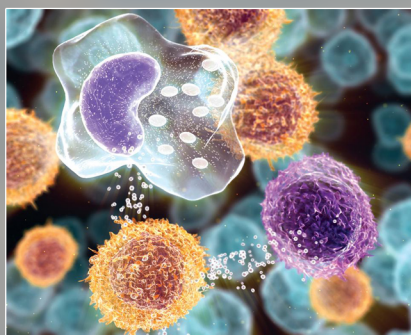


ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HAEMATOPOÏESIS
IMMUNOLOGY

И 1-2/2014



ISSN 1818-4820



9 771818 482005

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
1-2/2014 том 12

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. Виженес (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: +7(499)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 28.04.2014. Формат 60×90/8.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».

Печать офсетная.

Уч.-изд. листов 7. Тираж 1000 экз.

Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии «ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»

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
1-2/2014 vol. 12

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. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzsk)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478. Tel/fax: +7(499)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 «PRACTICAL MEDICINE»
Print-run 1000 copies

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВМЕСТО ПРЕДИСЛОВИЯ.....	4
--------------------------------	----------

*Давыдов М.И., Тупицын Н.Н., Т.А.Григорьева,
О.А.Безнос, О.А.Повалихина, И.К.Воротников, В.Ю.Сельчук*

МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ МИНИМАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ РАКОМ.....	8
---	----------

М.А. Френкель

ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА В ОНКОЛОГИИ.....	18
---	-----------

Б. Брандо, А. Гатти

АНАЛИЗ НОРМАЛЬНОГО КОСТНОГО МОЗГА МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ.....	42
---	-----------

Б. Паива

ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ И ИХ СУБПОПУЛЯЦИИ В КОСТНОМ МОЗГЕ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	64
--	-----------

Роустрон Э.

МИНИМАЛЬНОЕ ОСТАТОЧНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ КАК КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ: ОБНОВЛЕННЫЕ ДАННЫЕ ОБЩЕСТВЕННОГО РАБОЧЕГО СОВЕЩАНИЯ В USFDA.....	76
---	-----------

Ван де Лоосдрехт А.А., Вестерс Т.М.

РОЛЬ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ.....	83
---	-----------

ТЕЗИСЫ.....	90
--------------------	-----------

ПРОГРАММА XI Международной конференции
«Иммунология гемопоэза»
«Костный мозг онкологического больного»

ФОТОМАТЕРИАЛЫ X-й конференции «Иммунология гемопоэза»

Организация XI международной конференции «Иммунология гемопоэза»
и публикация материалов конференции в настоящем номере
«Иммунологии гемопоэза» поддержаны Российским фондом
фундаментальных исследований. Грант №14-04-06015г

CONTENTS**INTRODUCTORY WORDS.....4***Davydov M.I., Tupitsyn N.N., T.A. Grigorieva,**O.A. Beznos, O.A. Povalikhina, I.K. Vorotnikov, V.Yu. Selchuk***ASSESSMENT OF MINIMAL BONE MARROW INVOLVEMENT
BY FLOW CYTOMETRY IN CANCER PATIENTS.....9***Frenkel M.A.***BONE MARROW STUDY IN ONCOLOGY.....19***Brando B., Gatti A.***MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY ANALYSIS
OF NORMAL BONE MARROW.....43***Paiva B.***BONE MARROW PLASMA CELLS AND ITS SUBSETS:
METHODOLOGICAL ASPECTS OF STUDY.....65****ABSTRACTS.....90****PROGRAM**

Organization of XIth International Conference “Haematopoiesis Immunology”
and publication of materials in this issue was supported by Russian Foundation
for basic research, grant № 14-04-06015g

ВМЕСТО ПРЕДИСЛОВИЯ

Уважаемые коллеги!

XI Международная конференция «Иммунология гемопоэза» и данный номер журнала рассматривают некоторые важные аспекты диссеминации солидных опухолей по костному мозгу. Информативность цитологического и иммунологического исследования костного мозга хорошо доказана при опухолях у детей и при терминальных стадиях рака у взрослых. На начальных стадиях рака, например, рака молочной железы, при исследовании пунктатов костного мозга на первый план выступает подробная характеристика полученных образцов костного мозга, в том числе его клеточности, морфологического состава (миелограмма); важно также определить степень разбавления клеток костного мозга периферической кровью, которое происходит при заборе образца костного мозга. Количество раковых клеток в костном мозге в большинстве случаев операбельных опухолей ничтожно мало – единичные клетки на 10^7 миелокариоцитов. Очевидно, что для выявления таких небольших пропорций клеток требуются современные технологические решения. Одним из перспективных подходов является высокоскоростная проточная цитометрия с акустической фокусировкой (проточные цитометры Attune, Life Technologies), позволяющая анализировать до 10^8 миелокариоцитов. Различные аспекты этого перспективного подхода обсуждаются в данном номере журнала.

Иммуногистохимическое исследование позволяет не только выявлять диссеминированные раковые клетки, но и оценивать микроокружение, в котором скрываются эти клетки. Одной из важных проблем для исследователей являются подмножества клеток в составе диссеминированных опухолевых элементов, которые можно считать «стволовыми раковыми клетками» (возможный источник рецидива опухоли). Выявление этих особых клеток в костном мозге и определение их пропорций представляется важным вопросом, на который должны ответить исследователи, если ставят перед собой задачу эрадикации рака.

Важную роль в понимании персистенции раковых клеток в костном мозге играют изучение гемопоэза и иммунной системы костного мозга онкологических больных при наличии и отсутствии в нем раковых клеток. Костный мозг является одним из главных компартментов, где локализуются и сохраняются в процессе лечения раковые клетки. Проблема минимального рака эффективно изучается в мире, каждые 2 года проводятся специализированные международные конгрессы, организованные профессором К. Пантелом (последняя конференция ISMRC состоялась в 2013 г. в Париже; председатели: профессор К. Пантел, доктор К. Аликс-Панабьер и профессор Ж-И. Пиерга). Несомненно, диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге являются составной частью этой проблемы, и понимание механизмов их латентности и выхода из этого состояния будет способствовать поиску эффективных путей эрадикации рака.

