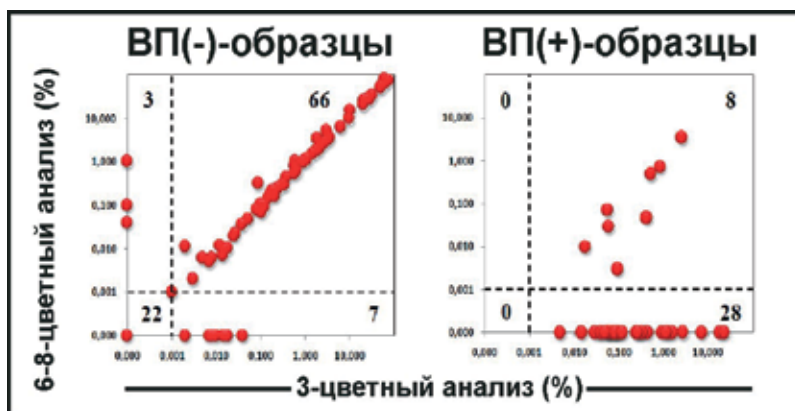


Рис. 3. Сопоставление результатов определения МОБ при помощи «упрощенного» (3-цветного) и стандартного (6–8 цветного) подхода к анализу данных в зависимости от наличия в образце нормальных ВП.

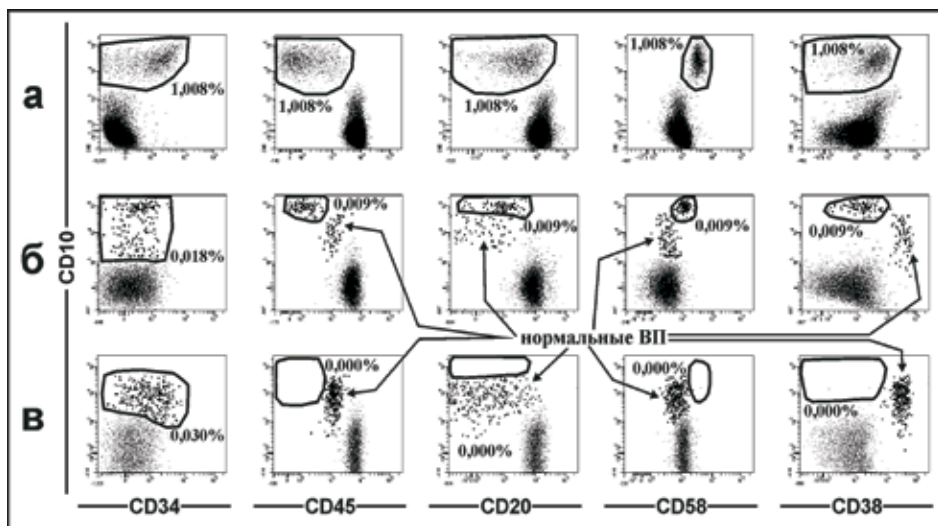


Рис. 4. Примеры корректного и некорректного выделения опухолевых клеток в образцах 36 дня терапии при применении «упрощенного» метода (левая колонка) по сравнению со стандартным подходом, предусматривающим анализ экспрессии CD45, CD20, CD58, CD38.

- а – корректный результат,
- б – количественно некорректный результат,
- в – ложноположительный результат.