

ISSN 1613-4529

ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HEMATOPOIESIS
IMMUNOLOGY



1/
2011

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
1/2011 том 9

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

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

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турнянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошье (Франция)
Дж. Вижденес (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. Тюлядин (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 07.05.2010. 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. Турнянская. Макет: Б.Б. Крюков

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
1/2011 vol. 9

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (H/Ematopoiesis 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. Turnianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtsova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (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. Ramazanov (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzki)
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 «Ogni Moskvy»

Print-run 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal
Haematopoiesis immunolog
Coordinator: E.G. Turnyanskaya. Design: B.B. Krukov

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА

М.А. Френкель

Этапы формирования классификаций МДС: итоги, проблемы.....	8
---	----------

Л.Ю. Гривцова, А.В. Попа, И.Н.Серебрякова, Н.Н. Тупицын

К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии.....	35
---	-----------

Дискуссия между Dario Campana (США)

и Александром Поповым (Екатеринбург, Россия).....	55
--	-----------

Энди С. Роустрон

Минимальная остаточная болезнь при хроническом лимфоцитарном лейкозе.....	63
--	-----------

VIII РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**Организация 8-й Российской с международным участием конференции
«Иммунология гемопоэза» и публикация материалов издания
в «Иммунологии гемопоэза» поддержаны Российским фондом фундамен-
тальных исследований грант № 11-04-06037-г**

CONTENTS

FROM THE EDITOR

M.A.Frenkel

Development Stages of MDS Classifications: Results and Problems.....	9
---	----------

L.Yu. Grivtsova, A.V. Popa, I.N. Serebryakova, N.N. Tupitsyn

To further standardization in detection of residual blasts in bone marrow of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia on day 15 of induction therapy.....	36
---	-----------

Discussion between Dario Campana (USA) and Alexander Popov (Ekaterinburg, Russia).....	56
---	-----------

Andy. C. Roustron

Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia.....	63
--	-----------

rganization of 8-th Russian Conference with international participation
"Immunology of hematopoietic and publication of publications
in "Immunology hematopoiesis" supported by the Russian Foundation for Basic
Research grant number 11-04-06037-g

ОТ РЕДАКТОРА

В первом номере журнала «Иммунология гемопоэза»/”Haematopoiesis Immunology за 2011 год мы продолжаем публикации статей на актуальные темы иммунологии гемопоэза. Открывает журнал статья доктора медицинских наук профессора М.А. Френкель, посвященная актуальным вопросам диагностики миелодиспластического синдрома. В этой области со времени опубликования классификации ВОЗ 2001 года произошли серьезные изменения, и мы сочли необходимым представить соответствующий обзор на суд строгого читателя. Несомненно, обзор будет полезен как с диагностической точки зрения, так и с точки зрения общепатологической проблемы в целом. Считаем необходимым выразить глубокую благодарность Марине Абрамовне – одному из ведущих патологов мира – за честь предоставить нашей редакции свое видение этой сложнейшей проблемы, эволюции взглядов и диагностических критериев. Пользуясь случаем, поздравляем Марину Абрамовну со славным юбилеем – 75–летьем – который она отпраздновала в январе этого года. В ее трудовой книжке одна запись – онкоцентр.

Желаем Вам, Марина Абрамовна, хорошего здоровья и быть с нами, потому что в сложных диагностических ситуациях онкогематологии (а они каждый день) нам без Вас не обойтись.

Как всегда, наш журнал продолжает тематику минимальной остаточной болезни при лейкозах. Тема острого лейкоза у детей, скорость клиренса blastов на 15-й день терапии индукции ремиссии критически освещены в работе Л.Ю. Гривцовой и соавторов. Здесь появляется всё больше вопросов, ведь 15-й день становится ключевым как с точки зрения индивидуализации терапии, так и с точки зрения прогнозирования ответа на момент окончания индукции, то есть – перевода части больных в группы высокого риска.

Интереснейший раздел журнала – дискуссия между Dario Campana (Мемфис, США) и талантливым российским цитометристом Александром Поповым (Екатеринбург). Вопросы есть, и, видимо, ответ на них лежит в сфере кооперированных исследований и фундаментальных работ.

И, наконец, мы публикуем доклад A. Rawstron по диагностике и мониторингу минимальной остаточной болезни при В-ХЛЛ. Доклад публикуется на русском языке, и это не случайно, так как в последнее время обострился интерес к проблеме эрадикации остаточной болезни при ХЛЛ. Доклад во многом отвечает на эти вопросы.

Впереди 8 июня – дата проведения VIII Российской конференции «Иммунология гемопоэза» с международным участием. Как всегда, активное участие в организации принимает почетный председатель конференции профессор George Janossy. Эта конференция будет посвящена не только гемопоэзу, но и вопросам его регуляции в норме и при опухолях.

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

Н.Н. Тупицын

FROM THE EDITOR

We continue to publish papers on urgent problems of hemopoiesis immunology in the first *Haemopoiesis Immunology* issue in 2011. Presentation by Professor M.A. Frenkel, MD, opens the issue and considers important problems of the diagnosis of myelodysplastic syndrome. There were much change in this filed since the 2001 WHO classification, and we thought it interesting to present this overview to the reader. The overview will undoubtedly be useful from both the diagnostic and general biological points of view. We are pleased to thank very much Marina Abramovna, a world leading pathologist, for the honor to publish her insight into this complicated problem, evolution of opinions and diagnostic criteria. Taking the opportunity we congratulate dear Marina Abramovna on her 75th jubilee that she celebrated in January this year. There is only one entry in her service records Cancer Center. We wish you, dear Marina Abramovna, good health and to remain with us because we cannot do without you in difficult oncohematological situations (which occur every day).

As always, our journal continues discussion on minimal residual disease in leukemia. L.Yu. Gritsova et al. analyze critically the problem of acute leukemia in children, blast clearance on day 15 of therapy, remission induction. More and more questions are arising here because day 15 is a key time point for both therapy tailoring and prediction of response by the end of induction, i.e. for identification of patients at high risk. The most interesting section of the issue is discussion between Dario Campana (Memphis, USA) and a talented Russian cytometrist, Alexander Popov (Ekaterinburg). There still are questions to be answered, and the answers may probably be found through cooperative study and fundamental research.

And finally we are publishing A. Rawstron's presentation on the diagnosis and monitoring of minimal residual disease in B-CLL. No wonder that this report is published in Russian because investigators are increasingly focusing on the problem of residual disease eradication in CLL. The presentation answers many questions. We are looking forward to the 8th of June – the opening day of the 8th Russian conference on hemopoiesis immunology with international participants. As always, George Janussy, the Honorary Chairman of the conference, is taking an active part in its organization. The conference will focus on hemopoiesis and its regulation in both normal individuals and cancer patients.

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,

МДС – миелодиспластические синдромы

МК – моноклональный компонент,

МКА – моноклональные антитела,

ММ – множественная миелома,

МНК – моноклеарные клетки,

МОБ – минимальная остаточная болезнь,

МРБ – минимальная резидуальная болезнь,

НХЛ – неходжкинская лимфома

РА – рефрактерная анемия

РБ – резидуальная болезнь,

РМЖ – рак молочной 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.

MDS, myelodysplastic syndromes

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.

М.А. Френкель

ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ КЛАССИФИКАЦИЙ МДС: ИТОГИ, ПРОБЛЕМЫ

Лаборатория иммунологии гемопоэза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Абстракт

Миелодиспластические синдромы объединяют гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы кроветворения, при которых поражается полипотентная стволовая клетка. Первая классификация МДС была предложена ФАБ-группой ученых в 1982 г., установлены детальные морфологические критерии дисплазии миелопоэза, определены 5 вариантов МДС:

- рефрактерная анемия (РА),
- рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС),
- рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ) при числе бластов $\geq 5\%$,
- рефрактерная анемия с избытком бластов, трансформированная в острый лейкоз, с числом бластов $\geq 30\%$ (РАИБ-Т),
- хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

В 2001 году ВОЗ была предложена классификация МДС и выделены варианты заболевания:

- МДС неклассифицируемый,
- МДС, ассоциирующийся с $\text{del}(5q-)$.

Установлен порог бластов до 20%, РАИБ-Т и ХММЛ выведены из категории МДС.

В 2010 г. опубликован новый вариант классификации ВОЗ:

- постулирован МДС у детей,
- в понятие рефрактерной цитопении включены анемия,
- нейтропения,
- тромбоцитопения с уни- и мультилинейной дисплазией.

Ключевые слова: ФАБ-классификация МДС, ВОЗ-классификация, цитопения, морфология, иммунофенотип, цитогенетика МДС.

Миелодиспластические синдромы (МДС) объединяют гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы кроветворения, при которых поражается полипотентная стволовая клетка. При этом определяется дисплазия и неэффективный гемопоэз одной или более миелоидных линий с переходом части случаев в острый лейкоз. Интерес к этой проблеме в нашей стране и за рубежом сформировался в 1960-х гг., когда среди пациентов, подвергавшихся ранее химио- и/или лучевому лечению, выявилась группа больных с необъяснимой рефрактерной анемией и увеличением числа бластов.

Frenkel M.A

DEVELOPMENT STAGES OF MDS CLASSIFICATIONS: RESULTS AND PROBLEMS

Hemopoiesis Immunology Laboratory, N.N. Blokhin RCRC RAMS

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogenic group of hemopoiesis neoplastic diseases associated with affection of polypotent stem cells. In 1982 FAB published the first MDS classification with detailed morphological criteria of myelopoietic dysplasia that established 5 MDS types:

- refractory anemia (RA),
- refractory anemia with ring sideroblasts (RARS),
- refractory anemia with excess of blasts (RAEB) with 5 to 19% of blasts,
- refractory anemia with excess of blasts in transformation into acute leukemia with 20 to 30% of blasts (RAEB-T),
- chronic myelomonocytic leukemia (CMML).

In 2001 WHO proposed an MDS classification including the following disease types:

- MDS unclassified,
- MDS associated with del(5q-).

This classification established a 20% threshold for blasts and excluded RAEB-T and CMML from the MDS category. In 2008 WHO issued a new MDS classification that defined childhood MDS and included anemia, neutropenia and thrombocytopenia in the class of refractory cytopenia with uni- and multilineage dysplasia.

Key words: FAB classification of MDS, WHO classification, cytopenia, morphology, immunophenotype, MDS cytogenetics.

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogenic group of hemopoietic neoplastic diseases associated with affection of polypotent stem cells. The disease is characterized by dysplasia and ineffective production of one or more myeloid cell lines with some cases progressing to acute leukemia. Investigators from this country and abroad focused on this problem in 1960s when a cohort of patients was identified, who presented with unexplainable refractory anemia and increased blast counts after previous chemo- and/or radiotherapy.

Однако очень быстро эта когорта пополнилась больными старшего возраста, ранее не получавшими никакого лечения. Затем появились описания аналогичной клинико-гематологической картины у молодых людей, а также и у детей. В 1960–70-х гг. это патологическое состояние в литературных сообщениях обозначали различными терминами, в частности, как «дисмиелопозз», «предлейкоз», «вялотекущий лейкоз».

В СССР первое сообщение на тему малопроцентного лейкоза сделал в 1973 г. на гематологическом обществе профессор Ю.И. Лорие, в 1974 году эти данные были опубликованы [1].

Термин «миелодиспластические синдромы» (МДС) стал общепринятым с 1982 г., когда международная франко-американо-британская (ФАБ) группа исследователей предложила первую классификацию этой нозологической формы [2]. Диагностика МДС и их вариантов представляла значительные трудности, которые обуславливались как морфологическими особенностями опухолевого субстрата, так и сложностями в интерпретации полученных данных. В ФАБ-классификации были установлены детальные морфологические критерии, специфичные для дисплазии клеток крови и костного мозга эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного рядов, а также количественная характеристика бластного пула. Дизэритропоэз у пациентов проявляется в макроцитарной анемии, сочетающейся с морфологическими изменениями эритроцитов: пойкилоцитозом, овалоцитозом, эллиптоцитозом, стоматоцитозом и акантоцитозом эритроцитов, а также с наличием телец Жолли, колец Кебота, базофильной пунктации, нормоцитозом. В костном мозге количество клеток красного ряда может колебаться в широких пределах – от 5 до 90 %. При этом определяются мегалобластоидный характер эритроидного роста, макронормобласты с базофильной или оксифильной окраской цитоплазмы. Встречаются клетки с многодольчатыми или фрагментированными ядрами, с неравномерно окрашенной цитоплазмой, с ядерными мостиками. Наблюдаются 2– и 3–ядерные формы. Наличие более 15% кольцевых сидеробластов в пунктате является важным диагностическим признаком.

Дисгранулопоэз в крови и костном мозге выражается в снижении зернистости в цитоплазме клеток, наличии гигантских и/или пельгероидных патологических форм нейтрофилов, иногда – увеличении числа эозинофилов или базофилов.

При дисплазии мегакариоцитов изменения касаются ядер и цитоплазмы клеток. В ряде случаев ядра в мегакариоцитах располагаются разобщенно – так называемые разъединенные мегакариоциты – или обнаруживаются одноклеточные – ядерные клетки или мелкие (менее 12 мк) одноклеточные элементы. Цитоплазма клеток содержит или мелкую зернистость или единичные крупные тромбоциты.

Наличие 5–30% бластов в крови и костном мозге дало основание авторам ФАБ-группы выделить особые продвинутые варианты МДС.

However after a short period of time, older untreated patients were added to this cohort. Later a similar clinicohematological pattern was reported in young individuals and children. In 1960 70s this pathological condition was defined by a variety of terms and in particular referred to as dysmyelopoiesis, preleukemia or indolent leukemia. In Russia the first report on low percentage leukemia was made by Professor Yu.I. Lorie in 1973 at a Hematologists Society session and published in 1974 [1].

The term myelodysplastic syndrome (MDS) was commonly adopted since 1982 when an international French-American-British (FAB) group proposed the first classification for this clinical entity [2]. The diagnosis of MDS and its subtypes was difficult due to morphological features of the tumor substrate and problems with interpretation of findings. The FAB classification established morphological criteria specific of dysplasia of erythroid, granulocytic and megakaryocytic lineages of blood and bone marrow cells and gave a quantitative characteristic of the blast pool. Dyserythropoiesis manifests itself as macrocytic anemia associated with morphological changes in erythrocytes, such as poikilocytosis, ovalocytosis, elliptocytosis, stomatocytosis and acanthocytosis as well as the presence of Jolly's bodies, Cabot's rings, basophilic stippling, normocytosis. Red cell count in bone marrow may vary from 5 to 90%. Erythroid cells appear megaloblastoid, and macro-normoblasts with basophilic or oxyphilic cytoplasm are found. Cells with multilobular or fragmented nuclei, with unevenly stained cytoplasm and nuclear bridges may also be found. Two- or three-nuclear forms are present. A greater than 15% ring sideroblast count is a significant prognostic sign.

Blood and bone marrow dysgranulopoiesis manifests itself as low granularity of cell cytoplasm, the presence of giant and/or pelgeroid pathologic neutrophils, sometimes as increased eosinophil and basophil counts.

Megakaryocytic dysplasia is associated with changes in cell nuclei and cytoplasm. In some cases megakaryocytic nuclei are dispersed, mono- or bi-nucleated cells or smaller (less than 12 mcm) mononuclear elements may be found. Cytoplasm contains either small granules or single large platelets.

Basing on the presence of 5 to 30% of blasts in bone marrow the FAB classification identified specific advanced MDS subtypes.

В ФАБ-классификации установлено 5 вариантов МДС (табл. 1):

- рефрактерная анемия (РА),
- рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС),
- рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ) при числе бластов 5~19%,
- рефрактерная анемия с избытком бластов, трансформированная в острый лейкоз, с числом бластов 20~30% (РАИБ-Т),
- хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

Различались первичные (*de novo*) и вторичные МДС. В 1992 г. МДС были включены в Международную классификацию болезней десятого пересмотра (МКБ X).

Дальнейшее изучение МДС свидетельствовало о недостаточности морфологического подхода для потребностей клиники.

Поэтому диагностический спектр исследований, включая цитогенетические, культуральные, молекулярные методы, расширился. В связи с этим классификация МДС периодически подвергалась пересмотру и уточнялась.

В 2001 г. ВОЗ предложена классификация МДС, в которой проводилось более детальное определение вариантов заболевания на базе ранее используемой ФАБ-классификации [3].

Сравнение обеих классификаций представлено в табл. 1.

Таблица 1

Сопоставление ФАБ и ВОЗ-2001 классификаций МДС

ФАБ-классификация	Классификация ВОЗ 2001 года
Рефрактерная анемия	
—	с мультилинейной дисплазией
с кольцевыми сидеробластами	с кольцевыми сидеробластами
—	с мультилинейной дисплазией и кольцевыми сидеробластами
с избытком бластов	с избытком бластов-1
—	с избытком бластов-2
с избытком бластов и трансформацией	—
—	МДС неклассифицируемый
ХММЛ	—
—	С, ассоциированный с изолированной del(5q)

The FAB classification identifies 5 MDS subtypes including (table 1):

- refractory anemia (RA),
- refractory anemia with ring sideroblasts (RARS),
- refractory anemia with excess of blasts (RAEB) with 5~19% of blasts,
- refractory anemia with excess of blasts in transformation to acute leukemia (RAEB-t),
- chronic myelomonocytic leukemia (CMML).

De novo and secondary MDS were distinguished. In 1992 MDS was included into International Disease Classification, 10th revision (IDC X).

Further study of MDS discovered that morphological approach was not adequate for clinical requirements. The diagnostic spectrum was therefore enlarged to include cytogenetic, cultural, molecular tests. The MDS classification was revised respectively.

In 2001 WHO proposed an MDS classification with a more detailed definition of disease subtypes based on previous FAB classification [3].

Table 1 compares the two classifications.

Table 1

Comparison of FAB and 2001 WHO classifications of MDS

FAB classification	2001 WHO classification
Refractory anemia	
	with multilineage dysplasia
with ring sideroblasts	with ring sideroblasts
	with multilineage dysplasia and ring sideroblasts
with excess of blasts	with excess of blasts-1
	with excess of blasts-2
with excess of blasts in transformation	
	MDS unclassified
CMML	
	MDS associated with isolated del(5q)

Из представленных данных видно, что в новой классификации увеличилось число вариантов, а отдельные из них переведены в другие категории.

1. В классификации ВОЗ введен термин рефрактерная цитопения (РЦ), особое внимание уделено наличию прогностически неблагоприятной мультилинейной дисплазии у больных с рефрактерной цитопенией с/без кольцевыми сидеробластами. Поэтому рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД) и рефрактерной цитопения с наличием кольцевых сидеробластов (РЦМД – КС) были выделены в самостоятельный вариант.
2. Категория РАИБ разделена на два подварианта в зависимости от числа бластов:
 - РАИБ -1 с числом бластов 5~9%,
 - РАИБ - 2 –10~19%. бластов.

При числе бластов более 19% диагностируется острый лейкоз.

Поэтому вариант РАИБ – Т (по ФАБ-классификации) стал расцениваться как острый лейкоз. Кроме того, из числа МДС были исключены наблюдения с числом бластов менее 20%, но с наличием специфичных для ОНЛЛ хромосомных аномалий. К ним отнесены:

- t(8;21)(q22;q22), в результате которой образуется слитный ген *AML1/ETO*;
 - inv(16)(p13q22) или t(16;16)(p13;q22) с образованием слитного гена *CBFb/MYH11*
 - t(15;17)(q22;q12) с образованием слитного гена *PML/RARa* и другие варианты острого промиелоцитарного лейкоза.
3. Больные с утратой участка длинного плеча 5 хромосомы, как единственной аномалии кариотипа, с увеличением числа тромбоцитов и макроцитарной анемией были выделены в самостоятельный вариант МДС(del 5q) с благоприятным прогнозом.
 4. ХММЛ рассматривается не в МДС, а в промежуточной категории – миелодиспластический синдром/миелопролиферативное заболевание (МДС/МПЗ).
 5. Редкий вариант МДС – неклассифицируемый – характеризуется отсутствием анемии, но наличием нейтропении и/или тромбоцитопении в сочетании с дисплазией гранулоцитарного и/или мегакариоцитарного ростков.

Показатели крови и КМ больных разными вариантами МДС были унифицированы и суммированы в табл. 2 в соответствии с классификацией ВОЗ 2001 г. Принято клеточную линию считать измененной, если число диспластических клеток в ней составляет более 10%. Классификация ВОЗ 2001 г. позволила унифицировать диагностическую трактовку лабораторных данных в разных клиниках и поэтому нашла широкое применение в нашей стране [4] и за рубежом.

As seen, there are more subtypes and some of them are transferred into other classes in the new classification.

1. The WHO classification contains a new term “refractory cytopenia” (RC), emphasizes prognostically poor multilineage dysplasia in patients with refractory cytopenia with or without ring sideroblasts. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) and refractory cytopenia with ring sideroblasts (RCMD-RS) are classified as individual subtypes.
2. The RAEB category is divided into 2 subtypes depending upon blast count as:
 - RAEB-1 with 5~9% of blasts
 - RAEB-2 with 10~19% of blasts.

Blast portion greater than 19% is a basis for the diagnosis of acute leukemia. Therefore the FAB RAEB-t subtype is classified as acute leukemia. Cases with blast count less than 20%, but with chromosomal aberrations specific of ANLL were excluded from the MDS category. The aberrations included:

- t(8;21)(q22;q22) resulting in collision gene AML1/ETO;
 - inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22) leading to collision gene CBF β /MYH11;
 - t(15;17)(q22;q12) resulting in collision gene PML/RAR α and other subtypes of acute promyelocytic leukemia.
3. Cases with deletion of a part of chromosome 5 long arm as a single karyotypic abnormality, with increased platelet count and macrocytic anemia are identified as an individual subtype MDS(del5q) with a good prognosis.
 4. CMML is classified as an intermediate category “myelodysplastic syndrome/myeloproliferative disease (MDS/MPD) rather than a MDS subtype.
 5. The rare subtype MDS unclassified is characterized by no anemia, but the presence of neutropenia and/or thrombocytopenia in combination with granulocytic and/or megakaryocytic dysplasia.

Blood and bone marrow parameters from patients with different MDS subtypes were unified and tabulated with respect to the 2001 WHO classification. A cell line is thought to be pathologically changed if contains more than 10% of dysplastic cells (table 2). The 2001 WHO classification unified the diagnostic interpretations of laboratory findings in different centers and was commonly adopted in this country [4] and abroad.