*Клаус Пантел, Катрин Аликс-Панабьер,
Джордж Джаносси и Николай Тупицын*

INTRODUCTORY WORDS

Dear colleagues!

The 11th International “Haematopoiesis Immunology” Conference and this Journal issue discuss some important aspects of the dissemination of solid tumor cells into the bone marrow. The informative value of the cytological and immunological studies of the bone marrow is described in childhood malignancies and terminal cancer stages in adults. At the early phases of malignancies such as breast cancer the analysis of bone marrow aspirates focuses on the detailed characterization of bone marrow specimens including bone marrow cellularity and morphological composition (myelogram) — with a consideration about the degree of the dilution of bone marrow cellularity by admixture of peripheral blood drawn during taking the biopsy. In most operable tumors the number of cancer cells in bone marrow can be very small, only a few carcinoma cells per 10^7 nucleated bone marrow cells (myelokaryocytes). Clearly, the detection of such tumor cells in minor proportions requires novel technical solutions. High-speed flow cytometry with acoustic focusing provided by the modern flow cytometers such as *Attune* (Life Technologies) is capable of analyzing up to 10^8 myelokaryocytes. Aspects of this promising approach are documented here.

Immunohistochemical assays also detect disseminated cancer cells as well as contribute to the assessment of the precise microenvironments where these malignant cells hide. One extended aim is to focus on subsets of cells among disseminated tumor elements which can be considered as the “cancer stem cell” (from which the tumor can relapse). To observe whether these special seeds are present in the bone marrow, and in what proportions, is one of the essential problems to answer when cancer eradication is the aim.

Study of bone marrow hemopoiesis and the immune system in cancer patients with cancer-cell positive bone marrow may also play an important role in understanding of cancer cell persistence in bone marrow. Bone marrow is a main compartment where cancer cells migrate and remain preserved during treatment. The problem of the minimal cancer is in the focus of worldwide studies, and specialized conferences organized by Prof K. Pantel are held every two years (Last ISMRC meeting was held in 2013 in Paris: Chairpersons, Prof K. Pantel, Dr C. Alix-Panabières & Prof J.-Y. Pierga). No doubt that disseminated tumor cells in the bone marrow are a principal part of this problem, and understanding of mechanisms of their dormancy and waking-up will help in search for effective approaches to eradicate cancer.

*Klaus Pantel, Catherine Alix-Panabières,
George Janossy and Nikolai Tupitsyn*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген
аллоТГК – аллотрансплантация гематопозитических клеток
Ауто-, алло-ТКМ – аутологичная или аллогенная трансплантация клеток костного мозга или мобилизованных стволовых клеток периферической крови
БРВ – безрецидивная выживаемость
БСВ – бессобытийная выживаемость
БК МПН – бластные кризы миелопролиферативных новообразований
ДОК-КМ – диссеминированная опухоль клеток в костном мозге
ИГ – иммуноглобулин
ИФА – иммуноферментный анализ
ИФТ – иммунофенотипирование
ЛАФ – лейкоз-ассоциированные фенотипы
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛПЗ – лимфопротеративные заболевания
ЛСК – лейкозные стволовые клетки
МДС – миелодиспластические синдромы
МК – моноклональный компонент
МКА(Т) – моноклональные антитела
ММ – множественная миелома
МНК – мононуклеарные клетки
МОБ – минимальная остаточная болезнь
МПО – миелопероксидаза
МПЦ – мультипараметрическая проточная цитометрия
МРБ – минимальная резидуальная болезнь
НХЛ – неходжкинская лимфома
НЭ – α -нафтил-ацетат-эстеразы эфир
ОМЛ – острый миелолейкоз
ПЦ – проточная цитометрия
РА – рефрактерная анемия
РБ – резидуальная болезнь
РМЖ – рак молочной железы
РЛ – разнице логарифмов
СКПК – стволовые клетки периферической крови
кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция
КМ – костный мозг
РИФ – реакция иммунофлуоресценции
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ПГЭ – профиль генной экспрессии
ПК – плазматические клетки
ПМЭ – полиморфные элементы
ПР – полная ремиссия
ПЦ – проточная цитометрия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
СРБ – С-реактивный белок
ТПЛ – тумор-пенетрирующие лимфоциты
ФТС – фетальная телячья сыворотка
 β -ХЛЛ – В-клеточный хронический лимфолейкоз
ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
ЧР – частичная ремиссия

ABBREVIATIONS

Ag – antigen
AML – acute myeloid leukemia
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
BM – bone marrow
CD – cluster of differentiation
CR – complete remission
CRP – C-reactive protein
CML – chronic myeloid leukemia
DTC – disseminated tumor cells
EIA – enzyme immunoassay
ESR – erythrocyte sedimentation rate
ESFT – Ewing's sarcoma family of tumors
FC – flow cytometry
FISH – fluorescent hybridization in situ
GEP – gene expression profiling
HMW-MAA – high molecular weight-melanoma-associated antigen
IG – immunoglobulin
IFR – immunofluorescence reaction
IPT – immunophenotyping
ITC – isolated tumor cells
LAPs – leukemia-associated phenotype
LDH – lactate dehydrogenase
LPD – lymphoproliferative disease
LSC – leukemic stem cells
MDS – myelodysplastic syndrome
MC – monoclonal component
Mab – monoclonal antibodies
MFC – multiparameter flow cytometry
MHC – major histocompatibility complex
MNC – mononuclear cells
MPN – myeloproliferatin
MRD – minimal residual disease
NK-cells – natural killer cells
NHL – non-Hodgkin's lymphoma
QPCR – quantitative polymerase chain reaction
RFS – relapse-free survival
PNAS – Proceedings of National Academy of Sciences of the USA
RD – residual disease
PBS – phosphate buffered saline
PC – plasma cells
PCR – polymerase chain reaction
VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule

М.И. Давыдов, Н.Н. Тупицын, Т.А. Григорьева, О.А. Безнос,
О.А. Поваляхина, И.К. Воротников, В.Ю. Сельчук

**МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ
В ОЦЕНКЕ МИНИМАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА
У БОЛЬНЫХ РАКОМ**

ФГБУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина», Москва

Резюме

Оценка гематологического метастазирования является одной из главных характеристик распространенности опухоли в организме. Она находит отражение в классификации TNM как индекс М. В последнее время добавлен индекс $M_0(i+)$, который указывает на присутствие циркулирующих опухолевых клеток или микрометастазов размером менее 0,2 мм. Костный мозг является главным участком тела, где опухолевые клетки задерживаются и находятся в покоем состоянии в течение лет и десятилетий. Не существует стандартных методологических критериев количественной оценки диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге. Ранее проточная цитометрия считалась непригодной для выявления диссеминированных опухолевых клеток, так как определение последних было невозможно без предварительного обогащения среди десятков и сотен миллионов миелокариоцитов. Новые высокоскоростные проточные цитометры *Attune* с акустической фокусировкой открывают возможности исследования диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге. В работе представлены данные на модельной системе линии клеток рака молочной железы MCF-7, добавляемых в различных пропорциях к нормальному костному мозгу. Сбор большого количества миелокариоцитов (до 100 000 000) позволяет идентифицировать все добавленные раковые клетки без предварительного фракционирования костного мозга. В экспериментах с иммуномагнитным фракционированием отмечалась потеря части опухолевых клеток. Данный проточно-цитометрический методический подход применен для определения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге 65 больных операбельным раком молочной железы. Опухолевые клетки обнаружены в 23% случаев (более 1 клетки на 10 000 000 миелокариоцитов). При определении диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных раком необходимо проводить исследование среди большого количества миелокариоцитов (десятки миллионов), осуществлять забор малого объема костного мозга (примерно 1,0 мл) и проводить обязательную оценку качественного состава костного мозга (клеточность, миелограмма).

Ключевые слова: костный мозг, рак молочной железы, диссеминированные опухолевые клетки, *Attune*.

*M.I. Davydov, N.N. Tupitsyn, T.A. Grigorieva, O.A. Beznos,
O.A. Povalikhina, I.K. Vorotnikov, V.Yu. Selchuk*

**ASSESSMENT OF MINIMAL BONE MARROW INVOLVEMENT
BY FLOW CYTOMETRY
IN CANCER PATIENTS**

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

Summary

Haematological metastasis status is one of the main characteristics of tumor spread in the body. It is reflected in TNM classification as index M. Recently index M0(i+) for micrometastases was added to indicate the presence of circulating tumor cells or tumor aggregates less than 0,2 mm. Bone marrow is the main site where tumor cells reside to dorm for years and decades. There are currently no clear standardized criteria for quantification of disseminated tumor cells in bone marrow. Flow cytometry was not formerly accepted because it could not assess tens or hundreds of millions bone marrow cells to identify few tumor cells. New high- speed flow cytometers Attune with acoustic focusing overcome these shortcomings. We present data on a model system with MCF-7 breast cancer cells added to normal bone marrow. Harvesting of a large number of myelokaryocytes (up to 100 million) allowed identification of all added breast cancer cells without any tumor cell loss. However, we noted a loss of added tumor cells in parallel experiments with immunomagnetic enrichment. This approach was used to study bone marrow in 65 operable breast cancer patients. Tumor cells were detected in 23% of patients (more than 1 tumor cell in 10 million myelokaryocytes). In studies of cancer patients' bone marrow it is essential to assess a large number of cells (several tens of millions), to take a small volume of bone marrow (about 1 ml), and to perform bone marrow quality control (cellularity, myelogram).

Key words: Bone marrow, breast cancer, disseminated tumor cells, Attune.

Одним из главных свойств раковых клеток является их способность отщепляться от первичной опухоли, подвергаться рециркуляции [1] и мигрировать в костный мозг, где они пребывают длительное время в латентном состоянии [2]. Обнаружение ДОК-КМ ассоциируется с высоким риском опухолевой прогрессии и смерти больных раком [3]. Проточная цитометрия не является достаточно чувствительной для обнаружения ДОК-КМ, так как эти очень редкие события обычно обнаруживаются с частотой несколько клеток на 10 000 000 миелокариоцитов. По этим причинам требуется фракционирование КМ, что может быть ассоциировано с потерей опухолевых клеток. Для анализа ДОК-КМ чувствительность проточной цитометрии необходимо повысить в 100–1000 раз. В настоящей статье показано, что количественная оценка ДОК-КМ может проводиться среди огромного количества миелокариоцитов (до 100 000 000) в приблизительно 1 мл КМ с использованием высокоскоростной проточной цитометрии с акустической фокусировкой. Это позволяет обнаруживать ДОК-КМ без предварительного фракционирования костного мозга и исключает попадание в пробу циркулирующих опухолевых клеток крови. Данный метод имеет более высокую чувствительность обнаружения редких событий и позволяет выражать количество ДОК с использованием общего знаменателя в 10 000 000 миелокариоцитов. Уровень ДОК-КМ отражает степень распространенности опухоли, и именно ДОК-КМ являются главным источником развития отдаленных метастазов. Количественная оценка ДОК-КМ полезна в стадировании рака, мониторинге распространенности опухоли в ходе лечения и поиске новых подходов эрадикации ДОК-КМ.

Костный мозг – наиболее интригующий орган у больных раком. Именно в костном мозге ДОК могут выживать в течение лет и даже десятилетий, а затем «пробуждаться» [4] из латентного состояния и давать рост отдаленным (обычно летальным) метастазам. В большинстве случаев уровни раковых клеток в КМ очень низкие (несколько штук на 10 000 000 миелокариоцитов), и анализ этих очень редких событий является наиболее сложным в онкологии. Однако именно этот анализ является наиболее востребованным, так как он демонстрирует (отражает) уровень минимального рака в КМ как при диагностике, так и после лечения. Подобная информация имеет большую прогностическую значимость. Это лучший критерий ответа на лечение, как доказано при опухолях крови и некоторых формах рака.