Таблица 2

Показатели крови и КМ больных МДС (Классификация ВОЗ 2001)

Вариант МДС	Признаки в крови	Признаки в КМ
Рефрактерная анемия	Анемия, нет или мало бластов	Эритроидная дисплазия при числе бластов < 5%, < 15% кольцевых Сидеробластов
Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами	Анемия, нет бластов	$\geq 5\%$ кольцевых сидеробластов, эритроидная дисплазия при числе бластов < 5%
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией	Цитопения (бицитопения или панцитопения)	Дисплазия > 10% клеток в двух и более миелоидных линиях, < 5% бластов в костном мозге, нет палочек Ауэра, 5% кольцевых сидеробластов
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией и кольцевыми сидеробластами	Цитопения (бицитопения или панцитопения), нет или мало бластов, нет палочек Ауэра, $< 1 \times 10^6/\text{л}$ моноцитов	Дисплазия $\geq 10\%$ клеток в двух и более миелоидных линиях, 15% кольцевых сидеробластов, < 5% бластов, нет палочек Ауэра
Рефрактерная анемия с избытком бластов – 1	Цитопения, < 5% бластов, нет палочек Ауэра. $< 1 \times 10^6/\text{л}$ моноцитов	Уни– или мультилинейная дисплазия, 5–9% бластов, нет палочек Ауэра
Рефрактерная анемия с избытком бластов – 2	Цитопения, 5–19% бластов, палочки Ауэра $\pm$, $1 \times 10^6/\text{л}$ моноцитов	Уни– или мультилинейная дисплазия, 10–19% бластов, палочки Ауэра $\pm$.
МДС–неклассифицируемый	Цитопения, нет или мало бластов, нет палочек Ауэра	Уни– линейная дисплазия, < 5% бластов, нет палочек Ауэра
МДС, ассоциированный с изолированной утратой длинного плеча 5 хромосомы (5q-)	Анемия, обычно нормальное или повышенное число тромбоцитов, < 5% бластов	Нормальное или повышенное число мегакариоцитов с гипобулярным ядром, < 5% бластов, изолированная цитогенетическая аномалия del(5q), нет палочек Ауэра

Table 2

Blood and bone marrow findings in MDS patients (2001 WHO classification)

MDS subtype	Blood signs	Bone marrow signs
Refractory anemia	Anemia, few or no blasts	Erythroid dysplasia with blasts < 5%, ring sideroblasts < 15%
Refractory anemia with ring sideroblasts	Anemia, no blasts	Ring sideroblasts ≥ 15%, erythroid dysplasia with < 5% of blasts
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	Cytopenia (bicytopenia or pancytopenia)	Dysplasia > 10% of cells in 2 or more myeloid lineages, blasts < 5%, no Auer rods, ring sideroblasts < 15%
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ring sideroblasts	Cytopenia (bicytopenia or pancytopenia), few or no blasts, no Auer rods, monocytes < $1 \times 10^6/l$	Dysplasia ≥ 10% of cells in 2 or more myeloid lineages, ring sideroblasts ≥ 15%, blasts < 5%, no Auer rods
Refractory anemia with excess of blasts-1 (RAEB-1)	Cytopenia, blasts < 5%, no Auer rods, monocytes < $1 \times 10^6/l$	Uni- or multilineage dysplasia, blasts 5 to 9%, no Auer rods
Refractory anemia with excess of blasts-2 (RAEB-2)	Cytopenia, blasts 5 to 19%, Auer rods ±, monocytes < $1 \times 10^6/l$	Uni- or multilineage dysplasia, blasts 10 to 19%, Auer rods ±
MDS, NOC	Cytopenia, few or no blasts, no Auer rods	Uni- or multilineage dysplasia, blasts < 5%, no Auer rods
MDS associated with deletion of chromosome 5 long arm (5q-)	Anemia, platelets normal or elevated, blasts < 5%	Megakaryocytes with hypolobular nuclei normal or elevated, blasts < 5%, isolated cytogenetic anomaly del(5q), no Auer rods

Несмотря на детальную морфологическую характеристику признаков миелодисплазии, ряд положений классификации ВОЗ оставались спорными. Поэтому определение значимости разных морфологических критериев продолжало интересовать исследователей. В 2007 г. опубликованы Международные стандарты диагностики МДС [5]. Международная группа экспертов выделила (табл. 3) 3 группы признаков:

- а) «необходимые (*prerequisite-type*)» критерии,
- б) «убедительные (*decisive*)» критерии
- с) «дополнительные критерии (*co-criteria*)».

Использование уточненных критериев позволили затем выделить группу пациентов со спорной патологией гемопоэза, обозначаемой как идиопатическая цитопения неясного (неопределенного) значения (*idiopathic cytopenia of uncertain (undetermined) significance – ICUS*).

Для этой нозологической формы характерна цитопения одного и более ростков миелопоэза в течение более 6 мес.: эритроидного ($Hb < 11 \text{ г/дл}$), гранулоцитарного (абсолютное число нейтрофилов $< 1,5 \times 10^9/\text{л}$, мегакариоцитарного (тромбоциты $> 100 \times 10^9/\text{л}$), в сочетании с отсутствием минимальных критериев МДС.

При этом цитопения не может быть обусловлена другими гематологическими или негематологическими заболеваниями. Эта категория больных должна находиться под внимательным наблюдением с проведением регулярных исследований для подтверждения или исключения МДС.

К 2008 году накопились новые клинико-лабораторные данные, которые позволили пересмотреть и уточнить прежние положения, разработать следующую версию классификации ВОЗ [5]. В табл. 4 представлено сравнение первого и второго вариантов классификации.

Особое внимание в новой классификации было уделено морфологической и количественной оценке уни-, би- и трехлинейной дисплазии, поскольку мультилинейная (би- и трехлинейная) имеет существенно худшее прогностическое значение по сравнению с унилинейной [7]. При разработке новой классификации были приняты ряд важных постулатов:

1. Существенные изменения коснулись варианта рефрактерной анемии (РА). Установлен вариант – рефрактерная цитопения с унилинейной дисплазией (РЦУД), в который вошли наряду с РА, рефрактерная нейтропения (РН) и рефрактерная тромбоцитопения (РТ). Ранее РН и РТ рассматривались как МДС-Н.
2. Подтверждена обоснованность включения в группу больных РАИБ-2 случаев с числом бластов 5~10%, но при наличии палочек Ауэра в миелобластах, поскольку этот вариант заболевания является более агрессивным [8]. В то же время, у больных с числом бластов $< 20\%$, но со специфическими хромосомными аномалиями, диагностируется не МДС, а ОМЛ.

Notwithstanding detailed morphological characterization of myelodysplasia signs, some items of the WHO classification were equivocal. Therefore investigators continued the attempts to assess significance of various morphological criteria. In 2007 international standards in the diagnosis of MDS [5] were published. An international expert team identified 3 groups of signs: (A) prerequisite-type criteria, (B) decisive criteria and C (co-criteria (table 3).

These more accurate criteria allowed identification of a patient group with doubtful hemopoietic pathology referred to as idiopathic cytopenia of uncertain (undetermined) significance (ICUS). This clinical entity was characterized by cytopenia of one or more myelopoietic lineages lasting for more than 6 months: erythroid (Hb < 11 g/dl), granulocytic (absolute neutrophil count < $1.5 \times 10^9/l$, megakaryocytic (platelets < $100 \times 10^9/l$), in combination with the absence of minimal MDS criteria. The cytopenia cannot be due to other hematological or non-hematological diseases. This patient category should be monitored regularly to confirm or exclude MDS.

New clinical and laboratory data were accumulated by 2008 that allowed previous concepts to be revised and defined more accurately. This work resulted in the next WHO classification [5]. Table 3 compares the first and second variants of the classification.

The new classification emphasizes morphological and quantitative assessment of uni-, bi- and three-lineage dysplasia since multilineage (bi- or three-lineage) dysplasia is associated with a significantly poorer prognosis than unilineage dysplasia [7]. The following innovations were made in the new classification:

1. The refractory anemia (RA) type was changed. A new subtype “refractory cytopenia with unilineage dysplasia” (RCUD) was established that together with RA included refractory neutropenia (RN) and refractory thrombocytopenia (RT). The RN and RT subtypes were previously included in the MDS-U category.
2. Inclusion of cases with blast count 5~10% in combination with Auer rods in myeloblasts into the RAEB-2 subtype was confirmed since this subtype was thought to be more aggressive [8]. While cases with blast count less than 20%, but with specific chromosomal abnormalities was diagnosed as AML rather than MDS.

3. Среди больных РАИБ выделена особая группа с фиброзом костного мозга и плохим прогнозом – РАИБ-Ф.
4. Уточнены принципы выделения МДС-Н. В него включены пациенты с панцитопенией и уни-/мультилинейной дисплазией.
5. Впервые в самостоятельную нозологическую форму был выделен МДС у детей.

В классификации ВОЗ 2008 г. дана сводная уточняющая таблица изменений крови и костного мозга, специфичных для каждого варианта заболевания, а также отмечен ряд тех признаков, которые могут встречаться при разных вариантах МДС (табл. 5)

Больные с рефрактерной однолинейной цитопенией (РА, РН, РТ) характеризуются унилинейной дисплазией и нормальным содержанием бластов в крови и в костном мозге. Аналогичная картина кроветворения наблюдается при РАКС, но для нее специфично увеличенное число кольцевых сидеробластов. Следует отметить, что кольцевые сидеробласты могут определяться и при других вариантах МДС: мультилинейной цитопении, РАИБ, но в этих случаях они не имеют диагностического и прогностического значения. Вариант, ассоциированный с *del(5q)*, морфологически характеризуется, как при унилинейной эритроидной дисплазии.

Особое внимание в классификации уделено диагностическому значению повышения уровня бластов в периферической крови при нормальном содержании их в костном мозге. В частности, наличие 1% бластов в крови является основанием для диагноза МДС-Н, а увеличение их числа до 45% – РАИБ-1, а 5~19% РАИБ-2. При обнаружении палочек Ауэра в миелобластах, независимо от числа бластов, констатируется РАИБ-2.

МДС-Н не имеет специфических диагностических признаков. К нему относятся больные с панцитопенией с унилинейной или мультилинейной дисплазией, а также с цитопенией, нечеткой дисплазией и характерными цитогенетическими маркерами. В классификации ВОЗ 2008 года предложено рассматривать вариант рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами и с тромбоцитозом более 450×10^9 /л не как РАКС, а в категории миелопролиферативных новообразований, поскольку у большинства пациентов (60%) определяется специфическая мутация *JAK-2 V617F*.

Определенные трудности в диагностике составляют случаи гипопластических МДС. Они составляют около 10% МДС, и их приходится дифференцировать с апластической анемией, токсической миелопатией и аутоиммунными заболеваниями. Оценки самостоятельного прогностического значения этого варианта до настоящего времени не известно.

Характеристика МДС с миелофиброзом (МДС-Ф) занимает отдельное место в классификации. Как правило, это РАИБ вариант, отличающийся характерной картиной при исследовании трепанобиопсии, агрессивным клиническим течением и плохим прогнозом.

3. A specific group of cases with bone marrow fibrosis and poor prognosis was identified within the RAEB subtype (RAEB-F).
4. Criteria for MDS-U were specified. This subtype included patients with pancytopenia and uni- or multilineage dysplasia.
5. Childhood MDS was for the first time identified as a distinct clinical entity.

The 2008 WHO classification summarized and tabulated blood and bone marrow changes specific of different MDS types (table 4).

Patients with refractory unilineage cytopenia (RA, RN, RT) present with unilineage dysplasia and normal blast count in blood and bone marrow. RARS has a similar hemopoiesis pattern though has a specific feature of elevated ring sideroblast count. It should be mentioned that ring sideroblasts may also be found in other MDS types, such as multilineage cytopenia, RAEB, though in this case they are of no diagnostic or prognostic significance. Subtype associated with *del(5q-)* has a morphological pattern similar to that in unilineage erythroid dysplasia.

The classification emphasizes the diagnostic significance of elevated blast count in peripheral blood in parallel with normal blast count in bone marrow. In particular, blast count 1% in blood is a basis for the diagnosis of MDS-U type, while the diagnosis of RAEB-1 is made if blast count increases to 4 or 5% and RAEB-2 is diagnosed if blast count reaches 5 to 19%. The presence of Auer rods in myeloblasts is specific of RAEB-2.

MDS-U has no specific diagnostic features. This category includes cases with pancytopenia with unilineage or multilineage dysplasia as well as with cytopenia, unclear dysplasia and characteristic cytogenetic markers.

The 2008 WHO classification proposes that refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis more than $450 \times 10^9/l$ should be considered a myeloproliferative disease rather than RARS, since most of the patients (60%) present with specific mutation *Jak-2 V617F*.

Hypoplastic MDS is somewhat difficult to diagnose. It accounts for approximately 10% of MDS cases and requires to be differentiated from aplastic anemia, toxic myelopathy and autoimmune diseases. Independent prognostic significance of this subtype is unclear.

MDS with myelofibrosis (MDS-F) is identified as an individual subtype. It is usually a RAEB subtype with a characteristic punch biopsy pattern, aggressive clinical course and poor prognosis.

The recent WHO classification, though basing on previous criteria, presents some up-to-date requirements to the diagnosis of MDS and its subtypes. This classification is widely used in clinical practice, stirs up discussion and brings up further questions.

Таблица 3

Стандарты диагностики МДС

А	Необходимые критерии
	Постоянная цитопения одного и более ростков: эритроидного (Hb < 11г/дл), гранулоцитарного (абсолютное число нейтрофилов < $1,5 \times 10^9$ /л), мегакариоцитарного (тромбоциты < 100×10^9 /л).
	Отсутствие других гематологических и негематологических заболеваний, которые могут являться причиной цитопении/дисплазий ^b .
В	Связанные с МДС (убедительные)
	Дисплазия не менее 10% клеток, принадлежащих к одному из ростков миелопоэза, выявляемая при исследовании мазков костного мозга: эритроидного, гранулоцитарного, мегакариоцитарного или > 15% кольцевых сидеробластов (при окраске на железо).
	5~19% бластных клеток в костном мозге.
	Типичные хромосомные аномалии (при обычном цитогенетическом исследовании или при исследовании методом FISH) ^c .
С	Дополнительные критерии (для случаев наличия критериев А, но отсутствия критериев В или при типичных клинических ситуациях, например, макроцитарная анемия, требующая проведения гемотрансфузий)
	Аномальный фенотип клеток костного мозга, отчетливо указывающий на моноклональную популяцию эритроидных и/или миелоидных клеток, определяемый методом проточной цитометрии.
	Отчетливые молекулярные признаки наличия моноклональной клеточной популяции, определяемые с использованием HUMARA, микрочипов или исследования точечных мутаций генов (например, RAS).
	Значительно и постоянно сниженная колониеобразующая ($\pm$ кластерообразование) способность клеток-предшественников костного мозга и/или периферической крови.
HUMARA – исследование полиморфизма гена, кодирующего рецептор андрогена у человека. ^a Диагноз МДС устанавливается при наличии 2 «необходимых (prerequisite-type criteria) критериев» и, по крайней мере, 1 (из 3) дополнительных «связанных с МДС (убедительных) критериев MDS-related (decisive) criteria». При отсутствии «убедительных» критериев, но при подозрении на наличие клонального заболевания миелоидной природы следует использовать «дополнительные критерии (co-criteria)» для решения вопроса о наличии у больного МДС или «серьезного подозрения на МДС». ^b Поскольку существуют пациенты с одновременным опухолевым поражением костного мозга разными заболеваниями, следует учитывать, что диагноз МДС может быть установлен даже при наличии другого сопутствующего заболевания, способного вызвать цитопению. ^c К типичным хромосомным аномалиям относят те изменения кариотипа, которые периодически встречаются при МДС (8, 7, 5q-, 20q- и др.). В тех случаях, когда аномальный кариотип является единственным диагностическим критерием, это состояние следует расценивать как «серьезное подозрение на МДС». ^d Дополнительные критерии не следует рассматривать в качестве стандартов в рутинной гематологической практике. При невозможности выполнения этих исследований в спорных случаях следует наблюдать за больным и мониторировать показатели, на основании которых устанавливается диагноз МДС.	

Table 3

Standards in diagnosis of MDS

A	Prerequisite-type criteria
	Refractory uni- or multilineage cytopenia: erythroid (Hb <11g/dl), granulocytes (absolute neutrophil count <1.5 × 10 ⁹ /l), megakaryocytes (platelets <100 × 10 ⁹ /l).
	No other hematological or non-hematological disorders able to induce cytopenia/dysplasia ^b .
B	MDS-related (decisive) criteria
	Dysplasia of at least 10% of cells belonging to 1 myelopoietic lineage by bone marrow smear: erythroid, granulocyte.
	5~19% of blasts in bone marrow
	Typical chromosomal anomalies (by routine cytology or FISH) ^c
C	Co-criteria (if criteria A are present, but criteria B are absent)
	Abnormal phenotype of bone marrow cells clearly indicating the presence of monoclonal population of erythroid and/or myeloid cells by flow cytometry
	Clear molecular signs of the presence of a monoclonal cell population by HUMARA, microchip, point mutation tests
	Significantly and persistently decreased colony forming (± cluster forming) ability of precursor cells in bone marrow and/or peripheral blood
HUMARA, test for polymorphism of gene encoding human androgen receptor. ^a The diagnosis of MDS is made if 2 prerequisite-type criteria and at least 1 (of 3) MDS-related (decisive) criterion are present. If no decisive criteria are present, but a myeloid clonal disorder is suspected, co-criteria should be used for a definite diagnosis of MDS or serious suspicion of MDS. ^b Since some patients have a concomitant bone marrow disorders due to different diseases, the diagnosis of MDS may be made even in the presence of another concomitant disease able to induce cytopenia. ^c Typical chromosomal abnormalities include karyotypic changes found regularly in MDS (8, 7, 5q-, 20q-, etc.). When an abnormal karyotype is the only diagnostic criterion, the condition should be defined as serious suspicion of MDS. ^d Co-criteria should not be considered as routine hematological standards. If these tests cannot be done, in a doubtful case one has to monitor the patient and parameters that served a basis for the MDS diagnosis.	

Таблица 4

Сопоставление классификации ВОЗ 2001 и 2008 годов

Вариант МДС ВОЗ 2001	Вариант МДС ВОЗ 2008
Рефрактерная анемия (РА)	Рефрактерная цитопения с унилинной дисплазией (РЦУД): рефрактерная анемии (РА), рефрактерная нейтропения (РН), рефрактерная тромбоцитопения (РТ)
Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)	Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)
Рефрактерная цитопения с мультилинной дисплазией (РЦМД) Рефрактерная цитопения мультилинной дисплазией и кольцевыми сидеробластами (РЦМД-КС)	Рефрактерная цитопения с мультилинной дисплазией (РЦМД)
Рефрактерная анемия с избытком бластов–1 (РАИБ–1)	Рефрактерная анемия с избытком бластов–1 (РАИБ–1)
Рефрактерная анемия с избытком бластов–2 (РАИБ–2)	Рефрактерная анемия с избытком бластов–2 (РАИБ–2)
Миелодиспластический синдром неклассифицируемый (МДС-Н)	Миелодиспластический синдром неклассифицируемый (МДС-Н)
Миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной del(5q)	Миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной del(5q)
—	МДС у детей

Table 4

Comparison of 2001 and 2008 WHO classifications

2001 WHO MDS subtype	2008 WHO MDS subtype
Refractory anemia (RA)	Refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD): refractory anemia (RA), refractory neutropenia (RN), refractory thrombocytopenia (RT)
Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)	Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) Refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ring sideroblasts (RCMD-RS)	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)
Refractory anemia with excess of blasts-1 (RAEB-1)	Refractory anemia with excess of blasts-1 (RAEB-1)
Refractory anemia with excess of blasts-2 (RAEB-2)	Refractory anemia with excess of blasts-2 (RAEB-2)
Myelodysplastic syndrome, unclassified (MDS-U)	Myelodysplastic syndrome, unclassified (MDS-U)
Myelodysplastic syndrome associated with deletion of chromosome 5 long arm (5q-)	Myelodysplastic syndrome associated with deletion of chromosome 5 long arm (5q-)
—	Childhood MDS

Таблица 5

Показатели периферической крови и костного мозга у взрослых больных МДС

Вариант МДС	Изменения крови	Изменения костного мозга
Рефрактерная цитопения с унилинейной дисплазией (РЦУД: РА, РН, РТ)	Уни- или бицитопения ¹ Нет или мало бластов (<1%) ²	Унилинейная дисплазия:>10% клеток миелоидной линии <5% бластов <15% кольцевых сидеробластов
Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)	Анемия Нет бластов	≥15% эритроидных предшественников являются кольцевыми сидеробластами, только эритроидная дисплазия. <5% бластов.
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД)	Цитопения (и) Нет или мало бластов (<1%) ² Нет палочек Ауэра <1×10 ⁹ /л моноцитов	Дисплазия ≥10% клеток ≥2 миелоидных линий (нейтрофилов и/или эритроидных предшественников и/или мегакариоцитов) <5% бластов в к.м. Нет палочек Ауэра ±15% кольцевых сидеробластов
Рефрактерная анемия с избытком бластов-1 (РАИБ-1)	Цитопения (и) <5% бластов Нет палочек Ауэра <1×10 ⁹ /л моноцитов	Унилинейная или мультилинейная дисплазия 5–9% бластов Нет палочек Ауэра
Рефрактерная анемия с избытком бластов-2 (РАИБ-2)	Цитопения (и) 5–19% бластов Палочки Ауэра ± ³ <1×10 ⁹ /л моноцитов	Унилинейная или мультилинейная дисплазия 10–19% бластов Палочки Ауэра ±
Миелодиспластический синдром неклассифицируемый (МДС- Н)	Цитопения <1% бластов ²	Четкая дисплазия <10% клеток в одной или более миелоидных линий, сопровождающаяся цитогенетическими аномалиями, принятые в качестве диагностических при МДС <5% бластов
МДС, ассоциирующийся с изолированной del(5q)	Анемия Нормальное или увеличенное число тромбоцитов Нет или мало бластов (<1%)	Нормальное или увеличенное число мегакариоцитов с гипобулярными ядрами <5% бластов Изолированная цитогенетическая аномалия делеция 5(q) Нет палочек Ауэра

¹ Бицитопения может иногда наблюдаться. Случаи с панцитопенией должны классифицироваться как МДС-Н.

² Если процент миелобластов в костном мозге < 5%, но в крови миелобластов 2~4%, диагноз классифицируется как РАИБ-1. Случаи РЦУД или РЦМД с 1% миелобластов в крови должны быть классифицированы как МДС-Н.

³ Случаи с палочками Ауэра при том, что миелобластов в крови < 5% и в костном мозге < 10%, должны быть классифицированы как РАИБ-2.

Table 5

Peripheral blood and bone marrow parameters in adults with MDS

MDS subtype	Blood changes	Bone marrow changes
Refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD: RA, RN, RT)	Uni- or bicytopenia ¹ No or few blasts (< 1%)	Unilineage dysplasia: > 10% of myeloid cells Blasts < 5% Ring sideroblasts < 15%
Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)	Anemia No blasts	≥ 15% of erythroid precursors are ring sideroblasts Erythroid dysplasia only Blasts < 5%
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)	Cytopenia No or few blasts (< 1%) No Auer rods Monocytes < $1 \times 10^9/l$	Dysplasia ≥ 10% of cells of ≥ 2 myeloid lineages (neutrophils and/or erythroid precursors and/or megakaryocytes) Blasts < 5% No Auer rods ± 15% of ring sideroblasts
Refractory anemia with excess of blasts-1 (RAEB-1)	Cytopenia (and) Blasts < 5% No Auer rods Monocytes < $1 \times 10^9/l$	Unilineage or multilineage dysplasia Blasts 5 to 9% No Auer rods
Refractory anemia with excess of blasts-2 (RAEB-2)	Cytopenia (and) Blasts 5 to 19% Auer rods ± 3 Monocytes < $1 \times 10^9/l$	Unilineage or multilineage dysplasia Blasts 10 to 19% Auer rods ±
Myelodysplastic syndrome, unclassified (MDS-U)	Cytopenia Blasts < 1% ²	Clear dysplasia < 10% of cells in 1 or more myeloid lineages with cytogenetic abnormalities adopted as diagnostic in MDS Blasts < 5%
Myelodysplastic syndrome associated with deletion of chromosome 5 long arm (5q-)	Anemia Platelets normal or elevated No or few blasts (< 1%)	Megakaryocytes with hypolobular nuclei normal or elevated Blasts < 5% Isolated cytogenetic abnormality deletion 5(q) No Auer rods

¹ Bicytopenia may be observed. Cases with pancytopenia should be classified as MDS-U.
² If myeloblasts are < 5% in bone marrow, but 2 to 4% in blood, the diagnosis is RAEB-1. RCUD and RCMD with 1% of myeloblasts in blood should be classified as MDS-U.
³ Cases with Auer rods and myeloblasts < 5% in blood and < 10% in bone marrow should be diagnosed as RAEB-2.

Таким образом, последняя классификация ВОЗ, основываясь на критериях предыдущих исследований, добавляет ряд современных требований к диагностике МДС и их вариантов. Она широко используется в современной клинической деятельности, обсуждается и вызывает очередные вопросы перед исследователями.

Одной из обсуждаемых тем является валидность данных трепанобиопсии. При МДС в трепанобиоптате костного мозга определяются характерные отличия от нормальной гистотопографии: предшественники эритропоэза и мегакариоциты расположены ближе к паратрабекулярной области, где в норме локализуются гранулоциты. Трепанобиоптат может быть использован для установления количества бластов, особенно при гипоцеллюлярности и/или фиброзе костного мозга. Бласты при РАИБ имеют тенденцию образовывать кластеры или агрегаты. Иммуногистохимическое исследование на наличие бластов CD34 может помочь их идентификации. Степень фиброза может быть выражена в различной степени, у 15% больных она определяется как значительная, и у них диагностируется МДС с фиброзом (МДС-Ф). Этот вариант устанавливается при наличии грубого диффузного ретикулинового фиброза с/без сопутствующего коллагенового фиброза, ассоциирующегося с дисплазией не менее двух миелоидных линий. Характерным признаком РАИБ-Ф является увеличение числа мегакариоцитов с различным спектром клеток по размеру (включая микромегакариоциты) и высокую степень дисплазии. Поскольку отсутствует консенсус исследователей по определению необходимой степени фиброза для диагноза МДС-Ф, остается неясным представляет ли фиброз независимый прогностический параметр. Дифференциальный диагноз МДС-Ф требуется проводить с реактивными гемопозитическими состояниями (так называемые ВИЧ-связанные миелопатии) и с различными миелопролиферативными новообразованиями (панмиелоз с миелофиброзом, ранее расцениваемый как острый злокачественный миелофиброз), при которых также выявляется фиброз костного мозга.

Большое число публикаций последнего времени связано с исследованиями иммунофенотипа клеток гемопоэза методом проточной цитометрии. Полученные данные характеризуют размер и иммунофенотип CD34 бластной популяции, особенности созревания клеток миелоидной линии и применяются в балльных системах для прогноза заболевания [8]. У большинства пациентов была установлена корреляция между процентом бластов, определяемым рутинно морфологически на мазках костного мозга или на иммуногистохимических препаратах, и процентом CD34 клеток при проточной цитометрии. Исключение составили случаи МДС-Ф. Появление патологической популяции CD34 или CD117 клеток ориентируют врача на эволюцию заболевания [9].

Использование 4-цветного цитофлуориметра дает информацию об эритроидной дисплазии с 98%-ной, гранулоцитарной – с 90%-ной и аномальной цитогенетикой с 90%-ной чувствительностью по сравнению с созревaniem элементов в нормальном/реактивном костном мозге и в крови [10].

One of the problems under discussion is validity of punch biopsy findings. Bone marrow punch biopsies from MDS patients demonstrate characteristic deviations from normal histotopography: (erythropoiesis precursors and megakaryocytes are found nearer to the paratrabecular region where granulocytes are normally found).

Punch biopsy may be useful in blast measurement, in particular in cases with bone marrow hypocellularity and/or fibrosis. In RAEB blasts demonstrate a tendency to unite into clusters or aggregations. Immunohistochemical study for CD34 blasts may be useful in their identification. Fibrosis may vary in degree: in 15% of cases fibrosis may reach a rather high grade, and these cases are therefore diagnosed as MDS with fibrosis (MDS-F). This subtype is diagnosed basing on the presence of rough diffuse reticulofibrosis with or without collagen fibrosis in association with dysplasia of at least 2 myeloid lineages. The RAEB-F subtype has a characteristic feature of elevated megakaryocyte count with cells of different size (including micromegakaryocytes) and high level of dysplasia. Since there is no consensus on definition of fibrosis severity for the diagnosis of MDS-F, it remains unclear whether fibrosis is an independent factor of prognosis. MDS-F should be differentiated from reactive hemopoietic disorders (so called HIV-associated myelopathies) and from a variety of myeloproliferative neoplasias (panmyelosis with myelofibrosis previously classified as acute malignant myelofibrosis) that are also associated with bone marrow fibrosis.

Recently there was a vast literature on hemopoietic cell immunophenotyping by flow cytometry. This approach provides data for characterization of size and immunophenotype of CD34 blast population, myeloid cell maturation and to be used as score for disease prognosis [8]. Correlation between percent of blasts as determined by routine morphological study of bone marrow smears or by immunohistochemistry and percent of CD34 cells by flow cytometry is found in most cases, except MDS-F. The presence of CD34 or CD117 pathological populations is evidence of disease evolution [9].

Four color flow cytometry provides information with a sensitivity 98% for erythroid dysplasia, 90% for granulocyte dysplasia and 90% for abnormal cytogenetics as compared to maturation of elements in normal/reactive bone marrow and blood [10].

В случаях дисплазий пограничных по морфологическим признакам или цитогенетическим аномалиям результаты проточной цитометрии значимы только в тех случаях, где выявлены три или более аберрантных признака в созревании эритроидной, гранулоцитарной или моноцитарной линий. Случаи с неубедительными морфологическими и цитогенетическими признаками при наличии трех и более аберрантных иммунофенотипических признаков должны быть пересмотрены через несколько месяцев для определения морфологических и цитогенетических критериев МДС.

При патогенетическом подходе к диагнозу МДС в настоящее время все большее место занимают цитогенетические и молекулярные исследования с определением клональности, прогноза и установления цитогенетических, морфологических и клинических взаимосвязей. Клональные цитогенетические аномалии определяются приблизительно в 50% случаев МДС. Наличие изолированной *del(5q)* позволяет установить самостоятельный вариант МДС с хорошим прогнозом. Утрата 17p ассоциируется с псевдо-Пельгеровской аномалией, мелкой вакуолизацией нейтрофилов, *TP53* мутацией и неблагоприятным клиническим течением, сходным с вторичным МДС. Сложные нарушения кариотипа (≥ 3 аномалий), как правило, включают хромосому 5 и/или 7 [*-5/del(5q)*, *-7/del(7q)*] и ассоциируются с неблагоприятным клиническим течением. Некоторые другие цитогенетические изменения взаимосвязаны с характерными морфологическими аномалиями, так, изолированная *del(20q)* – с поражением эритроидных клеток и мегакариоцитов, аномалия 3 хромосомы [*inv(3)(q21q26.2)* или *t(3;3)(q21;q26)*] – с увеличением аномальных мегакариоцитов. Цитогенетические аномалии, выявленные при МДС в виде единственной аномалии, такие как *-Y*, 8 или *del(20q)*, не являются определяющими доказательствами этого заболевания при отсутствии морфологических критериев. Другие аномалии при наличии рефрактерной цитопении, но без признаков дисплазии считаются только предположительными для диагноза МДС. В классификации ВОЗ 2008 г. рекомендовано тщательное наблюдение за этими больными для выявления морфологических проявлений МДС.

Из вышесказанного ясно, что диагноз МДС и его вариантов требует комплексного исследования клеток гемопоэза. Следует учесть, что цитопения и большинство диспластических признаков не являются патогномоничными для МДС и могут встречаться при различных нозологических формах, в том числе при B_{12} - и фолатдефицитной анемиях, при интоксикации тяжелыми металлами, при алкогольном поражении печени, различных вирусных инфекциях (инфекционный мононуклеоз, инфекционный лимфоцитоз, гепатиты А, В, С, цитомегаловирус), пароксизмальной ночной гемоглобинурии, наследственной форме болезни Пельгера, СПИДЕ, а также вследствие цитостатической терапии.

Диспоэз обнаруживается также при острых миелоидных лейкозах, промежуточной группе миелодиспластических/миелопролиферативных новообразований (МДС/МПН).

In case of morphologically or cytologically marginal dysplasia flow cytometry is valid only in cases with three or more aberrant features in maturation of erythroid, granulocytic or monocytic lineages. Cases with uncertain morphological and cytogenetic features in parallel with three or more aberrant immunophenotypic findings should be retested several months later to determine morphological and cytogenetic criteria of MDS.

The pathogenetic approach to MDS diagnosis is increasingly using cytogenetic and molecular tests to determine clonality, prognosis and cytogenetic, morphological and clinical relationships. Clonal cytogenetic abnormalities are found in approximately 50% of MDS cases. The presence of isolated del(5q) is evidence of a specific MDS subtype with good prognosis. Loss of 17p is associated with pseudoPelger anomaly, small neutrophil vacuolization, TP53 mutation and poor clinical course similar to secondary MDS. Complex karyotypic abnormalities (≥ 3 anomalies) as a rule involve chromosome 5 and/or 7[-5/del(5q), -7/del(7q)] and are associated with poor clinical course. Some other cytogenetic changes are related to characteristic morphological abnormalities: for instance, isolated del(20q) is related to erythroid and megakaryocyte disorders, chromosome 3 anomaly [inv(3)(q21126.6) or t(3;3)(q21;q26)] is associated with increase in abnormal megakaryocyte count. Single cytogenetic abnormalities such as Y, 8 or del(20q) cannot be considered determinant evidence of MDS if morphological signs are lacking. Other anomalies in combination with refractory cytopenia, but without dysplasia are thought suggestive of MDS diagnosis. The 2008 WHO classification recommends to monitor such patients regularly to detect morphological signs of MDS.

As seen from the above said, complex study of hemopoietic cells is needed to make the diagnosis of MDS and its subtypes. It should be noted that cytopenia and most dysplastic signs are not pathognomic for MDS and may be found in a variety of clinical entities including B₁₂ and folate-deficient anemias, heavy metal intoxication, alcohol liver disorder, virus infection (infectious mononucleosis, infectious lymphocytosis, hepatitis A, B, C, cytomegalovirus), paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, hereditary Pelger Disease, AIDS, and cytostatic therapy sequels.

Dyspoiesis is also found in patients with acute myeloid leukemia, intermediate group myelodysplastic/myeloproliferative neoplasia (MDS/MPN).

Поэтому работы по уточнению критериев диагностики МДС и их вариантов и установлению их клинической значимости продолжаются и до настоящего времени. Так, германской группой на большом числе наблюдений, более 2,5 тысяч пациентов, было проведено изучение большинства морфологических критериев дисмиелопоэза.

Диагностически важными оказались следующие признаки: частота гипогранулярных форм, псевдо-пельгероидных форм, микромегакариоцитов и одноклеточных мегакариоцитов. Эти 4 параметра в сочетании числом бластов крови и костного мозга позволяют четко охарактеризовать варианты МДС в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. у большинства больных [13].

На Первой Европейской рабочей конференции LeukemiaNet в 2009 году, посвященной стандартизации параметров цитофлюориметрии при МДС [14], были установлены минимальные диагностические комбинации антител для определения аберрантного иммунофенотипа и дисплазии. Данные цитофлюориметрии образцов с аберрантным фенотипом коррелировали с морфологическими параметрами вариантов МДС и дополнили прогностические системы. Однако рабочая группа в заключение сделала вывод о необходимости в будущем валидации маркеров и стандартизации данных мультицентровых исследований. Особый интерес сегодня представляют перспективные работы по определению особенностей иммунофенотипа наиболее сложных в диагностическом отношении вариантов МДС (РЦУД и РЦМД) [15].

Литература

1. Лорие Ю.И., Поддубная И.В., Мансуров А.Н., Френкель М.А. Сб. Новое в гематологии М., 1974. – с. 5079
Lorie U.I., Poddubnaya I.V., Mansurov A.N., Frenkel M.A. News in haematology M. 1974 p. 5079 (in russian)
2. Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br.Haematol – 1982 – v.51: 189-199.
3. World Health Organization Classification of tumor. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, 2001.
4. Ширин А. Д., Френкель М.А. Миелодиспластические синдромы. В кн. Клиническая онкогематология. Под ред. проф. М.А.Волковой. – М., Медицина, 2007 – с. 502-52
5. Shirin A.D., Frenkel M.A. Myelodysplastic syndromes. In: Clinical oncohaematology (prof. M.A. Volkova ed.) Moscow, 2007 p. 502-52 (in russian).
6. Valent P., Horny H-P, Bennett J.M. et al. Definition and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference Leukemia research 2007, 31: 727-36.
7. Brunning R.D., Orazi A., Germing U. et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. В кн. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC. Lyon, 2008 : 88-93.

Therefore research in more accurate specification of criteria for the diagnosis of MDS and its subtypes, and in their clinical significance is continued. For instance, a German team analyzed more than 2.5 thousand cases to study most of dysmyelopoietic criteria. The following signs appeared of diagnostic value: fraction of hypogranular forms, pseudopelgeroid forms, micromegakaryocytes and mononuclear megakaryocytes. These 4 parameters in combination with blast count in blood and bone marrow allow clear characterization of MDS subtypes in accordance with 2008 WHO classification in most patients [13].

The First European LeukemiaNet working conference (2009) on standardization of flow cytometry in MDS [14] established minimal diagnostic antibody combinations to define aberrant immunophenotypes and dysplasia. Flow cytometry data from specimens with aberrant phenotype correlated with morphological parameters of MDS subtypes and were added to prognostic systems. However, the working group made the conclusion on the importance of validation of markers and standardization of data from multicenter studies in future. Of much interest today is a prospective validation study of immunophenotypic features of most diagnostically difficult MDS subtypes, such as RCUD and RCMD [15].

8. *Malcovati L., Della Porta M.G., Pascutto C. et al.* WPSS, a dynamic prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journ.Clinical Oncol.*2005 23, 30: 794760.
9. *Willis MS, McKenna R.W., Peterson L.C. et al.* Low blast count myeloid disorders with Auer rods: a clinicopathologic analysis of 9 cases. *Am. J Clin. Pathol* 2005 124, v.2: 191198.
10. *Bennett J.M.* Myelodysplastic syndromes: update on classification. *Leukemia Res.*2009 v33: S6/
11. *Cazzola M.* Flow cytometry immunophenotyping for diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009, 94: 10411043.
12. *Mattaraz S, Lopez A., Barrena S et al.* The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008 ,22:11751183.
13. *Loken M.R., Loosdrecht A., Ogata K. et al.* Flow cytometry in myeloid syndromes: Report from a working conference. *Leukemia research* 2008,32: 517/
14. *van de Loosdrecht A A, Alhan C., Bene MC et al.* Identification of distinct prognosis subgroups in low- and intermediate -1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008, 1; 11(3):106777.
van de Loosdrecht A. A, Alhan C., Bene M.C. 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: 11241134
15. *Ogata K., Della Porta M.G., Malcovati L. et al.* Diagnostic utility of flow cytometry in low grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009; 94(8):106674.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

ВПЕРВЫЕ!
Русскоязычная версия!

Группа компаний «СвятЧайлд» – единственный в России представ



TYPE OCTAMINHY

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОНКОЛОГИИ
Annals of Oncology



Материалы, необходимые для
выполнения работы
по специальности «Экономика
и управление на предприятии
металлургического производства»
в объеме 100 часов

in an appropriate context and
 appropriate, modern
 and well-timed, appropriate
 (but not necessarily well-timed)

Elizabeth A. Thompson, MD
 Department of Pediatrics
 University of Michigan
 Ann Arbor, Michigan

© 2009 John Wiley & Sons, Ltd.
J. Clin. Invest. 119: 1111–1120 (2009)
doi:10.1038/s13584-009-0001-1



Председатель редакционного совета

Ab 16. Jahrhundert: Typenvarianten für die sechs Hauptgruppen (siehe Tabelle 1) sind in der Literatur (z.B. in der *Handbuch der Kunstgeschichte*) beschrieben. Die Typenvarianten sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die Typenvarianten sind in der Tabelle 1 dargestellt.

ВНИЖАНИЕ! ПОДПИСАИ

тел.: +7 (495) 608-25-45 (доб.114)

www.humrep.ru

**НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА
РАМН**



Л.Ю. Гривцова, А.В. Попа, И.Н. Серебрякова, Н.Н. Тупицын

**К ДАЛЬНЕЙШЕЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК
В КОСТНОМ МОЗГЕ ДЕТЕЙ С В-ЛИНЕЙНЫМИ
ОСТРЫМИ ЛИМФОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ
НА 15-Й ДЕНЬ ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В настоящее время клинически подтверждена значимость оценки минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей на 15-й день химиотерапии индукции. Оценка количества остаточных бластов на данном этапе позволяет выявить группу пациентов благоприятного прогноза, у которых интенсивность терапии индукции может быть снижена.

Метод выбора детекции остаточных лейкозных лимфобластов на данном этапе – проточная цитометрия – ввиду клинической значимости должен быть хорошо стандартизован и воспроизводим. Однако среди реализуемых в клинике протоколов ПЦ присутствуют разногласия и единого мирового стандарта до сих пор не существует. Принципиальными являются расхождения в пороговом уровне лейкозных бластов, определяемых методом проточной цитометрии.

В данной статье мы проанализировали существующие цитометрические подходы к детекции клеток МОБ в сопоставлении с морфологическими данными на основании собственных и литературных данных.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, 15-й день индукционной химиотерапии, проточная цитометрия.

Введение

В настоящее время в числе факторов прогноза, при лечении острых лимфобластных лейкозов у детей все более значимую роль приобретает количество лейкозных бластов в костном мозге – МРБ, выявляемое на разных этапах полихимиотерапии, морфологически, методами ПЦ и молекулярными методами (ПЦР) [1–4].

Оценка МРБ в разные сроки преследует различные цели. Количество лейкозных бластов в крови и костном мозге на этапе химиотерапии индукции отражает первичный ответ на терапию, в частности, чувствительность опухоли к кортикостероидам.

Оценка МРБ на этапе терапии консолидации и более поздних сроках позволяет стратифицировать больных и выявить пациентов группы высокого риска, нуждающихся в высокодозной химиотерапии и аллогенной трансплантации костного мозга [5–8].

L.Yu. Grivtsova, A.V. Popa, I.N. Serebryakova, N.N. Tupitsyn

**TO FURTHER STANDARDIZATION
IN DETECTION OF RESIDUAL BLASTS IN BONE MARROW
OF CHILDREN WITH B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA
ON DAY 15 OF INDUCTION THERAPY**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

Currently, clinical assessment confirmed the importance of a minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia of B-linear precursors of the children at the 15 th day of induction chemotherapy. Estimate of the number of residual blasts at this stage reveals a group of patients a favorable prognosis, in which the intensity of induction therapy can be reduced.

Selection method of detection of residual leukemic lymphoblasts at this stage - flow cytometry - in view of clinical significance should be well standardized and reproducible. However, among implemented in clinical protocols, PC-ke present controversy and a single global standard so far does not exist. Are fundamental differences in the threshold of leukemic blasts, determined by flow cytometry.

In this paper we have analyzed existing approaches for cytometric detection of MRD cells in comparison with morphological data-governmental on the basis of our own and literature data.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, 15-day induction chemotherapy, flow cytometry.

Introduction

The level of leukemic blasts in bone marrow – MRD as measured by morphological study, FC or molecular assays (PCR) at different time points of polychemotherapy is currently becoming an increasingly important factor of prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia [14].

The MRD is measured with different purposes at different time points. Leukemic blast count in blood and bone marrow during induction chemotherapy is a reflection of first response to treatment, in particular, of tumor sensitivity to corticosteroids.

MRD assessment during consolidation and at a later time is made to stratify patients and to identify a high-risk group of candidates for high-dose chemotherapy and allogeneic bone marrow grafting [5–8].

Цитоморфологические критерии оценки раннего ответа на 7–8-й дни (периферическая кровь) преднизолоновой префазы индукционной химиотерапии, один из первых параметров прогноза и риск-стратификации, использовавшийся до недавнего времени в протоколах AIEOP-BFM-ALL в течение более 2 десятилетий. Редукция бластов до 1000 клеток/мкл – хороший ответ на преднизолон – группа более благоприятного прогноза [6; 9; 10].

В протоколы AIEOP-BFM-ALL 2008 был введен новый параметр – оценка количества лейкозных бластов в костном мозге на 15-й день индукционной химиотерапии, оказавшийся наиболее стабильным (достоверным) прогностическим фактором. В настоящее время пороговым уровнем является 0,1% лейкозных бластов среди миелокариоцитов [11].

Чувствительность стандартных морфоцитохимических методов в данной ситуации недостаточна, а ПЦР-диагностика не может быть применена для оценки степени редукции бластных клеток во время индукционной химиотерапии. Метод выбора детекции МРБ на этапе химиотерапии индукции – многоцветная проточная цитометрия. На данный момент в клинической практике используется несколько вариантов мультипараметровой проточной цитометрии детекции минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников (BCP-ALL) у детей:

- Упрощенный трехпараметровый протокол, предложенный E. Coustan-Smith et al. (2006) основан на полной элиминации нормальных В-линейных предшественников в костном мозге на 19-й день химиотерапии индукции [12].
- Четырехпараметровый (4-цветный) протокол COG (Children Oncology Groupe, USA, M. Borowitz et al. [8]). В настоящее время данный протокол модернизирован в 6-цветный и оптимизирован для оценки МРБ на день окончания индукционной химиотерапии (29 день от начала лечения) с целью риск-стаификации.
- Четырехцветный протокол AIEOP-BFM-ALL (J. Basso et al. [11]), применяемый для оценки клиренса лейкозных бластов на 15-й день химиотерапии индукции у детей с BCP-ALL. Именно этот подход реализуется в настоящее время в протоколах BFM для возможной редукции доз антрациклинов при полной элиминации бластов.

В настоящей статье мы попытались проанализировать существующие ПЦ подходы к детекции минимальной резидуальной при BCP-ALL у детей на 15-й день индукционной химиотерапии с использованием литературных и собственных данных.

Материалы и методы

В исследовании проанализировано 67 образцов костномозговых пунктатов, полученных на 15-й день химиотерапии индукции у 67 детей с BCP-ALL.

Cytomorphological criteria of early response on days 7–8 (peripheral blood) of prednisolone preface of chemotherapy induction was one of the first factors for prognosis and risk stratification used in AIEOP-BFM-ALL protocols until recently for more than two decades. Reduction in blast count to 1000 cells/mcl is evidence of good response to prednisolone and a predictor of good prognosis [6;9;10]

The 2008 AIEOP-BFM-ALL protocols included a new parameter, i.e. leukemic blast count in bone marrow on day 15 of induction chemotherapy that appeared a most stable (robust) prognostic factor. A current threshold is 0.1% of leukemic blasts per myelokaryocytes [11].

Sensitivity of standard morphocytochemical tests is not sufficient and PCR cannot be used to assess blast reduction during induction chemotherapy. Multicolor FC is the method of choice for MRD detection during induction chemotherapy.

There are several types of multiparametric FC detection of MRD in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL):

- A simplified three-parameter protocol proposed by E. Coustan-Smith et al. (2006) is based on complete elimination of normal pre-B-cells in bone marrow on day 19 of induction chemotherapy [12].
- A four-parameter (four-color) protocol COG (Children Oncology Group, USA, M. Borowitz et al. [8]). This protocol is currently updated to a 6-color version and optimized for MRD measurement on the day of induction chemotherapy cessation (day 29 from treatment start) for risk stratification.
- A four-color protocol AIEOP-BFM-ALL (J. Busso et al.) [11] is used to measure leukemic blast clearance on day 15 of induction chemotherapy in children with BCP-ALL. It is this approach that is currently used in BFM protocols for the purpose to reduce if possible anthracycline doses in case of complete blast elimination.

We have attempted in this paper to analyze current FC approaches to MRD detection in children with BCP-ALL on day 15 of induction chemotherapy basing on literature findings and our own experience.

Materials and methods

We have analyzed 67 bone marrow specimens obtained on day 15 of induction chemotherapy from 67 children with BCP-ALL.

Средний возраст пациентов составил 5,6 года (от 6 месяцев до 18 лет). Детей младше 1 года было четверо. У 64 больных на момент первичной диагностики определен пре-пре-В (ВII) иммуноподвариант острого лимфобластного лейкоза и у 3 детей был диагностирован про-В (ВI) иммуноподвариант ОЛЛ. Морфологически бласты расценены в большинстве случаев как L2.

Каждый образец пунктата костного мозга на 15-й день химиотерапии был охарактеризован морфологически и оценен иммунологически на предмет выявления остаточных/резидуальных лейкозных клеток – минимальной резидуальной болезни (МРБ). Подсчет контрольной миелограммы производили двумя морфологами (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Романовского–Гимза.

Иммунологическое выявление остаточных лейкозных лимфобластов (В-линейные предшественники) в костномозговых пунктатах проводили методом проточной цитометрии с использованием реакции прямой иммунофлуоресценции, сразу после получения материала.