Проточная цитометрия является стандартным методом определения МОБ в онкогематологии [5–7]. Специфические антигенные профили злокачественных клеток позволяют отличить опухолевые клетки от нормальных аналогов. В онкогематологии морфологическая верификация при анализе МОБ не требуется, так как отличить нормальные лимфоциты, лимфобласты, плазмочиты от злокачественных на морфологическом уровне не представляется возможным. Чувствительность определения МОБ проточной цитометрией составляет 1×10^{-4} , что соответствует клиническим требованиям.

Basic property of cancer cells is to detach from the primary tumor, undergo recirculation[1] and migrate to dorm in BM[2]. The presence of disseminated tumor cells in bone marrow (BM-DTC) is associated with high risk of disease progression and death of cancer patients.[3] Flow cytometry is not sensitive enough for detection of BM-DTC as these very rare events are usually found at a rate of few cells per 10 million myelokaryocytes. Fractionation of BM is therefore needed in every case which may be associated with tumor cell loss. Sensitivity of flow cytometry should be increased by 10^2 to 10^3 to detect BM-DTC. We show here that BM-DTC quantification may be made in up to 100 million myelokaryocytes in about 1 ml BM using high-speed flow cytometry with acoustic focusing. It detects DTC without preliminary BM enrichment and fractionation and excludes admixture of circulating tumor cells. This technique has a higher sensitivity to rare events and allows DTC numeric expression with a common denominator of 10 million myelokaryocytes. The BM-DTC level reflects tumor cell burden, and these cells are the main source of distant metastasis. The BM-DTC quantification is useful in disease staging, monitoring of tumor spread during treatment and search for new modalities of DTC eradication.

BM is the most intriguing site in cancer patients. It is in BM that DTC can survive for years or even decades to wake up[4] and give rise to distant (usually fatal) metastases. In most cases levels of cancer cells in BM are very low (few cells per 10 million BM cells), and analysis of these very rare events is most difficult in oncology. However this type of study is most demanded as it demonstrates (reflects) the level of minimal cancer in BM both at diagnosis and after successful treatment. This information is of a great prognostic value. It is the best criterion of response to treatment as proven for hematology malignancies and several cancer entities. Flow cytometry is a standard method to measure MRD in oncohematology.[5–7] Specific antigen profiles of malignant cells allow tumor elements to be distinguished from normal cell analogues. In oncohematology morphological verification of MRD is not required because it is impossible to distinguish normal lymphoblasts, lymphocytes or plasmacytes from malignant analogues at the morphological level. Sensitivity of MRD detection by immunocytofluorimetry is 1×10^{-4} which meets clinical requirements.

Иная ситуация имеет место при обнаружении ДОК-КМ при диагностике или в ходе лечения рака. Уровень ДОК-КМ при раке примерно в 1000 раз ниже, чем уровни МОБ, определяемые при лейкозах и лимфомах. По этим причинам определение ДОК проводится после обогащения с иммуноцитологической верификацией эпителиальной природы этих клеток.

Проточные цитометры нового поколения с акустической фокусировкой *Attune* имеют ряд уникальных преимуществ, включая высокую скорость сбора клеток (в 10 раз больше, чем у обычных цитометров), акустическую фокусировку (формируются более четкие клеточные кластеры, подлежащие анализу) и, наконец, возможность создавать огромные файлы (вплоть до 100 000 000 клеток). Эти революционные технологические решения впервые позволяют решить проблему детекции очень редких событий, таких как ДОК-КМ, для обнаружения которых требуется анализ 50–100 000 000 миелокариоцитов.

Нами изучена возможность обнаружения у больных раком ДОК-КМ методом проточной цитометрии с акустической фокусировкой.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были проведены на модельной системе с использованием клеток линии MCF-7 (рак молочной железы человека), которые добавляли в различных пропорциях к большому количеству миелокариоцитов (до 100 млн) нормального костного мозга для количественного определения раковых клеток в костном мозге с помощью проточной цитометрии.

Оценивали клеточность костного мозга на анализаторе *Micros 60* (Horiba, USA). Добавляли 9 объемов лизирующего раствора (BD, USA) к объему костного мозга, содержащего необходимое количество клеток (обычно – 10–100 млн). После лизиса эритроцитов клетки отмывали центрифугированием и инкубировали с реагентом, блокирующим FcR (Myltenyi Biotech, USA), затем добавляли антитела (CD326-PE/CD45-FITC, BD, USA). Клетки инкубировали 30 мин, однократно отмывали PBS, доводили до концентрации 1 млн/мл и собирали на проточном цитометре *Attune* (Life Technologies, USA). В сравнительных экспериментах определение эпителиальных клеток в костном мозге проводили после иммуномагнитного обогащения с анти-CD326, меченными магнитными частицами, в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Myltenyi Biotech, USA).

В клинических исследованиях определение ДОК-КМ проведено у 65 больных операбельным раком молочной железы. Больные предварительно подписывали информированное согласие. Забор костного мозга (примерно 1,0 мл) проводили под общей анестезией во время хирургического вмешательства. Оценка клеточности костного мозга и подсчет миелограмм осуществлялись во всех случаях. Клетки костного мозга окрашивали антителами CD326-PE/CD45-FITC по вышеописанной методике.

The situation is different for BM-DTC detection at diagnosis or during treatment of cancer. BM-DTC level in cancer is about 1000-fold lower than levels of residual disease cells in leukemia or lymphoma. Therefore DTC detection is made after enrichment with immunocytological verification of their epithelial origin to follow.

New-generation flow cytometers with acoustic focusing *Attune* have several unique advantages including high speed of cell harvesting (10 fold higher than that of conventional cytometers), acoustic focusing (to ensure a more accurate formation of cell clusters to be analyzed) and finally the ability to create huge files (up to 100 million cells). These revolutionary technological solutions allow for the first time to address the problem of detection of very rare events such as BM-DTC that involves analysis of 50 to 100 million myelokaryocytes.