В 50 случаях для оценки МРБ использовали трехцветный протокол [12]. В этом случае панель МРБ при низкой клеточности образцов состояла из одной пробирки со следующей комбинацией моноклональных антител CD19/CD10/CD34 (флуорохромы PerCP (PE-су5)/PE/FITC). В случаях с достаточным количеством клеток использовалась панель из 2 пробирок: CD19/CD10/CD45 и CD19/CD34/CD45 (флуорохромы FITC/PE/Per-CP (PE-су5)). Оценивалось количество лейкозных В-линейных предшественников CD19⁺CD10⁺ и/или CD19⁺CD34⁺ среди мононуклеаров, далее в соответствии с требованиями AIEOP-BFM-ALL количество клеток МРБ пересчитывалось на все миелокарициты на основании данных миелограммы.

У 17 больных для оценки МРБ использован 4-цветный протокол в соответствии с протоколом AIEOP-BFM-ALL-2000 [4]. Панель МРБ при этом включала следующие комбинации антител:

1. Syto16/CD10/CD45/CD19;
2. CD20/CD10/CD34/CD19;
3. CD10/CD58/CD34/CD19.

Комбинация флуорохромов для каждой пробирки была следующей: FITC/PE/PerCP/APC (1 пробирка) и FITC/PE/PE-су7/APC (2; 3 пробирки).

В двух случаях в панель дополнительно были введены пан-миелоидные антигены CD13, CD33. При гипоклеточных образцах использовали 1 и 3 пробирки. Количество лейкозных В-линейных предшественников оценивали на все миелокарициты. Сбор данных на проточных цитометрах (FacsCan; FacsCanto II) проводился непосредственно после постановки реакции. Из каждой пробы для достоверно значимого анализа накапливали от 170 000 до 2 000 000 клеток в зависимости от клеточности образца. Анализ данных проводили с использованием программ WinMDI 2.8 и FCS 3.0.

Статистический анализ велся с использованием программы SPSS 12.0 для Windows с оценкой средних величин и таблиц сопряженности признаков.

Mean patient age was 5.6 years (range from 6 month to 18 years). There were 4 infants under 1 year of age. At first presentation 64 patients had pre-pre-B (BII) and 3 children had pre-B (BI) immunological subtypes of ALL. By morphological study blast level was L2 in most patients.

On chemotherapy day 15 each bone marrow specimen was studied morphologically and immunologically to detect residual leukemic cells, i. e. minimal residual disease (MRD).

Control myelogram count was made by two pathologists (250 cells each) on Romanovsky-Giemsa stained bone marrow smears. Immunological detection of residual leukemic lymphoblasts (B-cell precursors) in bone marrow specimens was made by FC using direct immunofluorescence reaction immediately after sampling.

The three-color protocol [12] was used in 50 cases. Because of hypocellularity of specimens MRD panel in these cases consisted of a single tube and had the following monoclonal antibody combination: CD19/CD10/CD34 (fluorochromes PerCP (PE-cy5)/PE/FITC). If the cell count was high enough we used two tubes, such as CD19/CD10/CD45 and CD19/CD34/CD45 (fluorochromes FITC/PE/Per-CP (PE-cy5). Count of leukemic B-cell precursors CD19⁺CD10⁺ and/or CD19⁺CD34⁺ among mononuclears was measured, then the MRD count was recalculated per the total of myelokaryocytes basing on the myelogram in accordance with AIEOP-BFM-ALL requirements.

A 4-color protocol was used in 17 patients in accordance with the AIEOP-BFM-ALL-2000 protocol [4]. The MRD panel in these cases consisted of the following antibody combinations:

1. Syto16.CD10/CD45/CD19;
2. CD20/CD10/CD34/CD19;
3. CD10/CD58/CD34/CD19.

The following fluorochrome combinations were used for each tube: FITC/PE/PerCP/APC (1 tube) and FITC/PE/PE-cy7/APC (2 or 3 tubes). Pan-myeloid antigens CD13, CD33 were added in two cases.

Tubes 1 and 3 were used for hypocellular specimens. The count of leukemic B-cell precursors was calculated per all myelokaryocytes.

Data collection in flow cytometers (FacsCan; FacsCanto II) was made immediately after reaction setting. Depending on specimen cellularity 170 000 to 2 000 000 cells were harvested from each specimen to make a statistically significant testing. Analysis of data was made using WinMDI 2.8 and FCS 3.0 programs.

Statistical analysis of difference was done using SPSS 12.0 for Windows with calculations of means and contingency tables.

Результаты и обсуждение

Учитывая клиническую значимость оценки количества лейкозных бластов (МРБ) на 15-й день индукционной химиотерапии с целью возможной ранней коррекции терапии, к методу детекции МРБ – проточной цитометрии – предъявляются особые требования, а именно, высокая стандартизация и хорошая воспроизводимость. В настоящее время у всех предложенных для клинического использования цитометрических протоколов имеются и преимущества и недостатки. Прежде всего, длительная дискуссия возникла при обсуждении наиболее оптимальной временной точки.

При анализе более 3000 пациентов детского возраста с диагнозом ВСР-ALL в рамках протокола AIEOP-BFM-ALL 2000 было продемонстрировано, что 15-й день индукционной химиотерапии более полно отражает ответ болезни на системную терапию, а потому является особо значимым с точки зрения коррекции индукционной химиотерапии, тогда как 8-й день – это только ответ болезни на стероиды [13].

В исследовании E. Coustan-Smith et al. (протокол госпиталя St. Jude, Мемфис, 2006), где впервые был предложен упрощенный 3-цветный цитометрический протокол, также продемонстрирована важность оценки МРБ, как независимого фактора прогноза на момент проведения индукционной химиотерапии (19-й день от начала лечения), а не к её окончанию [12]. Вместе с тем американский протокол COG предлагает учитывать клиренс лейкозных клеток крови на 8-й день преднизолоновой префазы как дополнительный фактор прогноза, а основной фактор прогноза – оценка МРБ в костном мозге на момент окончания терапии индукции – 29-й день от начала проведения терапии [8].

Однако, как уже сказано выше, цель детекции остаточных бластов в ходе проведения химиотерапии индукции (15–19-й дни) – редукция доз антрациклинов, с целью снижения осложнений химиотерапии и улучшения качества дальнейшей жизни пациентов, а не стратификация больных на группы риска.

Таким образом, на наш взгляд, 15-й день химиотерапии индукции должен быть признан необходимой временной точкой всех цитометрических протоколов детекции МРБ при ОЛЛ у детей. Одним из принципиальных расхождений является пороговый уровень клеток МРБ на 15-й день химиотерапии индукции (табл. 1). Мы не обсуждаем с этой точки зрения протокол COG т.к. он оптимизирован для определения МРБ с целью риск-стратификации, а не снижения дозы антрациклинов во время фазы индукции ремиссии.

Данные расхождения присутствуют даже в рамках одного протокола AIEOP-BFM-ALL. Так до 2008 года пороговым считалось менее 17 лейкозных бластов/мкл, то есть, с учетом средней клеточности образцов костного мозга на 15 день ($12,6 \times 10^3$ /мкл по нашим данным) менее 0,01% на миелокариоциты [13]. Этот параметр рассматривался, как фактор, позволяющий выявить пациентов группы минимального риска.

Results and discussion

Since count of leukemic blasts (MRD) on day 15 of chemotherapy induction is of much clinical value in view of potential therapy correction, methods of MRD detection, e. g. FC, should meet special requirements, such as high level of standardization and good reproducibility. All current cytometry protocols for clinical use have both advantages and shortcomings. First of all, choice of most appropriate time points for the detection aroused much discussion.

Analysis of more than 3 000 childhood BCP-ALL cases within the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol demonstrated that day 15 of induction chemotherapy was the most appropriate time point in terms of disease response to systemic therapy and therefore therapy correction, in contrast to day 8 reflecting disease respond to steroid [13].

E. Coustan-Smith et al. (St. Jude Hospital, Memphis, 2006), authors of the simplified 3-color cytometry approach, also demonstrated significance of MRD measurement as an independent prognostic factor during (day 19 from start) rather than the end of induction chemotherapy.

While the American COG protocol suggests measurement of leukemic blood cell clearance on day 8 of prednisolone prephase as an additional factor of prognosis and MRD measurement in bone marrow at the end of induction, i. e. on day 29 from therapy start) as the main factor of prognosis [8].

However, the purpose of residual blast count during induction chemotherapy (days 15–19) is to reduce anthracycline dosage, to minimize chemotherapy adverse effects and to improve quality of life rather than risk stratification. In our opinion, day 15 of chemotherapy induction is therefore the most appropriate time point to be approved for all MRD cytometry protocols in children with ALL.

Threshold of MRD cells on chemotherapy day 15 is the main issue of controversy (table 1). We do not consider COG protocol from this point of view since it is optimized for the purpose of risk stratification rather than anthracycline dose reduction during remission induction.

Some controversy may be found within the same protocol AIEOP-BFM-ALL. For instance, before 2008 a less than 17 leukemic blasts/mcl threshold level was accepted, i. e. less than 0.01% per myelokaryocytes taking into account mean cellularity of bone marrow specimens on day 15 ($12.6 \times 10^3/\text{mcl}$ according to our data) [13]. This parameter was thought to help to distinguish minimal risk patients.

Таблица 1

Современные ПЦ протоколы детекции остаточных бластов при BCP-ALL

Протокол	День детекции МРБ	материал	Пороговый уровень клеток МРБ	Минимальное количество пробирок для 1 пациента	Максимальное количество пробирок для 1 пациента
St. Jude (D. Campana)	19	Костный мозг	0,01% На моноклеарные клетки	1	2
AIEOP- BFM-ALL 2000 (R. Ratei, J. Basso)	15	Костный мозг	0,01% На миело-кариоциты	2	4
AIEOP- BFM- ALL 2008 (J. Basso)	15	Костный мозг	0,1% На миело-кариоциты	2	4

В протоколе AIEOP-BFM-ALL 2008 [11], где 15-й день обозначен как обязательный для оценки МРБ, вводится другая градация. Среди больных BCP-ALL выделяется группа пациентов (около 40% больных) с уровнем менее 0,1% опухолевых клеток в пересчете на ядросодержащие клетки костного мозга, которым может быть проведена коррекция индукционной терапии (снижение дозы антрациклинов).

Введен новый независимый прогностический фактор. Так, пациенты с присутствием в костном мозге на 15-й день более 10,0% опухолевых клеток среди нуклеарных клеток костного мозга (11,0% больных) составляют группу плохого прогноза, вероятность рецидива у которых составляет 47,2 % и 5-летняя бессобытийная выживаемость – 46,1%.

Вместе с тем, при раздельном анализе пациентов группы промежуточного риска у больных BCP-ALL с содержанием от 1,0 до 10,0% клеток МРБ, вероятность развития рецидива также в 2 раза выше по сравнению с больными, у которых в костном мозге на 15-й день химиотерапии индукции выявлено от 0,1 до 1,0 % лейкозных бластов (23,4% против 12,8%).

Уровень более 10% бластных клеток может быть выявлен и без ПЦ стандартными морфоцитохимическими методами, для которых пороговым признан уровень в 5,0% бластных клеток, тем более, что авторами продемонстрирована достоверная корреляция между данными ПЦ и морфоцитохимии.

В нашем исследовании количество клеток МРБ также достоверно коррелировало с числом бластных клеток по данным морфологии ($R=0,838$, $p<0,0001$, $n=67$).

Группа МРБ-негативных (менее 0,01% клеток МРБ) составила 8,9% (6 из 67), что ниже данных протокола AIEOP-BFM-ALL 2008 (22,9%) и также значительно ниже данных Coustan-Smith et al. (2006) – 44,4%. Во всех МРБ-негативных случаях морфологически выявлено не более 2,0% бластных клеток.

Table 1

Modern PC protocols detection of residual blasts in the BCP-ALL

Protocol	Day of MRD detection	Material	MRD threshold	Minimal number of tubes per patient	Maximal Number of tubes per patient
St. Jude (D. Campana)	19	Bone marrow	0.01% per mononuclears	1	2
AIEOP-BFM-ALL 2000 (R. Ratei, J. Basso)	15	Bone marrow	0.01% per myelokaryocytes	2	4
AIEOP-BFM-ALL 2008 (J. Basso)	15	Bone marrow	0.1% per myelokaryocytes	2	4

Protocol AIEOP-BFM-ALL 2008 [11], in which day 15 is mandatory for MRD detection, offers another grading. A group (approximately 40%) of patients with less than 0.1% of tumor cells per nucleated cells in bone marrow is identified among BCP-ALL cases, who are candidates for therapy (anthracycline) dose correction.

A new independent prognostic factor is introduced. Patients with more than 10.0% of tumor cells among nucleated cells in bone marrow on day 15 (11.0% of patients) are a poor prognosis group with a recurrence risk 47.2% and 5-year event-free survival 46.1%. However, if BCP-ALL patients from the intermediate risk group with MRD levels ranging from 1.0 to 10.0% are considered separately, they demonstrate a recurrence rate 2-fold as great as that in patients with MRD 0.1 to 1.0% of leukemic blasts on day 15 (23.4% vs. 12.8%).

The level of 10% of blasts may be detected without FC by standard morphocytochemical assays with a threshold of 5.0% of blasts more so because results of the latter were demonstrated to correlate in a significant manner with FC and morphocytometry findings.

In our study MRD counts also correlated significantly with those obtained by morphological study ($R = 0.838$; $p < 0.0001$, $n = 67$).

The MRD-negative group (less than 0.01% of MRD cells) was less than 8.9% (6/67) which was less than in the AIEOP-BFM-ALL 2008 protocol (22.9%) and much less than 44.4% in E. Coustan-Smith et al. (2006). All MRD-negative cases had not more than 2.0% of blasts.

По нашим данным, с учетом критериев протокола AIEOP-BFM-ALL 2008, 39% больных (23 из 59 случаев) являются возможными кандидатами к редукции доз антрациклинов – менее 0,1% клеток МРБ в костном мозге. Ни у одного из этих 23 пациентов по данным морфологии не выявлено более 5,0% бластных клеток. 10,0% и более лейкозных бластов по данным ПЦ выявлено у 6 из 59 МРБ-позитивных пациентов (10,1%), в двух из этих 6 случаев морфологически выявлено менее 2,0% бластов. В протоколе госпиталя St. Jude [12] использован другой критерий – 0,01% лейкозных бластов – на моноклеарные клетки костного мозга, т.е. в данном случае чувствительность метода ПЦ увеличена. Данный пороговый уровень достаточно хорошо обоснован авторами, поскольку подтверждено, что нормальные В-линейные предшественники элиминируются из костного мозга в ходе 2 недель проведения индукционной химиотерапии, а регенерация нормальных В-лимфоидных предшественников начинается только к 30-му дню от момента начала терапии. Именно группа пациентов (44,4%) с содержанием менее 0,01% лейкозных бластов на этапе индукции ремиссии рассматривается авторами данного протокола как кандидаты к редукции интенсивности индукционной терапии. С учетом подхода госпиталя St. Jude только 8,9% пациентов из нашей группы могли быть включены в группу кандидатов к редукции химиотерапии индукции. Данный пороговый уровень продемонстрировал и клиническую значимость, при выявлении более 0,01% МРБ–клеток вероятность развития рецидива составляла 23,8% против 4,8% для группы МРБ. Интересно отметить, что в протоколе AIEOP-BFM-ALL 2008 [11] подобная частота рецидивов (23,4%) отмечается для группы пациентов, у которых количество лейкозных бластов по данным ПЦ составляет 1,0% и более на ядродержащие клетки костного мозга. Возникает вопрос, имеет ли принципиальное значение оценка клеток МРБ в пределах моноклеарных клеток костного мозга или в пределах всех миелокариоцитов. Мы проанализировали морфологический состав костномозговых пунктатов 15-го дня химиотерапии индукции (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика образцов костного мозга. 15 день химиотерапии индукции

Показатель	Среднее	Медиана	Разброс	Число образцов
клеточность	12,5±1,4	9,0	2,5–60,0	55
%% моноклеарных клеток (морфология)	63,4±2,3	66,0	15,0–98,0	67
%% бластов (морфология)	5,02±1,2	1,6	0,0–60,8	67
%% CD19 ⁺ нуклеарных клеток	13,9±1,5	9,9	0,32–66,8	67
%% МРБ клеток*	4,1±1,5	0,18	0,0–82,7	67
*учтен наибольший процент CD10 ⁺ CD19 ⁺ или CD34 ⁺ CD19 ⁺ миелокариоцитов КМ				

In our series 39% of patients (23/59) with less than 0.1% of MRD cells in bone marrow were candidates for anthracycline dose reduction by AIEOP-BFM-ALL 2008 criteria. By morphology none of these 23 patients had more than 5% of blasts. Six of 59 (10.1%) MRD-positive cases had 10.0% of leukemic blasts by FC, with 2 of the 6 having morphologically less than 2.0% of blasts. The St. Jude Hospital (Memphis, USA) protocol [12] uses another criterion, i. e. 0.01% of leukemic blasts in bone marrow mononuclears: that is FC sensitivity is higher in this case. The threshold level is rather well substantiated by the authors since normal B-cell precursors are eliminated from bone marrow after 2 weeks of induction chemotherapy, while regeneration of normal B-cell precursors starts by day 30 from therapy start. It is the patient group (44.4%) with less than 0.01% of leukemic blasts during remission induction that is considered by the authors as candidates for therapy intensity reduction. If the St. Jude criteria were used, then only 8.9% of patients from our group could be considered candidates for chemotherapy dose reduction. This threshold value was also demonstrated to be clinically significant: risk of disease recurrence for patients with MRD more than 0.01% was 23.08% vs. 4.8% for the MRD-negative group. Of interest, that in the AIEOP-BFM-ALL 2008 [11] a similar recurrence rate (23.4%) was associated with a level of 0.1% of leukemic blasts per nucleated cells of bone marrow by FC. A question then arises, whether MRD should be measured as a fraction of bone marrow mononuclears or all myelokaryocytes? We have analyzed morphological composition of bone marrow specimens on day 15 of induction chemotherapy (table 2).

Table 2
Characteristics of bone marrow specimens; day 15 of induction chemotherapy

Parameter	Mean	Median	Range	No. of specimens
Cellularity	12.5±1.4	9.0	2,5–60,0	55
%% of mononuclear cells (morphology)	63.4±2.3	66.0	15,0–98,0	67
%% of blasts (morphology)	5.02±1.2	1.6	0,0–60,8	67
%% of CD19+ nucleated cells	13.9±1.5	9.9	0,32–66,8	67
%% of MRD cells*	4.1±1.5	0.18	0,0–82,7	67
*The greatest percentage of CD10 ⁺ CD19 ⁺ or CD34 ⁺ CD19 ⁺ bone marrow myelokaryocytes was reported				

В среднем фракция мононуклеарных клеток составляла 63,4% среди миелокариоцитов (рис. 1; см. вклейку). Оказалось, что для большинства пациентов пересчет числа клеток МРБ с мононуклеаров на все ядросодержащие клетки ситуации не изменяет (38 из 40). Кардинально (с точки зрения протокола AIEOP-BFM-ALL 2008) ситуация поменялась для двух пациентов из группы плохого прогноза (10,0% и более клеток МРБ). При пересчете с мононуклеаров на все ядросодержащие клетки эти больные попали в группу промежуточного прогноза (1,0–10,0% МРБ) клеток. С точки зрения протокола St. Jude (Мемфис) также 2 пациента из группы МРБ–положительных (0,01% и более клеток МРБ) перешли в группу МРБ негативных. Следует еще раз отметить, что ПЦ методика протокола St. Jude является более чувствительной – 1 клетка на 20 000–30 000 нуклеарных клеток костного мозга.

Как показали наши данные, пропорция клеток гранулоцитарного ряда на 15-й день химиотерапии индукции при BCP-ALL составляет в среднем $36,5\% \pm 2,1\%$ (медиана 34,0%, разброс от 2,0 до 85%). То есть, при сопоставлении данных по МРБ с миелокариоцитами в знаменателе и с мононуклеарами в знаменателе следует вводить соответствующую поправку. На практике, на наш взгляд, целесообразно определять МРБ в пересчете процента лейкозных клеток на миелокариоциты с обязательным определением пропорции клеток В-линии в пределах миелокариоцитов (по Syto-16).

Кроме расхождений в пороговом уровне не стандартизована и панель моноклональных антител, используемых для детекции МРБ.

В большинстве случаев острых лимфобластных лейкозов из В-линейных предшественников иммунофенотип бластов может быть охарактеризован как $CD19^+CD10^+$ (95% случаев по нашим данным), и в большинстве случаев бласты демонстрируют экспрессию стволовыхклеточного антигена $CD34$. Понятно, что нормальные В-линейные предшественники костного мозга имеют сходный фенотип $CD19^+CD10^+CD34^{\pm}$. Однако, как уже сказано ранее, на 15-й день химиотерапии индукции нормальных В-линейных предшественников в костном мозге нет. Таким образом, упрощенный цитометрический протокол госпиталя St. Jude (Мемфис, США), рекомендуемый выявлять остаточные бласты в ходе индукционной химиотерапии с использованием трехцветной цитометрии, комбинации антител $CD19/CD10/CD34$ является достаточно оптимальным. Значительными преимуществами данного протокола являются простота выполнения, а, следовательно, высокая воспроизводимость, низкая стоимость исследования и доступность для большинства клиник, что нельзя сбрасывать со счетов. Кроме того методика позволяет обойтись одной пробиркой, что важно, так как большинство образцов костного мозга на 15-й день индукционной химиотерапии являются гипоклеточными, и набор необходимого количества клеток для достоверного анализа при использовании двух и более пробирок затруднен.

On the average mononuclear fraction was 63.4% of myelokaryocytes (fig. 1).

Recalculation of MRD cells from mononuclears to all nucleated cells appeared not to change the situation for majority of cases (38 of 40). The situation changed critically (from the point of view of the AIEOP-BFM-ALL 2008) for 2 patient from the poor prognosis group (10.0% or more MRD cells). After recalculation from mononuclears to all nucleated cells these patients were assigned to the intermediate prognosis category (1.0 to 10.0% of MRD cells). From the St. Jude's point of view 2 patients from the MRD-positive group (0.01% or more MRD cells) passed to the MRD-negative group too.

It should be mentioned once more that FC methodology of St. Jude with 1 cell per 20 000–30 000 nucleated cells of bone marrow is more sensitive.

In our series granulocyte fraction on day 15 of induction chemotherapy in patients with BCP-ALL was $36.5\% \pm 2.1\%$ (median 34.0%, range from 2.0 to 85%). this means that when comparing MRD assessment with myelokaryocytes vs. mononuclears in the denominator one should use a certain correction. In our opinion, it is practical to determine MRD as percentage of leukemic cells per myelokaryocytes with mandatory measurement of B-cell fraction among myelokaryocytes (using Syto-16).

In line with the threshold, the panel of monoclonal antibodies used to detect MRD is also lacking in standardization.

In most BCP-ALL cases blast immunophenotype may be characterized as $CD19^+CD10^+$ (95% in our series), and in majority of the cases blasts demonstrated expression of stem-cell antigen CD34. It is understood that normal B-cell precursors have a similar phenotype $CD19^+CD10^+CD34^{\pm}$. However, as stated above, there are no normal B-cell precursors in bone marrow on day 15 of induction chemotherapy. Therefore, the simplified St. Jude's protocol recommending to use 3-color cytometry with CD19/CD10/CD34 antibody combination is optimal for detection of residual blasts during induction chemotherapy.

This protocol has the advantage of being simple and as a consequence highly reproducible, low costly and accessible for most clinics and this consideration cannot be neglected. It is of much importance that this approach allows one-tube assessment since most bone marrow specimens are hypocellular on day 15 of induction chemotherapy and it is difficult to harvest sufficient cell amounts for reliable analysis using 2 or more tubes.

В действительности, данная комбинация антител CD19\CD10 CD19\CD34 присутствует во всех цитометрических протоколах, однако, в дополнение к ним оценивается целый ряд молекул, ассоциированных с лейкозными В-лимфообластами (табл. 3).