We studied possibility of BM-DTC detection by flow cytometry with acoustic focusing in cancer patients.

Materials and methods

Experimental study was made on a model system using cells of the MCF-7 breast cancer lineage which were added at various proportions to normal BM to assess potentials for tumor cell quantification, methods for fluorescent signal compensation and accumulation of a large number of myelokaryocytes (up to 100 million cells).

In brief the procedure was as follows. We assessed BM cellularity using a *Micros 60* (Horiba, USA) analyzer. Nine volumes of lysing solution (BD, USA) were added to a BM volume containing the needed number (usually 20 millions or 10 millions) of cells, after lysis the cells were washed by centrifuging and incubated with FcR blocking reagent (Myltenyi Biotech, USA), then antibodies (CD326-PE/CD45-FITC, BD, USA) were added, and after one washing with PBS the cells were diluted to a 1 million per ml concentration.

Flow cytometry was made using an *Attune* (Life Technologies, USA) cytometer. Clinical study involved BM-DTC detection in 65 patients with operable breast cancer. BM (approximately 1 ml) was harvested under anesthesia during surgery. Assessment of BM cellularity and morphological myelogram count on BM smears were performed in all cases. Immunological cell staining was made as described above.

In comparison experiments epithelial cells were detected after BM treatment with anti-CD326 antibody loaded with magnetic particles (Myltenyi Biotech, USA) and immunomagnetic enrichment to follow according to manufacturer's recommendations.

Результаты

Оценена возможность определения ДОК в морфологически нормальном костном мозге (исследование проведено на 7 образцах костного мозга больных гемобластозами в клинко-гематологической ремиссии). Типичный пример распределения клеток нормального костного мозга в координатах CD45/SSC представлен на рис. 1а (см. вклейку).

Область локализации ДОК определена в модельной системе с клетками рака молочной железы MCF-7, которые добавляли к 10–100 000 000 клеток костного мозга. Клетки MCF-7 легко определялись среди миелокариоцитов и формировали четкий кластер CD45–EpCAM⁺ (рис. 1б). В нормальном костном мозге клетки в данной области практически отсутствовали (не более 2 клеток на 100 000 000 миелокариоцитов, то есть 0 клеток на 10 000 000 миелокариоцитов во всех случаях), рис. 1в.

Количество эпителиальных клеток MCF-7 в костном мозге, выявляемых проточной цитометрией, соответствовало количеству этих клеток, добавленных к костному мозгу, и пропорционально возрастало при увеличении количества добавляемых эпителиальных клеток. Количество клеток MCF-7 в костном мозге после иммуномагнитного обогащения было более низким, что свидетельствует о потере клеток в процессе фракционирования (рис. 2).

При окраске большого количества клеток костного мозга, содержащего добавленные клетки рака молочной железы MCF-7, моноклональными антителами и отмывок клеток от несвязавшихся антител, часть клеточных элементов теряется. Так, при обработке 100 000 000 миелокариоцитов собрать удавалось от 15 до 46 000 000 клеток. Однако, что интересно, опухолевые клетки в процессе отмывок не «терялись». По-видимому, в силу своих физических свойств, например, большего размера в сравнении с лейкоцитами, эти клетки более успешно седиментируются при отмывках центрифугированием и остаются в образце. Это позволяет обсуждать вопрос о знаменателе, то есть, о том количестве клеток, среди которых проводилось обнаружение раковых. Подобным знаменателем при определении BM-DTC может быть не количество клеток, собранных на цитометре, а общее количество клеток, внесенных в пробу для окраски.

Определение DTC проведено в костном мозге 65 больных операбельным раком молочной железы. Морфологически опухолевые клетки не были обнаружены ни в одном случае, типичный пример миелограммы представлен на рис. 3. Средняя клеточность костного мозга составила $74,0 \pm 6,2$ тыс./мкл. Частота выявления ДОК составила 23,3 % при использовании в качестве порогового уровня 1 опухолевой клетки на 1 000 000 миелокариоцитов (максимально – 11 клеток/млн: при измерении 20 000 000 миелокариоцитов присутствовал четкий кластер из 220 опухолевых клеток).

Results

We assessed possibility of DTC detection in morphologically normal BM (the study was made on 7 BM samples from patients with hematopoietic malignancies in clinical and hematological remission). A characteristic example of normal flow-cytometrical cell distribution in CD45/SSC coordinates is shown in fig. 1a (see insets).

DTC location area was determined in a model system with MCF-7 breast cancer cells added to 20–100 million normal BM cells. The MCF-7 cancer cells were easily seen among myelokaryocytes and formed an EpCam+ CD45– cell cluster (fig. 1b). There were practically no cells in this gate (0 to 2 per 100 000 000 myelokaryocytes, i.e. 0 per 10 000 000 myelokaryocytes in all cases) in normal BM and BM from patients with hematopoietic malignancies in remission (fig. 1c).

The number of MCF-7 epithelial cells in BM as detected by flow cytometry corresponded to that of the added cells and increased proportionally with increase in the number of these cells.

The number of MCF-7 cells in BM after immunomagnetic enrichment was reduced which was evidence of cell loss during immunomagnetic separation (fig. 2).

A part of cell elements was lost as a result of monoclonal antibody staining of a large number of BM cells with the added MCF-7 breast cancer cells and washing the cells to remove unbound antibodies: we managed to harvest 15 to 46 million cells after staining of 100 million cells. Interestingly, there was no loss in cancer cells. It seems that these cells are more easily sedimented during washing by centrifuging due to their physical properties (e.g. greater size as compared to leukocytes) and are preserved in the sample. This observation allows discussion of the problem of denominator, i.e. the number of cells among which cancer cells are detected. It seems that the total number of cells undergoing staining rather than the number of cells harvested on the cytometer should be taken as such a denominator in BM-DTC detection.

BM-DTC detection was made in 65 patients with operable breast cancer. Tumor cells were not found morphologically in any case; a characteristic myelogram example is shown in fig. 3. Average BM cellularity was 74.0 ± 6.2 thousand per mcl. Frequency of DTC detection was 23.3% with a threshold of 1 tumor cell per 1 million myelokaryocytes (maximum 11 cells/million: a clear cut cluster of 220 tumor cells was seen when measuring 20 million myelokaryocytes).

Обсуждение

Исследование костного мозга при диагностике рака молочной железы имеет важное прогностическое значение [8]. В классификации TNM 2010 года выделена особая стадия гематогенной диссеминации M₀(i+).

Методы выявления ДОК-КМ в настоящее время не являются стандартизованными. Большим недостатком исследований в этой области была попытка получения больших количеств костного мозга (как правило, более 5,0 мл). Вместе с тем, хорошо известно, что КМ разбавляется периферической кровью при заборе более 0,2 мл [9]. Поскольку клеточность костного мозга в 10–30 раз выше, чем уровень лейкоцитов крови, забор небольших (до 1,0 мл) объемов костного мозга можно считать приемлемым – практически не влияющим на клеточность и морфологический состав костного мозга. В малых объемах костного мозга попадание циркулирующих опухолевых клеток из крови маловероятно, т.к. за стандартный исследуемый объем крови, позволяющий обнаружить по меньшей мере одну опухолевую клетку, принято 7,5 мл [10]. В нашем исследовании взятие небольшого объема костного мозга (примерно 1,0 мл) позволило у 80% больных изучить наличие ДОК среди более 50 000 000 миелокариоцитов (максимально 200 000 000), что вполне достаточно для определения ДОК. Время, необходимое для анализа ДОК с использованием высокоскоростного цитометра с акустической фокусировкой *Attune*, также является приемлемым (менее 3 часов).

В заключение отметим, что определение ДОК-КМ у больных раком может в ближайшее время стать рутинным тестом. Главными требованиями для подобного анализа являются: забор небольшого объема костного мозга, морфологический контроль качества костного мозга, миелограмма), окрашивание определенного количества миелокариоцитов (20–100 000 000) антителами CD326/CD45, анализ всех окрашенных клеток на высокоскоростном цитометре *Attune* с акустической фокусировкой.

Литература / Literature

1. Kim M.-Y. et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139, 1315–1326 (2009)
2. Aguirre-Ghiso J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy *Nat Rev Cancer* 7, 834–846.(2007)
3. Braun S. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer *N.Engl. J. Med.* 25, 793–802 (2005)
4. Lu X. et al. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors *Cancer Cell* 20, 701–714 (2011)

Discussion

Study of bone marrow at diagnosis of breast cancer is of great prognostic importance.[8] A special stage M0(i+) of hematogeneous dissemination of breast cancer was identified in TNM classification of tumors (2010).

Methods for BM-DTC detection are currently not standardized. The main disadvantage of the studies in this field was an attempt to harvest a large amount of BM (as a rule more than 5 ml). However, it is well known that BM is diluted with peripheral blood in samples more than 0.2 ml.[9] Such dilution is practically irrelevant for BM cellularity in small BM samples (up to 1.0 ml) because BM cellularity is 10 to 30-fold greater than blood cellularity. The presence of circulating tumor cells in small BM samples is hardly possible because the standard blood sample allowing for detection of at least 1 tumor cell is 7.5 ml.[10] Eighty percent of patients present with more than 50 million (up to 200 million) myelokaryocytes in a small BM volume (approximately 1 ml) which is enough for DTC detection. Time needed for DTC analysis using a high-speed cytometer with acoustic focusing *Attune* (usually less than 3 hours) is also acceptable.

In conclusion, BM-DTC detection in cancer patients may become a routine test in the near future. Main requirements for this analysis include harvesting of a small BM amount, morphological quality control (to prevent dilution), staining of a strictly determined myelokaryocyte number (denominator) with CD326/CD45 monoclonal antibodies, analysis of all stained cells using a high-speed cytometer with acoustic focusing *Attune*.

5. Rawstron A.C. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia *Leukemia* 21, 956–64 (2007)
6. Borowitz M.J. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children oncology group study *Blood* 111, 5477–85 (2008)
7. Paiva B. et al. Response assessment in multiple myeloma: clinical significance of MRD monitoring *Haematopoiesis Immunology*, 10, 34–77 (2012)
8. Janni W. et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled study *Clin. Cancer. Res.* 17, 2967–2976 (2011)
9. Abrahamsen J.F. et al. Flow cytometric assessment of peripheral blood contamination and proliferative activity of human bone marrow cell populations *Cytometry*, 19, 77–85 (1995)
10. Cristofanilly M. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer *N.Engl. J. Med.* 351, 781–91 (2004)

М.А. Френкель

ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА В ОНКОЛОГИИ

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Federation

Резюме

Исследование костного мозга занимает важное место в онкологической диагностике. Оно дает возможность характеризовать различные варианты гемобластозов, выявлять диссеминацию опухоли, проводить стадирование опухолевого процесса. Изучение аспиратов и трепанобиоптатов является высокотехнологичным исследованием. Оно включает морфологические, цитохимические, иммунофенотипические, иммуногистохимические, цитогенетические и молекулярно-биологические подходы. В настоящее время остаются нерешенными проблемы оценки количественного состава аспиратов, показателей содержания лимфоцитов в норме. В центре интересов современных исследователей находятся вопросы характеристики микрометастазов опухолей или единичных раковых клеток в костном мозге. Они решаются с применением различных методических подходов: проточной цитометрии, ПЦР, иммуноцитология.

Ключевые слова: аспират костного мозга, нормальная миелограмма, микрометастазы.

Исследование костного мозга широко вошло в клиническую практику в нашей стране с 1928 года. Сначала аспирация костного мозга проводилась при пункции грудины, с 1945 г. – при пункции подвздошной кости, с 1956 г. в клиническую практику была введена трепанобиопсия. В 40–50 годах XX века различными исследователями были отработаны нормы состава миелограммы для взрослых [1–5]. В настоящее время общепринятыми являются данные В.В. Соколова и И.А. Грибовой, полученные в 1972 г [6].