Таблица 3

Комбинации моноклональных антител, используемых при детекции МРБ у детей с В-лин ОЛЛ

Протокол	Панель МРБ
Госпиталь S. Jude (E. Coustan-Smith et al. 2006)	CD19/CD10 и/или CD19/CD34
AIEOP- BFM- ALL 2008 (J. Basso et al.)	1.CD58/CD10/CD19/CD34 2.CD20/CD10/CD19/CD34 3.CD10/CD34/CD19/CD45 4.CD10/CD11a/CD19/CD45
COG (M. Borowitz et al.)	4-цв. 1.CD20/CD10/CD45/CD19 2.CD34/CD9/CD45/CD19 6-цв. 1. CD20/CD10/CD38/CD58/CD19/CD45 2.CD9/CD13+CD33/CD34/CD10/CD19/CD45

Для установления aberrантного иммунофенотипа лейкозных бластов при BCP-ALL используются антитела к молекуле CD20 и определение пан-миелоидных антигенов CD13⁺CD33. Однако частота встречаемости CD20⁺ острых лимфобластных лейкозов из В-линейных предшественников очень низкая – 7,0% по нашим данным и, приблизительно, в 40,0% случаев В-линейные лимфообласты коэкспрессируют один или оба пан-миелоидных антигена. Возможно, использование этих маркеров целесообразно в редких случаях CD34-негативных BCP ALL у детей или в случаях детекции МРБ на 15-й день индукции ремиссии при рецидиве, когда лейкозные бласты утрачивают, к примеру, экспрессию стволовыхклеточного антигена CD34.

Большинство молекул (CD58, CD11a, CD9, CD38), введенных в панели дополнительно, это маркеры, позволяющие разграничить лейкозные лимфообласты от регенерирующих В-линейных предшественников. И если речь идет о 15-м дне терапии индукции ремиссии, так ли это необходимо?

Детальное сопоставление 3-параметрового протокола госпиталя St. Jude (E. Coustan-Smith et al., 2006) и протокола AIEOP-BFM-ALL 2008 проведено в работе А.М. Попова и соавторов [14]. Качественно данные обоих методов совпали в 96% случаев, тогда как при анализе с помощью упрощенного протокола авторами выявлено 2 ложноположительных и 2 ложноотрицательных случая.

In reality, the antibody combination CD19/CD10, CD19/CD34 is included in all cytometry protocols, though a number of other leukemic B-lymphoblast-associated molecules is additionally assessed (table 3).

Table 3

Monoclonal antibody combinations used to detect MRD in children with B-cell ALL

Protocol	MRD panel
St. Jude Hospital (E. Coustan-Smith et al. 2006)	CD19/CD10 and/or CD19/CD34
AIEOP-BFM-ALL 2008 (J. Basso et al.)	1. CD58/CD10/CD19/CD34 2. CD20/CD10/CD19/CD34 3. CD10/CD34/CD19/CD45 4. CD10/CD11a/CD19/CD45
COG (M. Borowitz et al.)	4-color 1. CD20/CD10/CD45/CD19 2. CD34/CD9/CD45/CD19 6-color 1. CD20/CD10/CD38/CD58/CD19/CD45 2. CD9/CD13+CD33/CD34/CD10/CD19/CD45

Antobodies to CD20 and pan-myeloid antigens CD13⁺CD33 are used to identify abberant immunophenotype. However, frequency of CD20⁺ acute B-cell lymphoblastic leukemia is very low: 7.0% in our series and B-cell lymphoblasts coexpress one or both pan-myeloid antigens in about 40.0%. It is reasonable to use these markers in rare cases of CD34-negative BCP ALL in children or for MRD detection on day 15 of remission induction in cases with recurrence when leukemic blasts lose, for example, expression of stem-cell antigen CD34.

Most molecules (CD58, CD11a, CD9, CD38) included additionally into the panels allow differentiation between leukemic lymphoblasts and regenerating B-cell precursors. Then, if we speak about day 15 of remission induction therapy, is it really needed?

A.M. Popov et al. [14] provided a detailed comparison of the St. Jude 3-color (E. Coustin-Smith et al., 2006) and AIEOP-BFM-ALL 2008 protocols. Qualitative data of these protocols coincided in 96% of cases, while analysis using the simplified approach found 2 false-positive and 2 false-negative cases.

Однако наглядной аргументации данного факта в статье не приводится (см. дискуссию между А.М. Поповым и D. Camraпа в данном номере журнала). В нашем исследовании на 15-й день индукционной ХТ индукции введение в протокол дополнительных маркеров не дало значимых расхождений в количестве клеток МРБ, при анализе с использованием двух, указанных выше, протоколов. Таким образом, можно говорить, что как минимум в 96% случаев (с учетом данных А.М. Попова) острых лимфобластных лейкозов из В-линейных предшественников для детекции МРБ может быть использован трехцветный, упрощенный цитометрический протокол, клинически апробированный в госпитале St. Jude. Одним из существенных моментов при анализе МРБ на 15-й день индукционной ХТ является гипоклеточность образцов и, присутствие значительного количества дебриса (клеточных обломков, эритроцитов и т.д.). Избежать проблемы разбавления образца дебрисом позволяет использование ядерных красителей таких как, например, Syto 16. В протоколе госпиталя St. Jude и протоколе AIEOP-BFM-ALL 2008 использование ядерных красителей не предлагается, хотя ранние 4-цветные протоколы AIEOP-BFM-ALL 2000 [13] данный факт учитывали. Использование ядерных красителей и антигенов клеток красного ряда оговаривается в протоколе COG [15]. В нашем исследовании дебрис в среднем составил 14,8%, однако разброс был значительным, и в 7 из 16, проанализированных на 15-й день образцов, дебрис превышал 10,0%, а в 4 (25%) случаях – более 25% (25,0–60,0%; рис. 1). Таким образом, хотя использование Syto16 не является обязательным при цитометрической оценке клеток МРБ, мы считаем целесообразным введение ядерных красителей в диагностическую панель МРБ, так как приблизительно в четверти случаев данные могут быть искажены из-за присутствия значительного количества дебриса.

Заключение

Наиболее значимым для клиники в плане цитометрической детекции клеток МРБ является 15-й день химиотерапии индукции, позволяющий выявить группу пациентов благоприятного прогноза, у которых возможна редукция интенсивности химиотерапии первой линии (антрациклины). На этом этапе для детекции МРБ более чем в 96% случаев может быть использован трехпараметровый цитометрический подход, поскольку нормальных В-линейных предшественников в костном мозге в это время нет, и введение дополнительных маркеров существенно не влияет на результат. С учетом качества проанализированных образцов на 15-й день химиотерапии индукции целесообразно использование не более двух диагностических пробирок и введение в панель ядерных красителей. Пороговым уровнем группы благоприятного прогноза в соответствии с данными AIEOP-BFM-ALL 2008 следует считать 0,1% клеток МРБ на миелокариоциты. Относительно роли ПЦ в идентификации пациентов группы плохого прогноза вопрос остается открытым, поскольку 10,0% лейкозных бластов на 15 день могут быть распознаны морфологически.

However the authors failed to provide argumentation for this finding (see discussion between A.M. Popov and D. Campana in this journal issue). In our series addition of extra markers for study on day 15 of induction chemotherapy had no significant effect on MRD findings as obtained using the two above-mentioned protocols. So, the 3-color simplified cytometric assay clinically validated at St. Jude Hospital (Memphis, USA) may be used at least in 96% of cases (basing on A.M. Popov's data) of BCL-ALL. Hypocellularity and a considerable amount of debris (cell fragments, erythrocytes, etc.) are important issues in MRD assessment on day 15 of induction chemotherapy. Nuclear dyes such as Syto 16 help to solve the problem of specimen dilution. Either St. Jude or AIEOP-BFM-ALL 2008 do not use nuclear dyes, though earlier 4-color protocols (AIEP-BFM-ALL 200 [13] did use them. The COG protocol also mentions the use of nuclear dyes and red cell antigens [15]. In our series debris was 14.8%, though the range was broad, and in 7 of 16 specimens analyzed on day 15 debris was more than 10.0% and in 4 (25%) cases it was more than 25% (25.0–60.0%, fig. 1). Although use of Syto 16 is not mandatory for cytometric MRD measurement, we believe it reasonable to include nuclear dyes in the MRD diagnostic panel because results may be distorted due to significant amount of debris in about one forth of cases.

Conclusion

Day 15 of induction chemotherapy is of most importance for cytometric MRD measurement, since it allows identification of good prognosis patients who are candidates for reduction of first line chemotherapy (anthracyclines) intensity. The 3-color cytometric assay may be used to detect MRD at this time point because bone marrow lacks normal B-cell precursors at that time and addition of other markers has no effect on the result. Basing on quality of specimens analyzed on day 15 of induction chemotherapy, it seems reasonable to use not more than two tubes and to add nuclear dyes to the panel. The level of 0.1% of MRD cells per myelokaryocytes is a reasonable threshold for good prognosis patients in accordance with AIEOP-BFM-ALL 2008. The role of FC in identification of poor prognosis group is disputable since 10.0% of leukemic blasts are detectable morphologically on day 15.

Литература / Literature

1. *Kamps W.A., Vererman A.J., van Weimg E.R., Slater R., van der Does van den Berg A.* Longterm follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Groupe (DCLSG) protocol for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984–1991, *Leukemia* 200; 14; 2240–2246
2. *Maloney K.W., Shuster J.J., Murphy S., Pullen J., Camitta B.A.,* Long-term results of treatment studies for child hood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986–1998; *Leukemia* 2000; 14; 2276–2285
3. *Pui C.H., Boyett J.M., Rivera G.K., Hancock M.L., Sandlund J.T., Ribeiro R.C. et al.* Long –term results of total therapy studies 11,12and 13a for childhood acute lymphoblastic leukermia at St. Jude Children’s Research Hospital. *Leukemia*; 200; 14; 2286–2294
4. *Schrapppe M., Reiter A., Zimmerman M., Harbot J., Ludwig W.D., Henze G., et al.* Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 2000; 14; 2205–2222
5. *Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G., Hancock M.I., Razzouk Bl., Ribeiro R.C., et al.* Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100; 52–58
6. *Schrapppe M., Reiter A., Ludwig W.D., Harbot J., Zimmerman M., Hidde-mann W., et al.* Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of antracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 200; 95: 3310–3322
7. *Dworzak M.J., Froshl G., Printz D., Mann G., Potschger U., Muhlegger N., et al.* Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99: 1952 – 1958/
8. *Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P., Bowman W.P., Carroll A.J., Carroll W.L., et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children’s Oncology Grop study. *Blood* 2008; 111: 5477–5485
9. *Riehm H., Reiter A., Schrapppe M., Berthold F., Dopfer R., Gerein V., et al* [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin PEDIATR* 1987; 199: 151–160

10. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Breneman J.C., Cherlow J.M., Grossman N.J., Kersey J.H., *et al.* Cyto-reduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia – the importance of early marrow response: report from Children's Cancer Group. *J. Clin Oncol* 1996; 14: 389 – 398
11. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G., Dworzak M., 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; 27 (31): 5168–5174
12. Coustan- Smith E., Ribeiro R.C., Stow P., *et al.* A simplified cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006; 108 (1): 97–102.
13. Ratei R., Basso G., Dworzak M., Gaipa G., Veltroni M., Rhein P., Biondi A., Shrappe M. *et al.* Monitoring treatment response of childhood precursors B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 rotocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2008; 1–7
14. Popov A.M., Verzhbitskaia T.Yu., Tsauro G.A., Shorikov E.V.*et al.* Minimal Residual disease monitoring by simplified flow cytometry assay in children with pre-b-cell acute lymphoblastic leukemia: advantages and limitations. *Haematopoiesis Immunology* 2010; 2: 21–28
15. Borowitz M. Minimal residual disease detection in childhood ALL. *Haematopoiesis Immunology* 2010; 1:24–35.

ДИСКУССИЯ МЕЖДУ DARIO CAMPANA (США) И АЛЕКСАНДРОМ ПОПОВЫМ (ЕКАТЕРИНБУРГ, РОССИЯ)

по поводу статьи А.М.Попова и соавт., посвященной сравнению упрощенного 3-цветного метода и многоцветной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни в ходе терапии индукции ремиссии при лейкозах из В-линейных предшественников у детей (см. журнал «Иммунология гемопоэза»/”Haematopoiesis Immunology” №№1,2, 2010 год).

Dario Campana

Я пишу по поводу статьи Попова с соавторами. Как указано в нашей статье, упрощенный подход можно применять только в период индукционной терапии, т.е. на 15-й день в их исследований. В последующие периоды повышается вероятность ложно-положительных результатов, и в эти периоды данный тест применять нельзя. Хотя ложно-положительный результат можно получить даже на 15-й день, ложно-отрицательные результаты не должны присутствовать. Однако в исследовании Попова получено 2 ложно-отрицательных результата, что трудно поддается пониманию.

Александр Попов

Николай Николаевич, здравствуйте.

Кампана в своей статье писал, что его упрощенный подход применим не только во время индукции, но и в точке окончания индукционной терапии. Поэтому мы эти две точки и взяли. День 85 мы взяли просто потому, что это третья точка мониторинга МОБ в нашем протоколе (аналогичная дню 78 в BFM). Там других результатов и не ожидалось. С индукцией все несколько сложнее. В зависимости от интенсивности терапии на момент окончания индукционной терапии регенерация может начинаться в большем или меньшем проценте случаев. Так как в нашем протоколе интенсивность терапии по сравнению, например, с BFM, снижена, таких пациентов больше. Что касается ложнонегативных результатов, то основных причин две. Кампана из своего изыскания благополучно исключил пациентов, не экспрессировавших тотально хотя бы один из двух использованных маркеров (CD10 или CD34). Мы же этого не делали. При этом, такие пациенты есть. Конечно, исходно нелогично использовать у них такой подход, но мы ведь проверяли применимость его не к какой-то группе пациентов, а ко всем во всех используемых точках терапии. Еще одним существенным моментом является снижение экспрессии обоих этих антигенов уже к 15му дню. Она бывает очень существенной. И опухолевые клетки опять же становятся трудноотделимыми от нормальных. Но, естественно, на 15-й день ложных результатов меньше. Причины есть еще, но эти две – основные.

*С уважением,
Сааша.*

**DISCUSSION BETWEEN DARIO CAMPANA (USA)
AND ALEXANDER POPOV EKATERIBURG, RUSSIA)**

subject: comparison of multiparameter flow cytometry with simplified method in detection of mrd on day 15th of induction therapy in bcp all in children (article of A.M.Popov in "HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY, 2010, №№1,2)

Dario Campana for N.N. Tupitsyn (Aug. 31, 2010)

As we stated in our paper, the simplified test can only be used during remission induction therapy, ie. on day 15 in their study. False-positive results are expected at later time points and the assay should not be used at all at those later time points. Although some false-positive may occur even on day 15, false-negative should not occur. However, there were 2 false negative in the study of Popov, which is difficult to understand.

Alexander.Popov for N.N. Tupitsyn

D. Campana wrote in his paper that his simplified test could be used both during and at the end of induction therapy. That is why we used both of these time points. Day 85 was used only because this was the third time point of MRD monitoring in our protocol (similar to day 78 in BFM). We did not expect other results in that point. The situation with induction is somewhat less clear. Regeneration may occur in a larger or smaller proportion of cases at the end of induction therapy depending upon therapy intensity. Since therapy intensity in our protocol is lower than that, for example, in BFM, the proportion of such patients is greater. As concerns false-negative results there are two reasons for that. D.Campana excluded patients without total expression of at least one of two markers (CD10 or CD34), while we did not. Note, that such patients do exist. Of course it is not *a priori* logical to use this approach in this patient category, but we tested its applicability in all patients in all time points of therapy rather than in a selected patient group. Another important aspect is a decrease in expression of both of these antigens by day 15 which may be considerable. And tumor cells become hardly distinguishable from normal cells. But of course the number of false results is lower. There are other reasons too, but the mentioned two ones seem most important.

*Yours sincerely,
Alexander Popov*

Dario Campana

Дорогой Николай,

Благодарю Вас и также Д-ра Попова за ответ. Поясню, что мы писали в своей статье: Стр. 102. Также можно применять упрощенный проточно-цитометрический анализ В ПЕРИОД БЛИЖЕ к концу индукционной терапии без какого-либо снижения прогностической значимости. Однако использование этого подхода в другие временные периоды во время лечения или после его окончания неизбежно приведет к ложноположительным результатам. В других временных точках требуется проведение более сложных методик проточной цитометрии и молекулярных методов выявления МОБ. Стр. 101. Действительно экспрессия CD10 и CD34 отсутствовала всего у 6 из 386 больных, обследованных при постановке диагноза. Очевидно, что в этих случаях НЕЛЬЗЯ считать, что отсутствие CD19⁺ клеток с коэкспрессией CD10 и/или CD34 в период индукционной терапии является показателем эффективности лечения. Скорее для оценки эффективности лечения у таких больных нужно применять другие методы.

*С наилучшими пожеланиями,
Дарио*

Александр Попов

Николай Николаевич, здравствуйте.

Когда мы писали эту статью, ни в коем случае не было желания оспаривать выводы Д.Кампана, а именно то, что этот подход весьма применим в середине индукционной терапии у большинства пациентов. Насколько я статью помню, об этом написано во введении. Наша же цель была в другом – посмотреть, насколько данный подход применим у ВСЕХ пациентов во ВСЕХ точках мониторинга МОБ, потому что середина индукции – лишь одна из них. На мой взгляд это очень важно прежде всего для того, чтобы предостеречь людей, которые собираются мониторировать МОБ таким методом. Честно Вам скажу, меня очень часто спрашивают люди из маленьких лабораторий, а нельзя ли пользоваться упрощенными трехцветными подходами для определения МОБ, так как такую задачу начальники им ставят, а денег ни на реагенты, ни на цитометры нет. Поэтому я никогда не публиковал эти результаты на английском. За рубежом, когда такой мониторинг прописан в протоколе, никому и в голову не придет экспериментировать, как и в лабораториях с большим опытом в нашей стране. От себя могу добавить, что у нас пациентов, опухолевые клетки которых не экспрессировали оба исследованных маркера было около 4%, то есть существенно больше, чем у Кампана. Плюс еще были пациенты, у которых CD34 первично не было, а CD10 экспрессировался гетерогенно. Также у некоторых CD34-негативных пациентов сильно снижалась во время терапии экспрессия CD10, что также осложняло определение МОБ, прежде всего количественно.

Dario Campana to N.N. Tupitsyn (13.09.10)

Dear Nikolai!

Thank you and also thanks to Dr Popov for his response. Just to clarify, here is what we wrote in our paper: Page 102: It may also be possible to apply the simplified flow cytometric assay NEAR the end of remission induction therapy, without any loss of prognostic significance. However, use of the assay at other time points during or after treatment, when normal B-cell progenitors are most likely to be present, will inevitably yield false-positive results. At these time points, more complex flow cytometric and molecular MRD assays are required. Page 101: Indeed, only 6 of the 386 patients studied at diagnosis lacked expression of both CD10 and CD34. Obviously, in these cases, one should NOT regard the lack of CD19+ cells coexpressing CD10 and/or CD34 during induction therapy as an indication of good treatment response. Rather, alternative strategies are needed to measure treatment response in such patients.

*Kind regards
Dario*

Alexander Popov to N.N. Tupitsyn

Dear Nikolai Nikolaevich,

When writing our paper we did not meant at all to argue Dr Campana's conclusion that the simplified flow cytometry assay in question was well applicable in the middle of remission induction therapy in most patients. As far as I remember this was mentioned in the Introduction. But our purpose was different: we just wanted to know whether this approach was applicable in ALL patients in ALL time points of MRD monitoring, with the mid induction point being just one of them. I believe that this is very important first of all to warn people from using this assay in such a way to monitor MRD. To be honest, people from small laboratories often ask me whether they can use the simplified three-color cytometry in MRD detection, because their superiors put this task while money for reagents and cytometers is lacking. That is why I have never published these materials in English. Of course, it never enters the minds of investigators from foreign or our large laboratories with a great testing experience to experiment like this if they have certain protocols for the monitoring. In addition, we had about 4% of patients free from expression of the two markers, i.e. much more than in Dr Campana's study. Plus cases with no CD34 expression and heterogeneous CD10 expression at diagnosis. Some CD34-negative cases demonstrated a considerable decrease in CD10 expression on therapy which also added to difficulty in MRD assessment (more so quantification).

А количественные ошибки (как они определены в статье), на мой взгляд, не менее важны, чем качественные. Картинки с примерами ложноположительных результатов на 36-й день из-за появления регенерации в статье показаны. Попробую поискать наглядные картинки ложноотрицательных. Опять же хочу заметить, что здесь многое зависит от протокола. Если интенсивность терапии высокая, нормальные В-линейные предшественники будут появляться на момент окончания индукции крайне редко. И наоборот. Что касается протоколов BFM в разных видах (в том числе и ALL-IC), то там все несколько проще. Насколько я знаю, там сейчас будет прописан мониторинг МОБ только на 15-й день с порогами в 0,1% и 10%, поэтому определять МОБ станет несложно. Может, в этом случае данный подход и будет приемлем. Однако по моему личному мнению, нужно чтобы метод был применим у практически всех пациентов (а лучше — у всех). Этого, к сожалению, упрощенный подход дать не может. Впрочем, Кампана об этом в статье честно пишет. Они разрабатывали этот метод для применения в лабораториях с низкими финансовыми возможностями (так написано в статье) у большинства пациентов с В-линейными ОЛЛ в конкретной точке терапии. Не больше. К сожалению, достаточно часто этого недостаточно (на мой взгляд).

*С уважением,
Саша*

Александр Попов

Николай Николаевич, здравствуйте.

Во вложении – картинки – примеры ложноположительного (рис. 1) и ложноотрицательного (рис. 2) результатов на 15-й день.

Думаю, такой вариант будет вполне приемлем.

*С уважением,
Саша*

Dario Campana

Мы проанализировали данные Александра с Элейн (Coustain-Smith) и сделали следующие комментарии. В отношении Рис. 1 (возможно ложно-положительный результат): при использовании 6–8-цветного метода нужно иметь в виду, что число CD45- и CD20-клеток может быть повышено в результате химиотерапии. Кроме того, в этом случае CD58, по-видимому, не является очень хорошим маркером. При использовании упрощенного метода необходимо провести бэкгейтинг, чтобы убедиться, что клетки МОЗ имеют правильные характеристики светорассеяния. Мы также в рутинном порядке добавляем смесь анти-каппа и анти-лямбда с тем же флюорохромом, чтобы убедиться в том, что эти клетки не являются поверхностными Ig+ В-лимфоцитами, способными экспрессировать CD10.

But errors in quantification (as defined in the paper), to my mind, are not less important than qualitative false results. There are pictures of false-positive results on day 36 due to regeneration in our paper. I shall try to find good pictures of false-negative examples.

And again I should like to emphasize that a great deal depends upon protocol. If therapy intensity is high, then occurrence of normal precursors at the end of remission induction is rare. And vice versa. As concerns various versions of BFM protocols (including ALL-IC), things are much simpler there. As far as I know, MRD monitoring is currently recommended only on day 15 with 0.1% and 10% thresholds, therefore MRD detection will be easy. Maybe the approach in question will be applicable in this case. However, I think that a good test should be applicable in next to all (better all) patients. Unfortunately, the simplified assay is not fit here. And Dr Campana writes honestly about such limitations. They developed the simplified assay to be used in most patients with B-lineage ALL in a certain time point on therapy for laboratories with poor funding (it is mentioned in their paper). Not more. Unfortunately, it is not sufficient in many settings (to my mind).

*With best wishes,
Alexander*

Alexander Popov

I've prepared illustrations of false-positive and false-negative results using simplified method at day 15. Example of false-positive result is illustrated on figure 1, and example of false-negative result is illustrated on figure 2.

I think this variant is quite acceptable.