В онкологической практике исследование аспирата и трепанобиоптата костного мозга применяется для диагностики неоплазий гемопоэтической и лимфоидной ткани и выявления метастатических опухолевых очагов. Метастазирование в костный мозг наиболее свойственно для рака молочной железы (до 50% случаев), нейробластомы (50–67%), мелкоклеточного рака легкого (17–45%), рака толстой кишки (4–8%) [7]. Нередко поражение костного мозга наблюдается при меланоме, раке почки, надпочечников, предстательной и щитовидной желез. На основании данных аспиратов и трепанобиоптатов устанавливается гистогенез опухоли, в том числе – из невыявленного первичного очага. Поскольку контингент пациентов с неустановленной опухолью достигает 15% от всех больных, изучение метастазов в костный мозг вносит свой определенный вклад в онкодиагностику.

M.A. Frenkel

BONE MARROW STUDY IN ONCOLOGY

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center

Abstract

Study of bone marrow plays an important role in cancer diagnosis. It helps to characterize various types of hematology malignancies, to detect tumor dissemination, to stage the neoplastic disease. Study of aspiration and trepan biopsies is a high-technology process. It involves morphological, cytochemical, immunophenotypic, immunohistochemical, cytogenetic and molecular biological approaches. Problems of quantification of aspirate composition, establishing normal lymphocyte count have to be solved yet. Today investigators focus on characterization of tumor micrometastasis or isolated cancer cells in bone marrow. A variety of methods including flow cytometry, PCR, immunocytology are used to address these issues.

Key words: bone marrow aspirate, normal myelogram, micrometastases.

Bone marrow study has been widely used in the clinical practice in Russia since 1928. First, bone marrow aspiration was made by sternal puncture, since 1945 it was supplemented by iliac puncture and in 1956 trepan biopsy was added. In the 1940–1950s several investigators defined normal composition of bone marrow in adults [1–5]. The 1972 values by V.V. Sokolova and I.A. Gribova are currently commonly adopted [6].

Studies of bone marrow aspiration and trepan biopsies are used in the diagnosis of hemopoietic and lymphoid neoplasia and detection of metastatic lesion. Bone marrow metastasis is most common for breast cancer (up to 50%), neuroblastoma (50 to 67%), small-cell lung cancer (17 to 5%), colonic cancer (4 to 8%). Bone marrow involvement is often seen in melanoma, renal, adrenal, prostate and thyroid cancers. Analysis of aspiration and trepan biopsies helps to find out histogenesis of tumors including those from unknown primaries. Since cases with unknown primary tumors reach 15%, study of bone marrow metastases is a valuable contribution to the diagnosis.

Исследование костного мозга занимает важное место при мониторинге в процессе химио- и биотерапии. Изучение аспиратов и трепанобиоптатов в настоящее время является комплексным высокотехнологичным диагностическим процессом. Наряду с морфологическим методом используются также цитохимические, иммунофенотипические, иммуногистохимические, цитогенетические и молекулярно-биологические подходы. Суммарная оценка данных позволяет клиницисту решить ряд важных задач диагностики и мониторинга больных с опухолями самого различного генеза.

Как правило, аспират получают при пункции одной локализации, однако в отдельных случаях при затруднительной диагностике рекомендуется проводить исследование одновременно в трех точках: в грудине и двух подвздошных костях, при поиске метастазов проводится трепанобиопсия.

Забор аспирата костного мозга осуществляется по общепринятой методике при пункции грудины или подвздошной кости. Аспират помещается в пробирку S-Monovette с K2 ЭДТА, в количестве, не превышающем 0,5 мл., так как увеличение объема аспирата ведет к разбавлению его периферической кровью. Содержимое пробирки тщательно перемешивается, маркируется и направляется в лабораторию. Количество миелокариоцитов определяется на гематологическом анализаторе ABX Micros 60 Лабикх, приготавливаются мазки для морфологического и цитохимического исследований. Остальной материал может быть использован для иммунофенотипирования различных популяций гемопоэтических клеток (бластов, лимфоцитов и других). Данный подход позволяет избежать повторной пункции при возникновении необходимости дополнительных методов исследования.

Современные взгляды на значимость подсчета числа миелокариоцитов в костном мозге в различных гематологических школах неодинаковы. Во многих классических руководствах рекомендуется оценивать клеточность аспирата визуально при просмотре мазков по грациям: клеточный, малоклеточный, гиперклеточный [8; 9]. Однако И.А. Кассирский еще в 1970 г. в монографии “Клиническая гематология” подчеркивал существенное практическое значение определения числа ядросодержащих элементов в костном мозге. Эти данные позволяют конкретно сопоставить клеточность костного мозга с числом лейкоцитов в крови, оценить степень разбавления кровью при бедном аспирате и определить степень гиперплазии костного мозга при богатом. Кроме того, показатели клеточности играют важную роль при мониторинге пациентов с цитопенией. Наш многолетний опыт по определению клеточности костного мозга на приборе ABX Micros 60 при анализе около полутора тысяч аспиратов в год свидетельствует о важной клинической значимости этого исследования в онкологической практике.

Следует отметить, что число миелокариоцитов в норме широко варьирует ($41,6\text{--}195 \times 10^3/\text{мкл}$). Это обусловлено особенностями строения стромы, расположением кроветворных очагов на костных балках, физиологическими особенностями пациентов.

Bone marrow study plays an important role in monitoring of cancer patients receiving chemo- or biotherapy. Study of aspiration and trepan biopsies is currently a high-technology diagnostic process. Besides morphological analysis, the investigators use cytochemical, immunophenotypic, immunohistochemical, cytogenetic and molecular biological approaches. Summary analysis of the data helps the clinicians to make important diagnostic decisions and to provide adequate monitoring of patients with tumors of various origin.

Besides the common puncture procedure, in difficult cases bone marrow specimens are taken from three points, that is the sternum and two iliac bones, to detect metastases trepan biopsy of both iliac bones is used.