*Kind regards
Alexander Popov*

Dario Campana

We looked at Alexander's figures with Elaine and have the following comments. Regarding Fig.1 (possible false positive), for the 6-8 color method one should keep in mind that CD45 and CD20 can be upregulated during chemotherapy. Moreover, in that case, CD58 does not seem to be a particularly good marker. For the simplified method, one would need to do some backgating to make sure that the "MRD" cells have the right light scatter. Also, we routinely add a mixture of anti kappa and anti-lambda conjugated to the same fluorochrome to make sure that the cells are not surface Ig+ B lymphocytes which can express CD10.

В отношении рис. 2 (возможно ложно-отрицательный результат): хорошо было бы определить экспрессию CD19 6–8-цветным методом. Также важно знать, какой флюорохром применялся для CD10: мы не используем FITC, т.к. он слишком слаб.

С наилучшими пожеланиями, Дарио

Александр Попов

Касаемо комментариев Кампана. CD10 там было мечено PE. Я ведь именно о том и говорю, что нет такого маркера, который имел бы абсолютное значения для мониторинга МОБ. Экспрессия CD45 и CD20 повышается во время терапии, CD58 не всегда позволяет четко опухолевые клетки выделять. Все это правда. Но ведь и CD10 с CD34 при терапии стероидами светятся значительно слабее. Никто не предлагает эти маркеры исключать из панели. Но именно потому, что нет единого всегда пригодного маркера, нецелесообразно ограничивать панель только 10 и 34. Нужно использовать и другие. Вообще пациенты с отсутствием экспрессии 10 и 34 встречаются. А есть такие, которые гетерогенно экспрессируют один и вообще не экспрессируют второй. Конечно, их мало очень. Но наша цель ведь – 100/100. С методическими комментариями Д. Кампана я согласен на 100%.

С уважением, Саша

Николай Тупицын (комментарий редактора)

На этом мы решили приостановить дискуссию и подвести некоторые итоги. Метод, предложенный E.Coustain-Smith... D.Campana (2006) и названный как упрощенный (simplified), дал очень многое в понимании биологии В-линейных предшественников и дальнейшей оценке эффективности клиренса лейкозных blastов на 15-й (19-й) день индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников у детей. Во-первых, факт отсутствия нормальных В-линейных предшественников в костном мозге детей в эти сроки индукционной терапии подтвердился (А.М. Попов). Это совершенно меняет акценты в протоочно-цитометрических исследованиях на данные сроки индукционной терапии: нет необходимости искать aberrантность (гипо- или гиперэкспрессию того или иного антигена). Важен сам факт обнаружения В-линейных предшественников. Как мы убедились из дискуссии, трактовка данных по CD34 и CD10 (и по ряду других маркеров) даже крупными учеными может различаться, а, значит, включается элемент субъективизма, что неприемлемо при проведении анализов, результат которых учитывается в лечении больных. Выход здесь один – включать большее число маркеров, позволяющих разграничить предшественники и зрелые В-клетки. D. Campana использует для этих целей мембранную экспрессию легких цепей иммуноглобулинов. На наш взгляд возможны и другие подходы – цитоплазматические CD22, TdT, су-μ в отсутствии мембранных иммуноглобулинов, суррогатные λ-цепи, VpreB и многие другие. Открывается целая область исследований. Разумеется, на 15-й день индукционной терапии клеточность КМ крайне низкая, и предпочтение нужно отдавать многоцветному анализу.

Regarding fig. 2 (possible false negative) it would be good to see CD19 expression in the 6–8 color method. Also, it would be important to know what fluorochochrome is used for CD10: we avoid FITC as it is too weak.

Kind regards, Dario

Alexander Popov

Concerning Campana's comments. CD10 was labeled by ER there. This is exactly what I meant: there is no marker with absolute significance in MRD monitoring. CD45 and CD20 expression is increased during therapy, CD58 does not always allow reliable identification of tumor cells. All this is true. But CD10 and CD34 give much weaker fluorescence during steroid therapy. Nobody proposes to exclude these markers from the panel. But it is not reasonable to limit the panel to 10 and 34 only, exactly because there is no marker that could be always good. One should use other markers too. Yesterday was day 36 of therapy for an infant with ALL and an MLL change. CD10⁺CD34^{-/+}. How would you find tumor cells? The pair CD20/CD58 was very helpful. And we used CD38 to be sure that these were not plasmocytes that are also CD20⁺CD58⁺. Only about 25% of tumor cells expressed CD34. There is the simplified approach for you! I may make pictures, if you want. In general, cases without CD10 or CD34 expression are not uncommon. And there are cases that express one heterogenically and do not express the other at all. Of course these are very rare. But our goal is 100/100. I fully agree with Campana's methodological comments.

Kind regards Alexander Popov

From the editor (Nikolai Tupitsyn)

We have decided to stop the discussion here for the time being and to sum up chief points of what have been said. E. Coustain-Smith... D. Campana's (2006) method referred to as simplified was a significant advance in understanding of B-cell precursor biology and further assessment of efficacy of blast clearance on day 15 (19) of induction therapy in children with acute precursor B-cell lymphoblastic leukemia. First, the fact of the absence of normal B-cell precursors in bone marrow of children at this time point was confirmed (A.M. Popov). This finding changes totally the objects of interest at this time point of induction therapy: there is no need to look for aberrations (hypo- or hyperexpression of various antigens). What matters is the very fact of finding of B-cell precursors. As seen from the discussion, different experienced investigators may interpret differently CD34 and CD10 data (as well as data on some other markers), this means that some subjectivism is present which is unacceptable for analysis of much importance for patient management. There is only one way here – to include more markers to differentiate precursors from mature B-cells. D.Campana uses membrane expression of immunoglobulin light chains. We believe other approaches may also be useful, such as cytoplasmatic CD22, TdT, cy- μ in the absence of membrane immunoglobulins, surrogate λ -chains, VpreB and many others. This opens a large new field of study. Of course bone marrow cellularity is very low on day 15 of therapy and many-colored tests should be preferred.

Regarding fig. 2 (possible false negative) it would be good to see CD19 expression in the 6–8 color method. Also, it would be important to know what fluorochochrome is used for CD10: we avoid FITC as it is too weak.

Kind regards, Dario

Alexander Popov

Concerning Campana's comments. CD10 was labeled by ER there. This is exactly what I meant: there is no marker with absolute significance in MRD monitoring. CD45 and CD20 expression is increased during therapy, CD58 does not always allow reliable identification of tumor cells. All this is true. But CD10 and CD34 give much weaker fluorescence during steroid therapy. Nobody proposes to exclude these markers from the panel. But it is not reasonable to limit the panel to 10 and 34 only, exactly because there is no marker that could be always good. One should use other markers too. Yesterday was day 36 of therapy for an infant with ALL and an MLL change. CD10⁺CD34^{-/+}. How would you find tumor cells? The pair CD20/CD58 was very helpful. And we used CD38 to be sure that these were not plasmocytes that are also CD20⁺CD58⁺. Only about 25% of tumor cells expressed CD34. There is the simplified approach for you! I may make pictures, if you want. In general, cases without CD10 or CD34 expression are not uncommon. And there are cases that express one heterogenically and do not express the other at all. Of course these are very rare. But our goal is 100/100. I fully agree with Campana's methodological comments.

Kind regards Alexander Popov

From the editor (Nikolai Tupitsyn)

We have decided to stop the discussion here for the time being and to sum up chief points of what have been said. E. Coustain-Smith... D. Campana's (2006) method referred to as simplified was a significant advance in understanding of B-cell precursor biology and further assessment of efficacy of blast clearance on day 15 (19) of induction therapy in children with acute precursor B-cell lymphoblastic leukemia. First, the fact of the absence of normal B-cell precursors in bone marrow of children at this time point was confirmed (A.M. Popov). This finding changes totally the objects of interest at this time point of induction therapy: there is no need to look for aberrations (hypo- or hyperexpression of various antigens). What matters is the very fact of finding of B-cell precursors. As seen from the discussion, different experienced investigators may interpret differently CD34 and CD10 data (as well as data on some other markers), this means that some subjectivism is present which is unacceptable for analysis of much importance for patient management. There is only one way here – to include more markers to differentiate precursors from mature B-cells. D. Campana uses membrane expression of immunoglobulin light chains. We believe other approaches may also be useful, such as cytoplasmatic CD22, TdT, cy- μ in the absence of membrane immunoglobulins, surrogate λ -chains, VpreB and many others. This opens a large new field of study. Of course bone marrow cellularity is very low on day 15 of therapy and many-colored tests should be preferred.

Рисунок к статье:

Л.Ю. Гривцова, с соавт.

**К ДАЛЬНЕЙШЕЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК
В КОСТНОМ МОЗГЕ ДЕТЕЙ С В-ЛИНЕЙНЫМИ
ОСТРЫМИ ЛИМФОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ
НА 15-Й ДЕНЬ ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ**

Image on the article:

L. Yu. Grivtsova, et al.

**TO FURTHER STANDARDIZATION
DETERMINATION OF RESIDUAL BLASTS
IN BONE MARROW OF CHILDREN WITH B-LINEAR
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA
THE 15 TH DAY OF INDUCTION THERAPY**

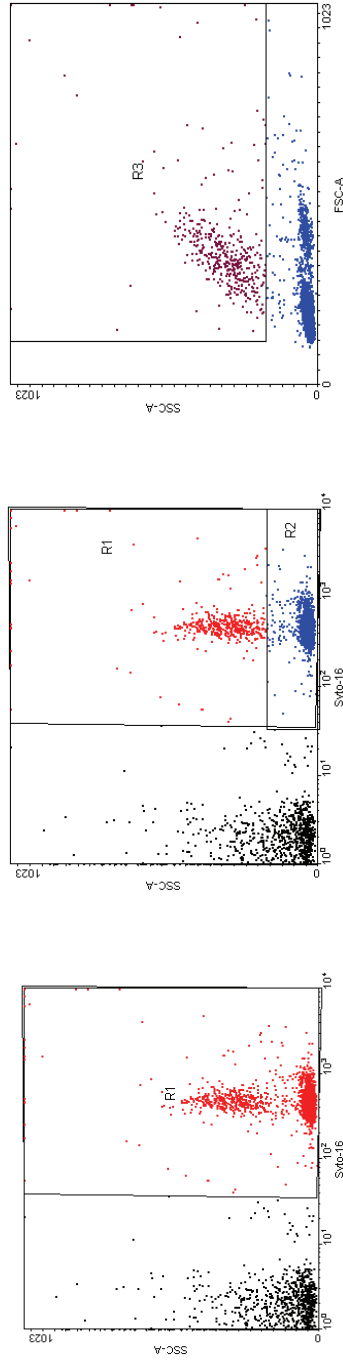


Рис. Оценка пропорции ядросодержащих клеток в образцах костного мозга на основании ядерного красителя SYTO16 и пропорции гранулоцитов в пределах миелокариоцитов.

На точечных цитограммах представлен анализ клеток костномозгового пунктата (15-й день химиотерапии индукции) на предмет разбавления материала дебрисом (обломками клеток, эритроцитами, тромбоцитами). Иммунологический анализ проведен не позднее 2 часов после пункции. На цитограммах А, Б по оси ординат характеристика SSC, отражающая гранулярность клеток, по оси абсцисс – окраска ядерным красителем Syto16 – область R1 (цитограмма А) – Syto16⁺ – ядросодержащие элементы образца. Примесь дебриса составила 30,0%. Цитограмма Б демонстрирует пропорцию мононуклеарных клеток в образце (R2) – 85,7% в пределах Syto 16⁺.

Цитограмма В демонстрирует пропорцию клеток гранулоцитарного ряда (тейт R3) в параметрах светорассеяния (FSC vs SSC) в пределах ядросодержащих клеток костного мозга (Syto16⁺ клетки). Пропорция гранулоцитов составила 14,3%.

MINIMAL RESIDUAL DISEASE
IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Минимальная
остаточная
болезнь при
хроническом
лимфоцитарном
лейкозе

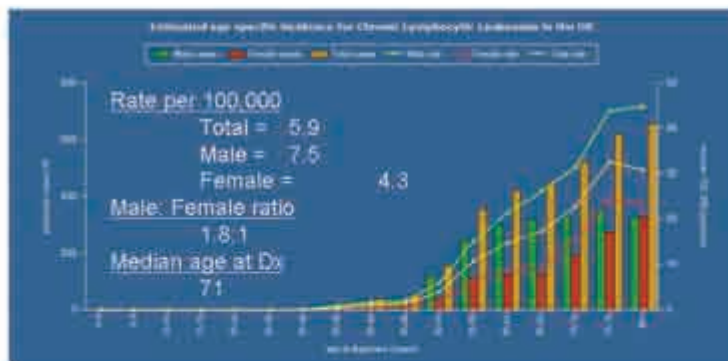


Энди С. Роустрон
Базовые больницы НСЗ, Лидс



Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)

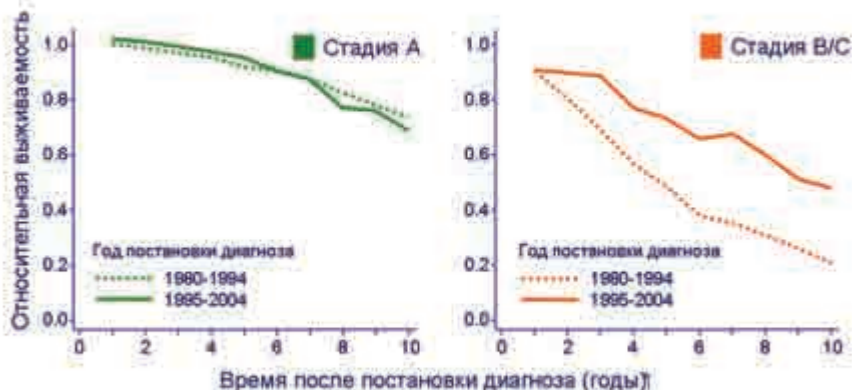
ХЛЛ — новообразование, состоящее из мономорфных малых В-лимфоцитов в периферической крови, костном мозге, селезенке и лимфоузлах. Обычно клетки ХЛЛ экспрессируют одновременно CD5 и CD23



www.hmrn.org.uk



Клиническая стадия и относительная выживаемость

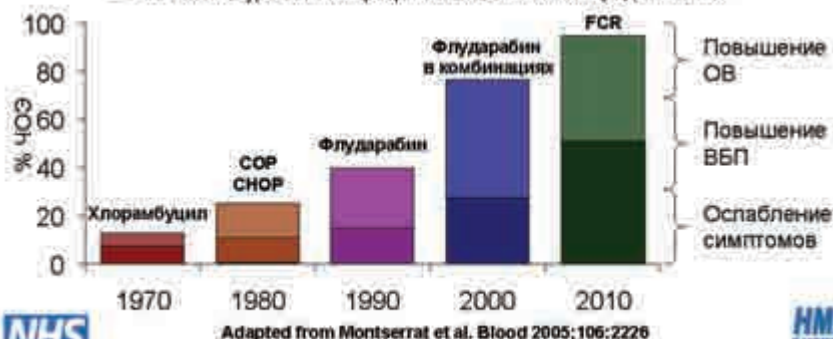


Abrisqueta, Blood 2009; 114: 2044-2050



Повышение результатов лечения при ХЛЛ

- Полная ремиссия (ПР):
 - Уровень лейкоцитов и другие гематологические показатели в норме
 - Отсутствие лимфаденопатии, поражения костного мозга (30%) и симптомов
- Частичная ремиссия (ЧР):
 - Снижение уровня лимфоцитов на $\geq 50\%$ и лимфаденопатия



Исследования, в которых проводили анализ МОЗ

Initial	Setting	No. of patients	%OR	%CR	% of CR2 achieving MRD ^{low}	MRD method	RFS: MRD ^{low} vs. MRD ^{neg} CR	Reference
CLL/C	Unselected	93	88	28	75	CD19/CD5	NA	2002 Rohat [8]
FF	Unselected	159	80	15	81	CD19/CD5	>30 vs. 19	1992 Robertson [4]
PCB	Unselected	224	95	50	78	CD19/CD5	>48 vs. 39	2004 Kung [2]
FF=FA	Unselected	54	100	39	56	IgH PCR	NA	2004 Martin [9]
FF=FF	Unselected	90	93	78	93	IgH PCR	>50 vs. 24	2005 Del Forti [10]
FF=FF=FA	Unselected	11 (231)	100	27	83	ASO-PCR	>55 vs. 39	2004 Wendler [11]
FCM	Ref/Ref	60	78	50	34	4CLB flow	23 vs. 17	2002 Bosch [5]
A*	Ref/Ref	91	54	35	33	4CLB flow	>34 vs. 20	2005 Martens [6]
Vagena	Ref/Ref	41	46	36	38	ASO-PCR	>24 vs. 15	2003 O'Brien [12]
FA	Ref/Ref	36	83	31	47	ASO-PCR	NA	2005 Brite [13]
PCB	Ref/Ref	177	73	25	32	ASO-PCR	44 vs. 27	2005 Wenzel [7]
FF=FF=FA	Unselected	115	85	42	30	IgH PCR	>33 vs. 30	2005 Milligan [14]
Auto	Ref/Ref	27	100	85	88	IgH PCR	73 vs. 16	2005B Martens [15,16]
Auto	Ref/Ref	27	100	85	59	4CLB flow	75 vs. 16	2005B Martens [15,16]
Auto	Ref/Ref	26	—	—	—	ASO-PCR	NA stand	2004 Eagan [17]
Auto	Ref/Ref	27	100	85	39	ASO-PCR	>60 vs. 19	2005B Martens [15,16]
Auto	Ref/Ref	44	56	13	0 vs. 100	IgH PCR	—	2005 Storr [18]
Auto	Ref/Ref	30	70	27	48 vs. 94	4CLB flow	—	2005 Catalano [19]
Auto	Ref/Ref	9	—	—	0 vs. 75	ASO-PCR	—	2004 Eagan [17]
Auto	Ref/Ref	23	91	91	23 vs. 41	ASO-PCR	—	2005B Martens [15,16]

Общие комментарии к исследованиям с анализом МОЗ

- Увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания примерно на 5 – 15 месяцев у больных с ремиссией по МОЗ^{ОТР}, обычно с высокой степенью статистической значимости
- Показатели ПР сильно варьируют, но в пределах группы с ПР процент больных со статусом МОЗ^{ОТР} больше зависит от метода:
 - CD19/5 & kappa/lambda 80%
 - IgH-ПЦР 70%
 - 4-цв. прот. цитометрия 50%
 - RQ-ASO IgH-ПЦР 30%
- Оценка МОЗ имеет самое большое значение при химиоиммунотерапии и трансплантации
- Аллогенная ТСК отличается от других методов: максимальный эффект может наблюдаться через >1 года после трансплантации



Значение МОЗ для конкретного больного: сколько времени до рецидива?

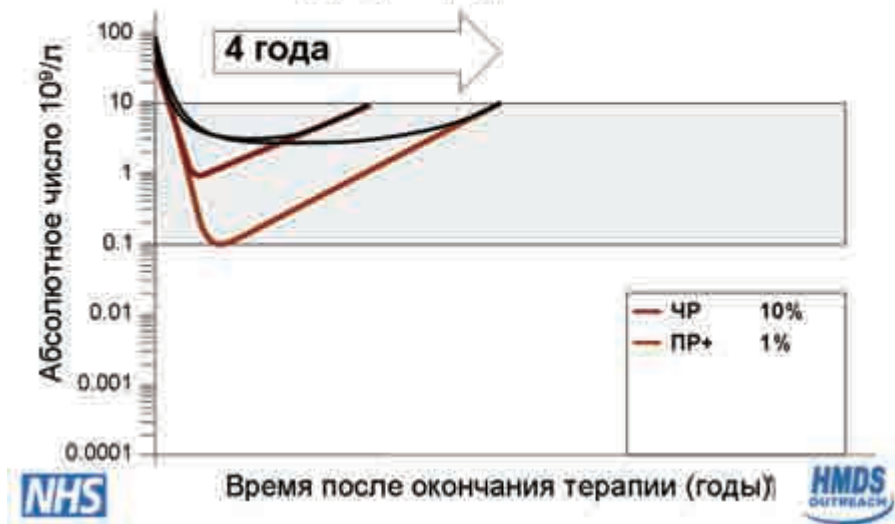
- Сравнение показателей выживаемости без прогрессирования заболевания и уровня клеток ХЛЛ в конце терапии
 - Уровень периферических клеток в норме
 - Отсутствие лимфаденопатии: равномерное распределение между кровью и костным мозгом
 - Время удвоения числа клеток ХЛЛ 6 мес.



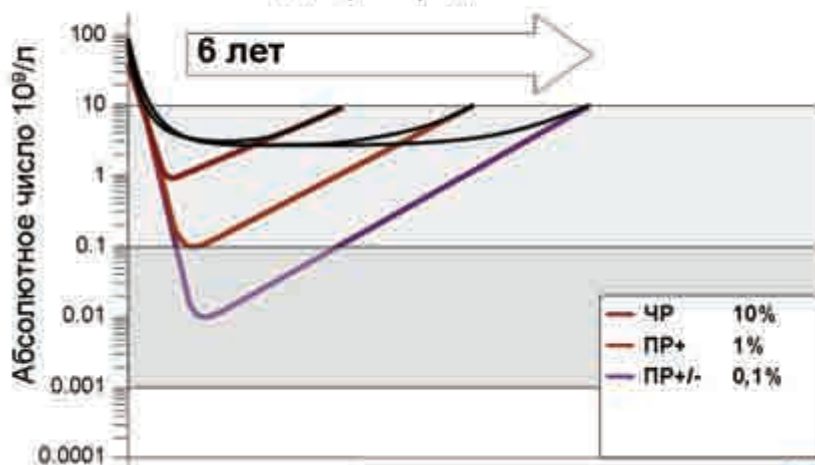
Сколько времени пройдет до рецидива?



Сколько времени пройдет до рецидива?



Сколько времени пройдет
до рецидива?

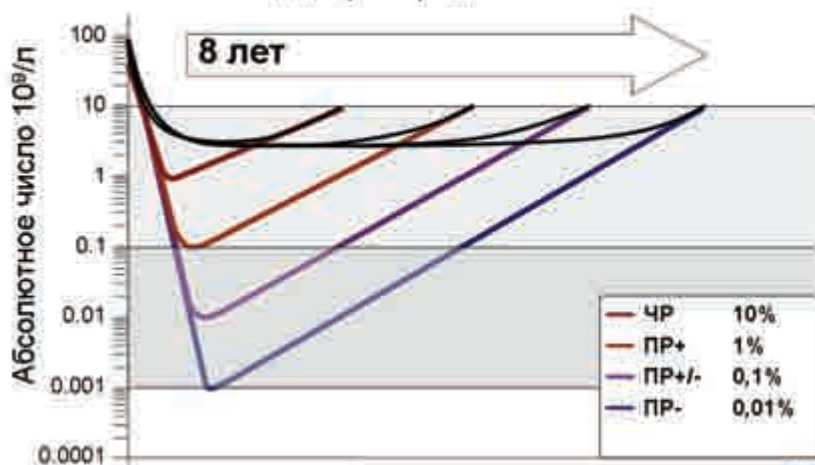


NHS

Время после окончания терапии (годы)

HMDS
OUTREACH

Сколько времени пройдет
до рецидива?

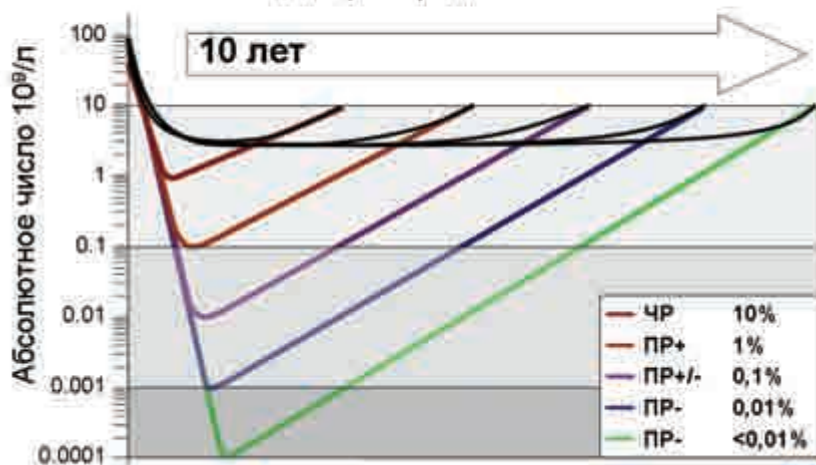


NHS

Время после окончания терапии (годы)

HMDS
OUTREACH

Сколько времени пройдет до рецидива?



Время после окончания терапии (годы)

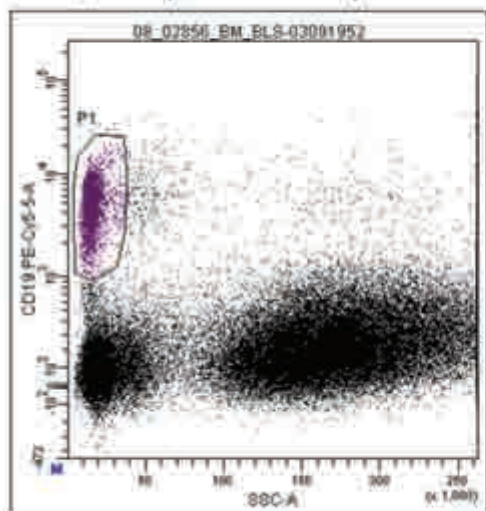


Значение МОЗ для клинических исследований и конкретных больных

- Клинические исследования
 - Повышение чувствительности в оценке лечения
 - Более точная количественная классификация эффекта
- Конкретные больные
 - Более точный прогноз результата
 - Определение показаний к дальнейшему лечению на раннем этапе
 - Модификация терапии в зависимости от результата МОЗ^{OTF}
- Методы оценки: Проточная цитометрия и ПЦР



Одноцветная проточная цитометрия

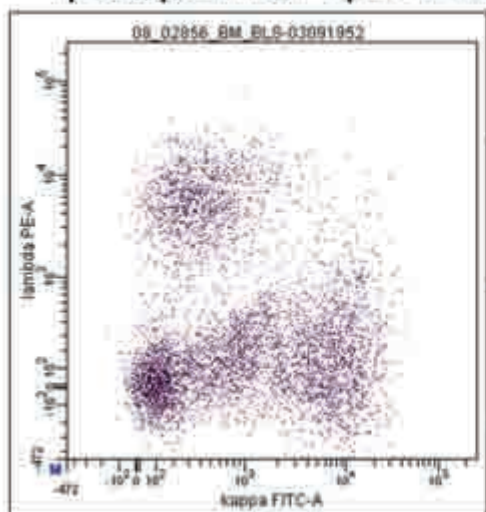


Один цвет
(CD19):

10% В-клеток



Трехцветная проточная цитометрия



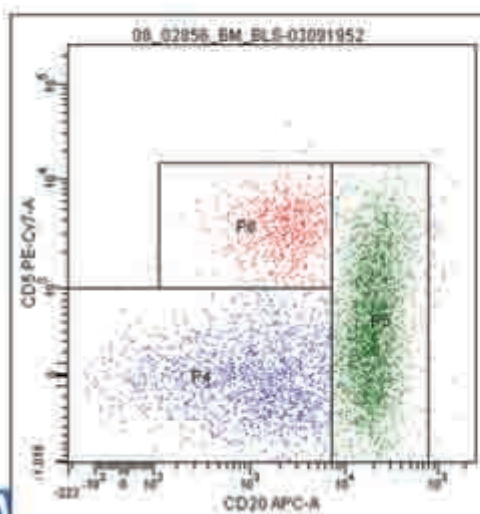
- Выделение гейта В-клеток при помощи CD19 и светорассеяния

- Оценка каппа и лямбда в гейте В-клеток

В-клетки –
поликлональные



Трехцветная проточная цитометрия

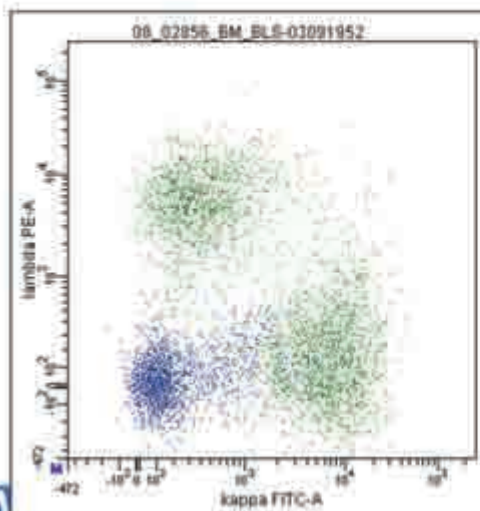


- Выделение гейты В-клеток при помощи CD19 и светорассеяния
- Оценка CD5 и CD20 в гейте В-клеток

10% В-клеток:
 85% CD5⁺CD20⁺
 10% CD5⁺CD20⁺
 5% CD5⁺CD20⁺(slab)



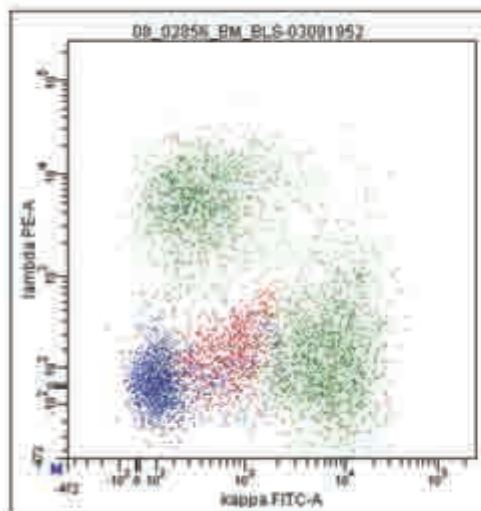
Пятицветная проточная цитометрия



- Выделение гейты В-клеток при помощи CD19 и светорассеяния
- Оценка CD5 и CD20 в гейте В-клеток
- Оценка К/Л в гейте клеток



Пятицветная проточная цитометрия



- Выделение гейта В-клеток при помощи CD19 и светорассеяния
- Оценка CD5 и CD20 в гейте В-клеток
- Оценка К/Л в гейте клеток – подтверждение моноклональности CD19⁺CD5⁺CD20⁺ (слаб)



Панель для проточной цитометрии, принятая на основе консенсуса

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/000000>; this version posted August 1, 2014. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

ORIGINAL ARTICLE

International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia

AC. Rawlings^{1,2}, N. Villamor^{3,4}, M. Bogen⁵, S. Böttcher⁶, P. Lillo⁷, B. Zenzler⁸, G. Luzzati⁹, D. Cazzanini¹⁰, C. Morabito¹¹, M. Gassat¹², S. Sica¹³, S. Kimmis¹⁴, S. Cazzanini¹⁵, D. Avoni¹⁶, L. Rawson¹⁷, H. Kimmis¹⁸, F. Caligiuri-Cappi¹⁹, M. Kozlowski²⁰, E. Boffi²¹, M. E. Boffi²², E. Montanari²³ and P. Hillenbrand²⁴

¹Pathology, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, United Kingdom; ²Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Hematologia, Barcelona, August Pi i Suñer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ³Unitat d'Hematopatologia, Departament de Hematologia i Hematologia August Pi i Suñer (IDIBAPS), Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ⁴Department of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁵Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁶Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁷Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁸Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁹Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁰Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹¹Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹²Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹³Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁴Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁵Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁶Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁷Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁸Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ¹⁹Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ²⁰Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ²¹Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ²²Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ²³Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain; ²⁴Department of Hematology, University of Valencia, Valencia, Spain



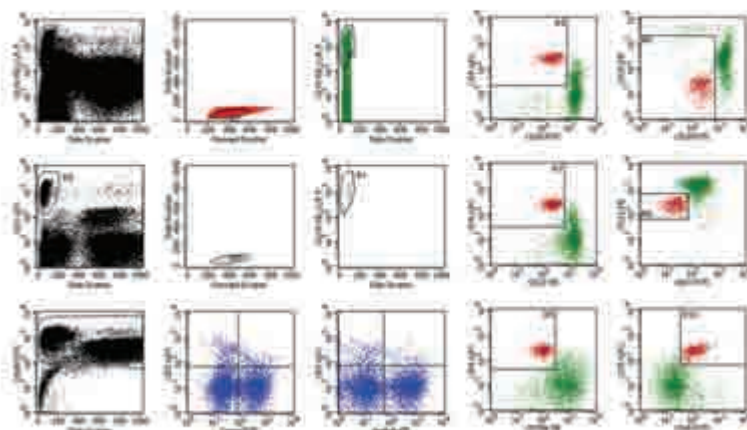
4-цвт панель, принятая на основе консенсуса

1) Kappa	Lambda	CD19	CD5
2) CD45	CD14	CD19	CD3
3) CD20	CD38	CD19	CD5
1) CD81	CD22	CD19	CD5
2) CD43	CD79b	CD19	CD5

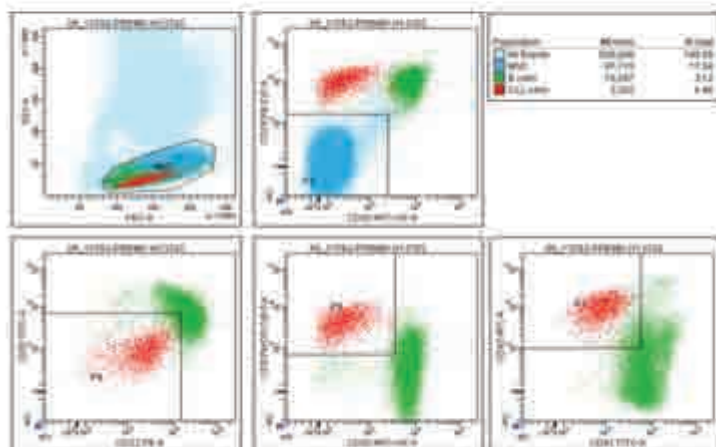
Если присутствуют только моноклональные В-клетки, достаточно определение (1). При наличии поликлональных В-клеток, требуется определение по (2)-(5). Подсчитывают 500,000 событий.



4-цвт анализ: много графиков и статистики



6/8-цвет анализ: все просто!



Уникальная последовательность гена IgH

Костный мозг



+ P – выпетивание
комплементарных нуклеотидов
на сигнальном соединении в
+ N – 3' участка 1-20
нуклеотидов TdT
- Тренировка незрелых
нуклеотидов экзонуклеазой



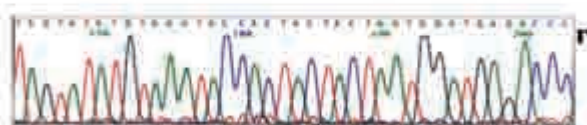
Поликлональные



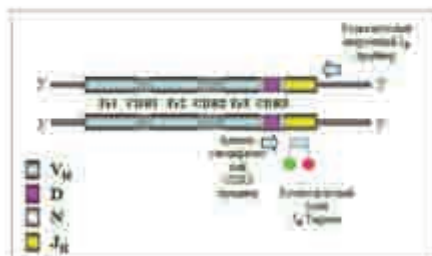
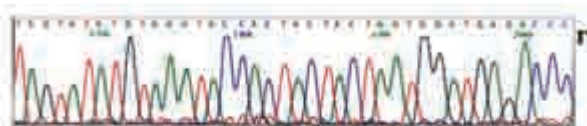
50% ХЛЛ



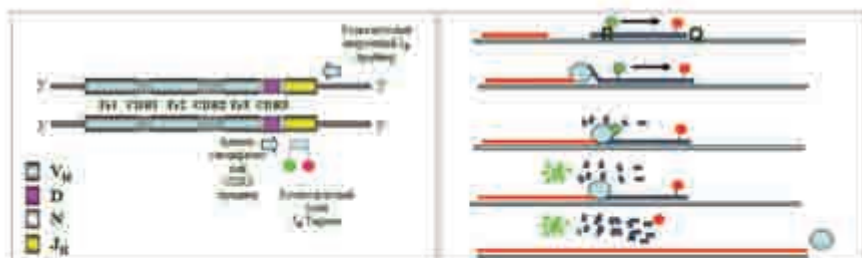
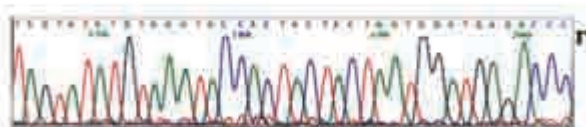
Метод RQ-ASO IgH-PCR



Метод RQ-ASO IgH-PCR

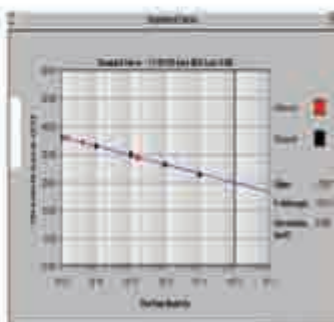
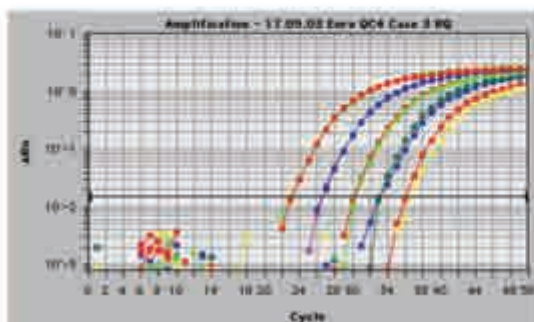


Метод RQ-ASO IgH-PCR

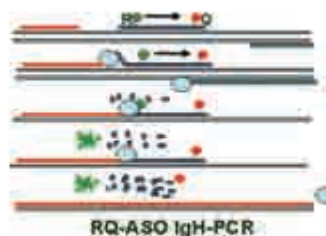
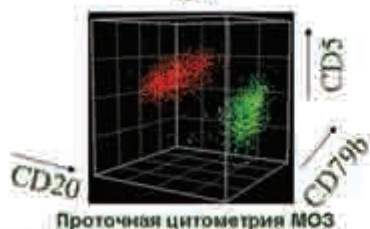
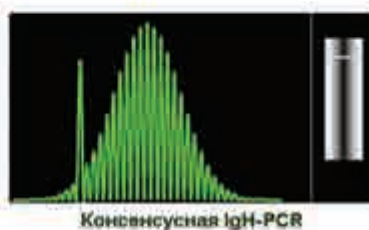
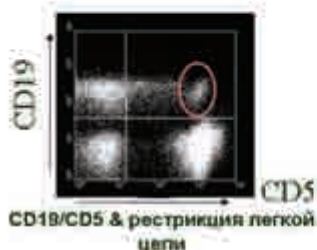


Метод RQ-ASO IgH-PCR

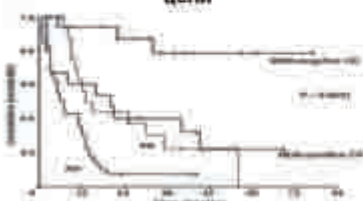
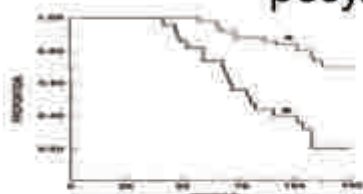
Определяют число копий гена по стандартной кривой, калибруют по обязательному гену с одной копией (альбумин)



Разные методы анализа МОЗ



Снижение МОЗ = повышение результата



Проблема клональности при мониторинге МОЗ

Клетки ХЛЛ	Нормальные В-клетки	Консенсусная IgH-PCR	CD19+ к/л
0,1% +	0,1%		3,4 +
0,1% -	5%		1,5 -
0,01% +	0%		>10 +
0,01% ?	0,1%		1,7 -
0,01% -	5%		1,5 -

Клональность и определение CD5 в сравнении с анализом МОЗ

- 784 случаев после лечения в Барселоне, Киле и Лидсе
 - CD19/5/λκ
 - Оценка МОЗ (4-цвет прот. цитометрия, ASO-PCR)
- Медиана 0,5% ХЛП, диапазон <0,01 – 23,7%
 - <0,01% 213 (27%)
 - 0,01-0,1% 100 (13%)
 - 0,1-1% 111 (14%)
 - 1-10% 118 (15%)
 - 10% 243 (31%)
- Учитывают 50000 событий
- Требуется не менее 50 событий в соответствующем гейте

Клональность и остаточное заболевание

CD19+ Ratio: 0.00023	% MCD+ 42% (90213)	CD19+CD5+ Ratio: 0.00023	% MCD+ 37% (90194)	CD19+ %CD5+ =0	% MCD+ 46% (73159)	CD19+CD5+ %sig =5	% MCD+ 86% (9856)
0.315 *** 2.2-26	80% (100039)	0.115 *** 2.2-26	83% (100001)	30-49	61% (70119)	6-19	89% (100102)
0.06-0.1 *** 30-40	83% (91805)	0.05-0.1 *** 30-40	96% (23049)	50-79	82% (93114)	20-49	92% (100165)
0.00-0.05 *** 40-100	94% (93805)	0.02-0.05 *** 40-100	99% (76773)	80-89	98% (9042)	50-69	98% (98802)
<0.02 *** >100	100% (100115)	<0.02 *** >100	100% (79199)	=90	100% (94054)	=79	100% (10000)
<50 cells/mL CD19+sig+	45% (13373)	<50 cells/mL CD19+CD5+sig+	42% (51122)	<50 cells/mL CD19+CD5+	77% (92811)	<50 cells/mL CD19+CD5+sig	45% (147327)



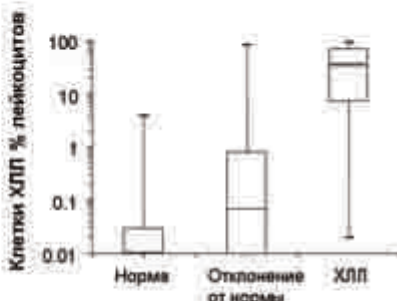
Клональность и остаточное заболевание

CD19+ Ratio: 0.00023	% MCD+ 42% (90213)	CD19+CD5+ Ratio: 0.00023	% MCD+ 37% (90194)	CD19+ %CD5+ =0	% MCD+ 46% (73159)	CD19+CD5+ %sig =5	% MCD+ 86% (9856)
0.315 *** 2.2-26	80% (100039)	0.115 *** 2.2-26	83% (100001)	30-49	61% (70119)	6-19	89% (100102)
0.06-0.1 *** 30-40	83% (91805)	0.05-0.1 *** 30-40	96% (23049)	50-79	82% (93114)	20-49	92% (100165)
0.00-0.05 *** 40-100	94% (93805)	0.02-0.05 *** 40-100	99% (76773)	80-89	98% (9042)	50-69	98% (98802)
<0.02 *** >100	100% (100115)	<0.02 *** >100	100% (79199)	=90	100% (94054)	=79	100% (10000)
<50 cells/mL CD19+sig+	45% (13373)	<50 cells/mL CD19+CD5+sig+	42% (51122)	<50 cells/mL CD19+CD5+	77% (92811)	<50 cells/mL CD19+CD5+sig	45% (147327)



Значение определения клональности

- Анализ CD19/5/K/L информативный и ~количественный, если
 - K:L <0,02 или >100
 - CD19+ >90% CD5+
 - CD19+5+ >70% slg-



Оценка клональности неточна и может ввести в заблуждение, но снижает число необходимых анализов для определения МОЗ



Проблема качественных подходов

- ПЦР или проточная цитометрия
- При отсутствии нормальных В-клеток предел детектирования (ПД) 0,01%
- При наличии нормальных В-клеток ПД может изменяться
- Нормальные В-клетки всегда присутствуют в костном мозге больных в ремиссии через 100 дней

МОЗ^{отр} по одной методике

= оценка 100 раз больше определения МОЗ^{пол} по другой методике



Методы анализа МОЗ

	Проточная цитометрия	RQ ASO-PCR
Подходящие больные	>95%	85 - 95%
Чувствительность	0,01%	0,001%
Количеств. диапазон	0,1 – 0,01%	0,01%
Цена и сложность	Умеренные	Сначала высокие, затем низкие
Материал, полученный до лечения	Желательно	Очень важно
Время	часы	недели



Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute Working Group 1996 guidelines

- "4-цветная проточная цитометрия или аллель-специфическая однонуклеотидная ПЦР имеют надежную чувствительность"
- "клиническая ремиссия при отсутствии МОЗ определяется как выявление менее одной клетки ХЛЛ на 10000 лейкоцитов в крови или костном мозге"
- "В будущие клинические исследования с целью увеличения периода ПР необходимо включать по крайней мере один анализ МОЗ, т.к. отсутствие персистенции лейкоза по данным этих чувствительных тестов представляется сильным позитивным прогностическим фактором."

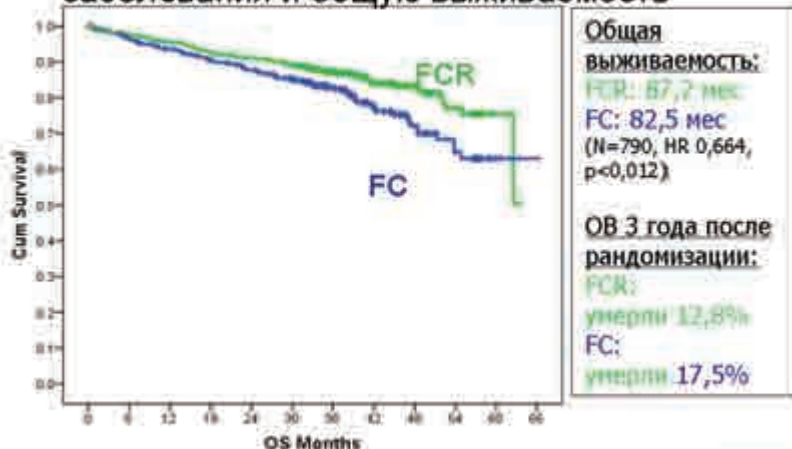


Можно ли использовать МОЗ для повышения результатов лечения?

- Модификация лечения в зависимости от уровня МОЗ
 - Общий показатель эффективности, но для конкретного больного только показатель чувствительности к химиотерапии
 - Нет необходимости в модификации лечения, т.к. вторичные МОЗ/ОМЛ встречаются редко
 - Необходимо рандомизированное контролируемое клиническое исследование



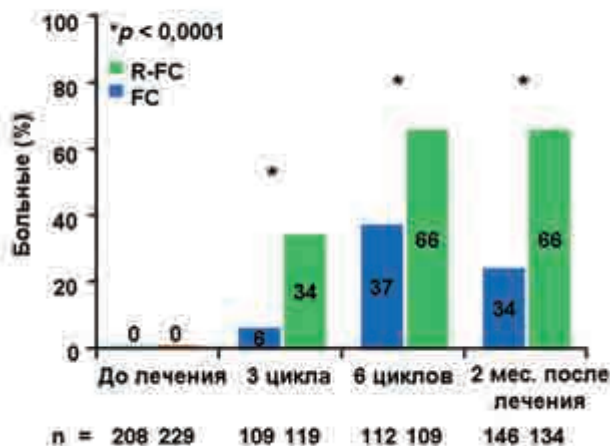
FCR в первой линии лечения повышает выживаемость без прогрессирования заболевания и общую выживаемость



Hallek et al. ASH 2009; abstract 535.



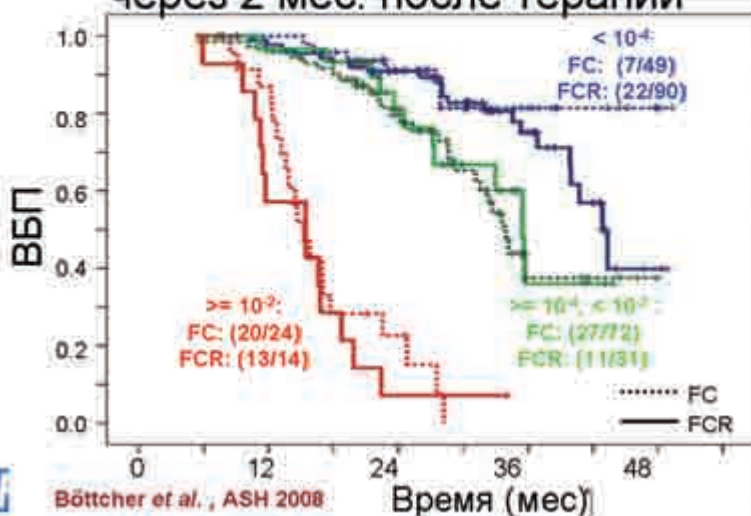
GCLLSG CLL8: анализ МОЗ МОЗ и число циклов терапии



Böttcher et al., ASH 2008



GCLLSG CLL8: анализ МОЗ Уровни в периферической крови через 2 мес. после терапии



Böttcher et al., ASH 2008



**Минимальное остаточное заболевание —
предсказательный фактор для
выживаемости без прогрессирования
заболевания и общей выживаемости при
хроническом лимфоцитарном лейкозе,
который не зависит от типа и линии
терапии**

**Марван Квок, Энди С. Роустрон,
Абрахам Варгезе и Питер Хиллмен**

**Базовые больницы НСЗ
Лидс, Великобритания**



Kwok et al. ASH 2009; abstract 540.



Цели

- Оценка влияния ремиссии с отрицательным результатом анализа МОЗ на выживаемость (МОЗ по методу проточной цитометрии = <1 ХЛЛ на 10000 лейкоцитов)
- Многофакторный анализ по сравнительной оценке МОЗ и следующих факторов:
 - Возраст
 - Цитопения до лечения
 - Линия терапии
 - Тип терапии
 - Противоопухолевый эффект (iwCLL)



Многофакторный анализ МОЗ при ХЛЛ: Характеристики больных

Больные	137
Возраст	
Медиана	62
Диапазон	38-83
Пол	
% мужчин	77
Предш. лечение, %	
	59
Набл-е	
Медиана	3,1 года
Диапазон	0,2-12,7



Выживаемость без прогрессирования заболевания

Параметр	Однофакторный (Log-Rank) p	Многофакторный (Кокс) p	Относительный риск (95% CI)
Возраст до лечения	0,122		
Гемоглобин до лечения	0,435		
Лейкоциты до лечения	0,235		
Тромбоциты до лечения	0,002	0,432	0,82 (0,50-1,34)
Предшествующее лечение (Есть/Нет)	0,004	0,014	1,94 (1,14-3,29)
Предш. терапия флударабином (Есть/Нет)	0,611		
Тип лечения	0,017	0,209	0,89 (0,75-1,08)
Эффект по iwCLL	<0,001	0,023	1,45 (1,05-2,00)
Эффект по МОЗ	<0,001	<0,001	5,32 (2,70-10,5)



Общая выживаемость

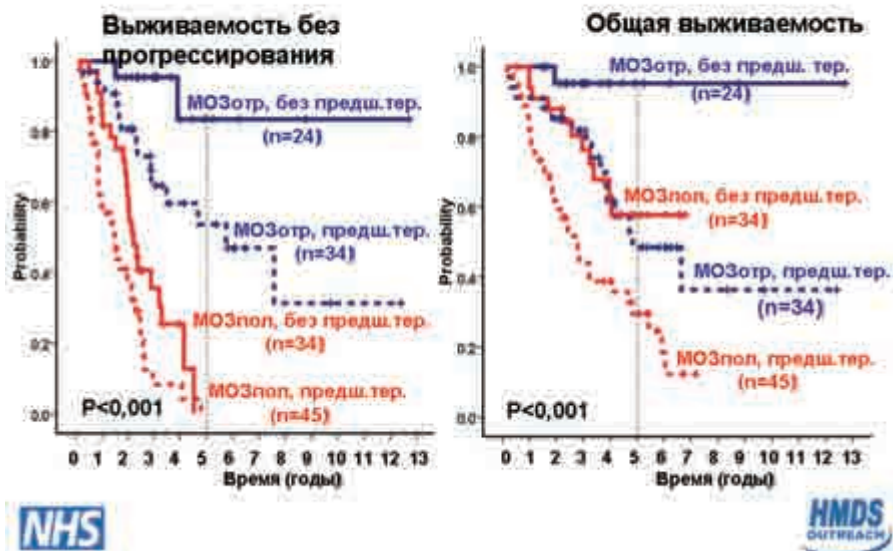
Параметр	Однофакторный (Log-Rank) P	Многофакторный (Кокс) P	Относительный риск (95% CI)
Возраст до лечения	0,001	0,002	2,20 (1,32-3,64)
Гемоглобин до лечения	0,028	0,921	1,03 (0,60-1,78)
Лейкоциты до лечения	0,092		
Тромбоциты до лечения	0,028	0,465	0,81 (0,46-1,43)
Предшествующее лечение (Есть/Нет)	<0,001	0,035	2,29 (1,06-4,94)
Предш. терапия флударабином (Есть/Нет)	0,042	0,078	1,85 (0,93-3,66)
Тип лечения	0,214		
Эффект по iwCLL	0,015	0,624	1,10 (0,75-1,62)
Эффект по МОЗ	0,002	0,012	2,40 (1,21-4,76)



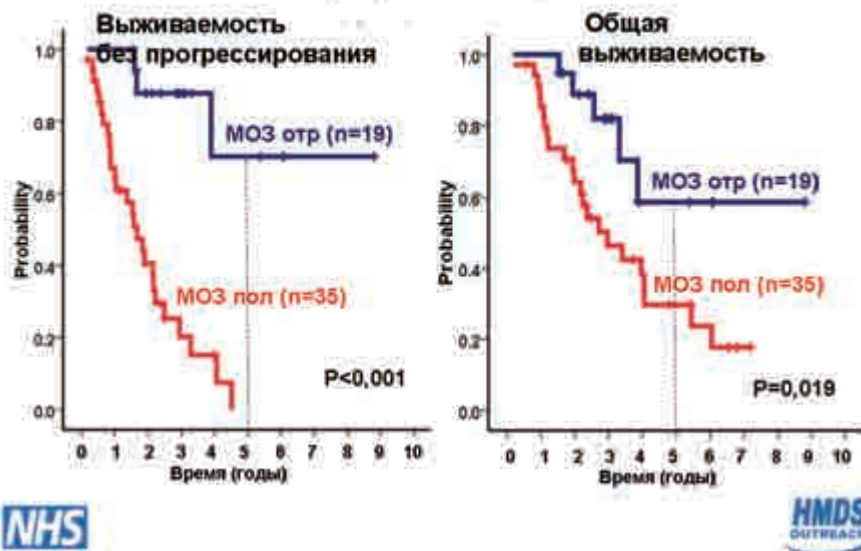
Отрицательный статус МОЗ и предшествующая терапия



Отрицательный статус МОЗ и предшествующая терапия



Отрицательный статус МОЗ у престарелых больных (старше 65 лет)

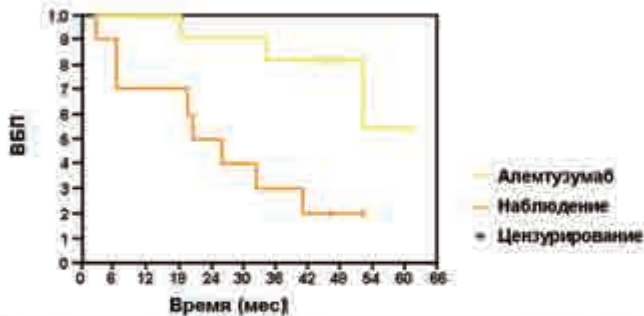


Выводы

- МОЗ — один из наиболее важных независимых предсказательных факторов длительной выживаемости при ХЛЛ
 - DCLLSG CLL8 FC vs. FCR
 - База данных HMRN
- Отрицательный статус МОЗ после первой линии терапии
 - 5-летняя ВБП 86%
 - 5-летняя ОВ 96%
- Отрицательный статус МОЗ должен быть целью терапии в соответствующей группе больных
 - Первая линия лечения
 - Как достичь?



Новые данные в исследовании CLL4B (06/2006): Выживаемость без прогрессирования



Медиана наблюдения после рандомизации в CLL4B = 48 мес

События (прогрессирование заболевания)

- Алемтузумаб = 3
- Наблюдение = 8

Выживаемость без прогрессирования ($P = 0.0035$)

- Алемтузумаб = не достигнута
- Наблюдение = 20,6 мес



Schweighofer C et al. Blood 2006; 108: abstract 33



Обзор опубликованных исследований консолидации алемтузумабом

Группа и ведущий автор	Индукция	Время от индукции до Кампат	Доза, способ введения и длительность	Повышение эффекта после консолидации	N	Умерли
CALGB (Rai '02)	4 X Flu	2 мес	30 мг/м ² , 2/нед, 8 нед	23%	36	1
CALGB (Rai '03)	4 x Flu	2 мес	30 мг/м ² , 2/нед, 6 нед	10%	18	0
Hainsworth '05	FR	4 нед или 8 нед	30 мг/м ² , 2/нед, 4 нед	17%	37	0
GMCLLSG (Wendner '03)	6 x F/FC	10 нед	30 мг/м ² , 2/нед, 12 нед	18%	21	0
Montillo '04	F или FC	16 нед	10 мг/м ² , 2/нед, 6 нед	44%	34	0
MDACC (O'Brien '03)	Нет данных	5 мес	10 мг/м ² 2/нед, 4 нед 30 мг/м ² 2/нед, 4 нед	39% 65%	24 34	0 0
Delmer, '06	3 x FC	2 мес	10 мг/м ² 2/нед, 8 нед	27%	33	0
CALGB (Lin, '07)	6 x FR	3 мес	30 мг/м ² , 6 нед	??	51	6



Всего = 288 7



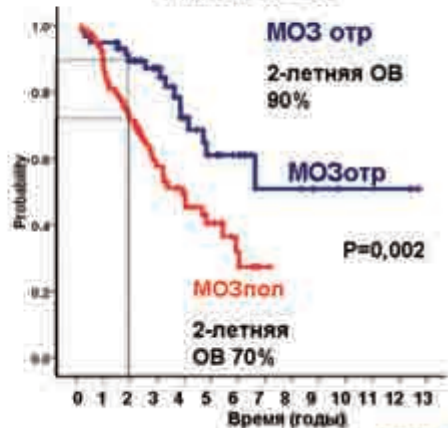
Исследование полного устранения MO3 UKCLL07



CLL 207

- Получили лечение 47 больных
- Промежуточный анализ:
 - 75% МОЗ отр
 - (89% ПР, 67% ЧР)
 - 16,7% МОЗ пол
 - 8,3% неопределяемые
- Оцениваемые 47 больных:
 - 4 случая смерти
 - 1 прямая связь
- СНЯ-инфекционная токсичность
- Аналогично 2-летней выживаемости для неотобранных больных с МОЗ отр

Общая выживаемость



- Консолидация алемтузумабом через 6-24 мес после химиотерапии очень эффективна
 - Отрицательный статус МОЗ у 18/24 (цель = не менее 5)
 - Токсичность значительная, но поддается лечению
 - Исследование продолжается по плану до 54 больных
 - Снижен размер выборки для запланированного рандомизированного исследования III фазы (NCRI CLL8 с 289 до 116 больных)
- Рандомизированное исследование 3 фазы по сравнительной оценке влияния консолидации алемтузумабом и отсутствия консолидации на ВБП
- Включали больных в диапазоне от 6 до 12 мес после окончания последней терапии по поводу ХЛЛ
 - Максимум 3 режима предшествующей терапии
 - 116 больных за период более 2 лет
 - Координатор исследования СТРИ-Лидс, Главный исследователь – Проф. Питер Хиллмен



ВЫВОДЫ

- МОЗ — один из наиболее важных независимых предсказательных факторов длительной выживаемости при ХЛЛ
- Отрицательный статус МОЗ после первой линии терапии
 - 5-летняя ВЕП 86%
 - 5-летняя ОВ 96%
- Отрицательный статус МОЗ должен быть целью терапии в соответствующей группе больных
- Данные по длительной выживаемости в исследованиях консолидации позволят оценить влияние отрицательного статуса МОЗ на выживаемость
- Методы определения МОЗ
 - Качественная ПЦР или проточная цитометрия не эффективны
 - Стандартизованы RQ-ASO IGH-PCR или >4-цвет проточная цитометрия



Благодарность



Группа исследований ХЛЛ NCRI

Peter Hillmen (Предс.)

Samir Agrawal

Andrew Bosanquet

Adrian Bloor

Daniel Catovsky

Kim Cocks

Claire Dearden

Steve Devereux

Monica Else

Chris Fegan

George Follows

John Gribben

Terry Hamblin

Ben Kennedy

Estelia Matutes

Don Milligan

David Oscier

Chris Pepper

Andy Pettitt

Chris Pocock

Sue Richards

Anna Schuh

Allstair Smith

Elisabeth van der Bergh



Alex Smith
Kim Cocks
Emma Lindop
Julia Brown

Dena Cohen
Gill Eddison
Walter Gregory



Roche, GSK, Genzyme за проведенные исследования



Резюме

- **Анализ МОЗ — стандартный компонент клинических исследований**

- Проточная цитометрия или ПЦР с чувствительностью не ниже 1 клетки ХЛЛ на 10000 лейкоцитов (0,01%, $10E-4$)
- Качественный анализ может быть информативным, но недостаточен

- **Уровень МОЗ (0,01%) — один из наиболее мощных независимых предсказательных факторов выживаемости**

- Отрицательный статус МОЗ является целью первой линии терапии для долгосрочной выживаемости
- Исследование CLARET — проспективная оценка консолидации



Peter Hillmen
Andrew Jack
Fiona Bennett
Jane Shingles
Marieth Plummer
Ruth de Tute
Matt Cullen
Paul Evans
Sheila O'Connor
Stephen Richards
Sharon Barrans
Abraham Varghese
Ben Kennedy
Paul Moreton





ВПЕРВЫЕ!
Русскоязычная версия!

Группа компаний «СвитЧайлд» —
единственный в России представитель крупнейшего
издательского холдинга «OXFORD PRESS»

представляет

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОНКОЛОГИИ

Annals of Oncology



Международный журнал,
руководимый старей-
шей медицинской ассоциацией
европейских радиологов и
онкологов, онкологический
а также по лечению
и восстановлению пациентов,
патологии, включая
профилактические аспекты.
Официальный журнал
Европейского общества
медицинской онкологии
(European Society for Medical
Oncology)
и с 2008 года Японского
общества медицинской
онкологии (Japanese Society
of Medical Oncology)



Председатель редакционного совета

М.И. Давыдов, Академик Российской академии наук, профессор РАН, профессор,
директор института онкологии и радиационной физики РАН (г. ИТФ, Давыдов М.И.)

ВНИМАНИЕ! ПОДПИСКА!

Тел.: +7 (495) 608-25-45 (доб.114)

www.humrep.ru

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



VIII РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ 8th Russian Conference with International Participation «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

7-8 июня 2011, Москва

June, 7-8; 2011

ЗАСЛУЖЕННЫЙ ПРЕДСЕДАТЕЛЬ профессор *G. Janossy* (Великобритания)
HONORARY CHAIRMAN Professor George Janossy (UCL, London, UK)

Место проведения - Conference Venue

Конференц-зал НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН
г. Москва, Каширское шоссе, д.23

**N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Russian Academy of
Medical Sciences, Institute of Clinical Oncology, Conference Hall
23, Kashirskoe Shosse, Moscow**

ОРГАНИЗАТОР



**Учреждение Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр
имени Н.Н.Блохина РАМН
при финансовой поддержке
Российского фонда
фундаментальных исследований**

**Рабочие языки конференции – русский и английский, синхронный перевод
Conference languages – Russian, English; synchronous translation**

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА / HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

7 июня 2011, вторник

June 7, 2011

Заезд участников, регистрация
Arrival of participants, registration

8 июня 2011, среда

June 8, 2011

9.00-9.30

Регистрация участников
Registration

9.30-10.00

Открытие конференции
Opening ceremony

Председатели/
Chairpersons

член-корреспондент РАМН проф. **И.В. Поддубная**, проф. **З.Г. Кадагидзе**,
проф. **Д.Ш. Османов**, проф. **G. Janossy (UK)**, проф. **Н.Н. Тупицын**
Associate Member of Russian Academy of Medical Sciences Prof. **I.V. Poddubnaya**,
Prof. **Z.G. Kadagidze**, Prof. **D.S. Osmanov**, Prof. **G. Janossy (UK)**,
Prof. **N.N. Tupitsyn**

Приветственное слово президента ассоциации онкогематологов России чл. - корр. РАМН
профессора **И.В. Поддубной**

Introductory words. Professor **I.V. Poddubnaya**, Associate Member of RAMS, President, Russian
Oncohematologists Association

Приветственное слово профессора **G. Janossy** (Emeritus Professor, UCL, London, UK)
Introductory words. Professor **G. Janossy** (Emeritus Professor, UCL, London, UK)

Приветственное слово профессора **З.Г. Кадагидзе** (зав. централизованным клинико-
лабораторным отделом РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия)

Introductory words. Professor **Z.G. Kadagidze** (Head of Centralized Clinical Laboratory
Department, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia)

Приветственное слово профессора **Д.Ш. Османова** (зав. отделением химиотерапии
гемобластов РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия)

Introductory words. Professor **D.S. Osmanov** (Head of Haematopoietic Malignancies
Chemotherapy Department, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia)

Проф. **Н.Н. Тупицын** (зав. лабораторией иммунологии гемопоэза РОНЦ имени Н.Н.
Блохина РАМН, Москва, Россия) **«Иммунология гемопоэза» - фундаментальная**

конференция с практическим выходом в диагностику и лечение

Professor **N. N. Tupitsyn** (Head of Haematopoiesis Immunology Lab. N.N. Blokhin Cancer
Research Center, Moscow, Russia): **“Haematopoiesis Immunology” — a conference of basic
science with practical translation into the diagnosis and treatment**

Утреннее заседание – Morning session

10.00-13.00

«Патология костного мозга»
«Bone Marrow Oncohaematological Pathology»

Председатели/
Chairpersons

проф. **M. Chilosi** (Verona, Italy), проф. **С.А. Луговская** (Россия),
проф. **А.М. Ковригина** (Россия)

Professor **M. Chilosi** (Verona, Italy), Professor **S.A. Lugovskaya** (Russia),
Professor **A.M. Kovrigina** (Russia)

10.00-10.30

Проф. **М.А. Френкель** (ведущий научный сотрудник лаборатории
иммунологии гемопоэза РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия):
«Этапы формирования классификации МДС: проблемы, итоги»
Professor **M.A. Frenkel** (Leading Researcher, Haematopoiesis Immunology

	Lab. N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia); "Classification of myelodysplastic syndrome (MDS): Results and Problems"
10.30-10.50	Проф. Е.Е. Зуева (Зав. лабораторией клинической иммунологии и молекулярной диагностики Государственного Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия); «Иммунологическая диагностика МДС» Professor E.E. Zuyeva (Head, Lab. of Clinical Immunology and Molecular Diagnostics, I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia); "MDS Immunological Diagnosis"
10.50-11.10	Кандидат медицинских наук А.Д. Ширин (старший научный сотрудник отделения химиотерапии гемобластозов РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия); «Современные принципы лечения миелодиспластического синдрома» A.D. Shirin M.D., Ph.D. (Senior Researcher, Haematopoietic Malignancies Chemotherapy Department, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia); "Contemporary Principles for the Treatment of MDS"
11.10-12.10	Prof. Marco Chilosi (Full Professor of Pathology, Department of Pathology, University of Verona Director of the Anatomic Pathology Diagnostic Service, Azienda Integrata Ospedale Università di Verona, Verona, Italy) "The colourful role of monoclonal antibody probes in bone marrow histopathology: from immunofluorescence to immunoperoxidase and back"
12.10-13.00	Дискуссия Discussion
13.00-14.00	Обед Lunch
14.00-16.05	Дневное заседание – Afternoon session «Анализ редких событий в онкологии и онкогематологии» «Analysis of rare events in oncology and oncohaematology»
Председатели Chairpersons	Professor G. Janossy (UK), Professor A.V. Pora (Russia), C. Alix-Panabieres, Ph.D. (Maitre de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier Laboratoire Cellules Circulantes Rares Humaines - LCCRH Institut de Recherche en Biothérapie - IRB Université Montpellier 1 Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, France)
14.00-14.40	Catherine Alix-Panabieres , Ph.D.: "EPISPOT assay: Detection of viable disseminating tumor cells in patients with a solid tumor"
14.40-15.10	G.Janossy (Emeritus Professor, UCL, London, UK) «Cellular differentiation in bone marrow, applied to MRD detection»
15.10-15.30	Кандидат медицинских наук Л.Ю. Гривцова (Старший научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия) «Практические аспекты определения остаточных лейкозных бластов на 15-й день терапии индукции ремиссии у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-лимфоцитов предшественников» L.Yu. Gritsova, M.D., Ph.D. (Senior Researcher, Haematopoiesis Immunology Lab. N.N.Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia); "Practical Aspects of Residual Leukemia Blast Monitoring on day 15 of Induction Therapy in Children with Acute B-Cell Lymphoblastic Leukemia"
15.30-15.50	Кандидат медицинских наук Н.А. Купрышина (Старший научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия) «Маркеры протокола ERIC в дифференциальной диагностике ХЛЛ и индолентных лимфом»

	N.A. Kupryshina , M.D., Ph.D. (Senior Researcher, Haematopoiesis Immunology Lab. N.N.Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia); "European Research Initiative in CLL (ERIC) for the Differential Diagnosis of CLL and Indolent Lymphomas"
15.50-16.05	Т.В. Горбунова (аспирант, Институт Детской онкологии и гематологии РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия); «Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей в норме и при мелкоклеточных саркомах. Клиническое значение» T.V. Gorbunova , M.D. (Postgraduate, Institute of Children Oncology and Haematology, N.N.Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia); "Comparison of Bone Marrow Lymphocyte Subpopulations in Normal Children and Pediatric Patients with Small-Cell Sarcomas. Clinical Relevance"
16.05-16.25	Перерыв, кофе Coffee-break
16.25-17.35	Вечернее заседание - Evening session «Трансплантация стволовых клеток» «Haematopoietic Stem Cell Transplantation»
Председатели Chairpersons	Президент ассоциации гематологов Турции проф. S. Dincer , зав. клиникой «Нейровита» профессор А.С. Брюховецкий , зав. отделом химиотерапии НИИ Детской онкологии и гематологии РОНЦ профессор Г.Л. Менткевич , зав. отделением трансплантации НИИ Клинической онкологии РОНЦ к.м.н. К.Н. Мелкова President of Hematology association of Turkey Professor Suleyman Dincer , Professor G.L. Mentkewich (Head of Chemotherapy department, Institute of Children Oncology and Haematology, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia), Professor A.S. Bryukhovetskiy , K.N. Melkova , M.D., Ph.D.
16.25-16.45	Professor S. Dincer (Turkey) "Transplantation in oncohaematology in Turkey"
16.45-16.55	к.м.н. К.Н. Мелкова "Современные технологии трансплантации стволовых гемопоэтических клеток в онкогематологии у взрослых" K.N. Melkova , M.D., Ph.D. (Head of transplantation department, Institute of Clinical oncology, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia) "Modern technologies of haematopoietic stem cell transplantation in oncohaematology in adults"
16.55 –17.15	Руководитель клиники «Нейровита» профессор А.С. Брюховецкий «Применение стволовых гемопоэтических клеток при травматической болезни спинного мозга» Professor A.S. Bryukhovetskiy (Head of "Neurovita" Clinic, Moscow, Russia); "Haematopoietic stem cell administration in Spinal Cord Injury"
17.15 –17.35	д.м.н. И.С. Долгополов (ведущий научный сотрудник НИИ Детской онкологии и гематологии РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН) «Трансплантация стволовых гемопоэтических клеток в детской онкологии и гематологии» I.S. Dolgoplov , M.D., Ph.D., DScMed (Leading Researcher, Institute of Children Oncology and Haematology, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia); "Transplantation of haematopoietic stem cells in children oncology and haematology. Vulnerability of the Central Nervous System Following Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation"

Закрытие конференции
Closing the Conference