Bone marrow aspirates are taken by a common procedure, i.e. sternal or iliac puncture. The aspirates are placed to *Vacutaner* tubes with K2 EDTA at not more than 0.5 ml because of the risk of peripheral blood dilution. The tube content is stirred carefully, labeled and sent to the laboratory. Myelokaryocyte count is made using a *Micros 60* hematological analyzer and smears for morphological and cytochemical analyses are prepared. The remaining material may be used for immunophenotyping of hemopoietic cell populations (blasts, lymphocytes and others). This approach allows repeated puncture to be avoided if additional investigations are needed.

Current views on the value of myelokaryocyte count in bone marrow differ in different hematology schools. Many classical guidelines recommend visual assessment of aspirate cellularity with the smears classified as cellular, hypo- or hypercellular [8; 9]. However already in 1970 I.A. Kassirsky considered highly important quantification of nucleated elements of bone marrow. These findings allow comparison of bone marrow cellularity and blood leukocyte count, evaluation of dilution in meager or hyperplasia in rich aspirates. Cellularity evaluation also plays an important role in monitoring of cytopenic patients. Our many-year experience in assessment of bone marrow cellularity using *Micros* instruments with analysis of about a thousand and a half aspirates per year proofs the high practical clinical importance of this study.

It should be noted that normal range of nyelocaryocytes is rather broad (from 41.6 to $195 \times 10^3/\text{mcl}$). This is due to specific stromal structure, location of hemopoietic foci on bone plates, patient's physiological specificity.

У детей и беременных аспираты наиболее богаты клеточными элементами, в то время как после 70 лет этот показатель снижается. Сопоставление результатов аспирата и трепанобиопсии помогает уточнить реальную клеточность костного мозга, так как в отдельных случаях при остеомиелосклерозе, волосатоклеточном лейкозе не всегда удается адекватно ее оценить.

Гиперклеточный костный мозг характерен для многих онкогематологических заболеваний (острые лейкозы, миелопролиферативные новообразования, лимфопролиферативные заболевания) и при использовании гемостимуляторов для лечения цитопенических состояний. Гипоплазии характерны для остеомиелофиброза, волосатоклеточного лейкоза, множественной миеломы. Снижение клеточности, как правило, наблюдается в процессе химио-лучевой терапии. Число миелокариоцитов может быть сниженным при метастазах в костный мозг, так называемая “пангемоцитопения”, описанная еще в 1970 г. И.А. Кассирским. Кроме того, уменьшение количества ядросодержащих элементов также может быть следствием разбавления аспирата периферической кровью, доказательством чему является увеличение доли зрелых нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов, отсутствие мегакариоцитов.

Для морфологического исследования мазки фиксируются методом Май-Грюнвальда и окрашиваются по Романовскому-Гимзе.

Анализ состава костного мозга проводят при микроскопии мазков аспирата при малом увеличении. При этом контролируются данные подсчета клеточности на анализаторе, определяется число мегакариоцитов, оценивается равномерность распределения клеток в препарате, наличие стустков костного мозга, выявляются скопления макрофагов, плазматических клеток, остеобластов и остеокластов. На предмет наличия метастазов просматривают не менее 6 препаратов. Исследование при большом увеличении с иммерсией позволяет дать количественную оценку состава костного мозга, характеристику морфологических особенностей элементов миелоидных и лимфоидных линий. Существенной гарантией от ошибок является проведение анализа двумя морфологами с подсчетом не менее 250 клеток каждым. В случае расхождений данных проводится повторный пересчет.

При подсчете миелограммы учитывают элементы миело- и лимфопоэза. Морфологически выделяют миелоидные клетки гранулоцитарного (нейтрофильного, эозинофильного, базофильного), моноцитарного, эритроидного, мегакариоцитарного рядов и элементы лимфоидного ряда: лимфоциты и плазматические клетки. Всего в костном мозге различаются клетки 8 гемопоэтических линий.

Количественная оценка мегакариоцитов: сниженная, нормальная или повышенная выполняется визуально при малом увеличении.

В современных российских руководствах приняты показатели миелограмм здоровых людей, разработанные В.В. Соколовым и И.А. Грибовой в 1972 г. [6]. Они представлены в табл. 1.

Aspirates are rich in cellular elements in children and pregnant women, while individuals above 70 years of age present with lower cellularity. Comparison of aspirates and trepan biopsies allows a more accurate quantification of bone marrow cellularity, because this is sometimes difficult in cases with osteomyelosclerosis or hairy-cell leukemia. Hypercellular bone marrow is characteristic of many hematological malignancies (acute leukemia, myeloproliferative or lymphoproliferative lesions) and use of hemostimulants in the treatment of cytopenic conditions. Hypoplasia is common for osteomyelofibrosis, hairy-cell leukemia, multiple myeloma. Cellularity as a rule decreases during chemoradiotherapy. Myelokaryocyte count may be low in cases with bone marrow metastases, so called "panhemocytopenia" described I.A. Kassirsky in 1970. Decreased number of nucleated elements may also result from aspirate dilution with peripheral blood as evidenced by increased fraction of mature neutrophils, monocytes and lymphocytes, absence of megakaryocytes.

The smears undergo May-Grünvald fixation and Romanovsky-Giemsa staining for morphological study.

Bone marrow composition is analyzed by microscopy of aspiration smears at a low magnification. The analysis includes control of cellularity using a cell analyzer, quantification of megakaryocytes, evaluation of cell distribution, detection of bone marrow clots, macrophage clusters, plasmatic cells, osteoblasts and osteoclasts. At least 6 specimens should be analyzed to detect metastases. Study at a high magnification with immersion results in quantification of bone marrow composition, characterization of morphological features of myeloid and lymphoid elements. To minimize errors the analysis is done by 2 morphologists with each counting at least 250 cells. In case of differences in their findings the count is repeated.

The myelogram includes myelo- and lymphopoietic elements. By morphology investigators distinguish cells of granulocyte (neutrophils, eosinophils, basophils), monocyte, erythroid and megakaryocyte lineages, as well as lymphoid elements such as lymphocytes and plasma cells. As a whole 8 hemopoietic lineages are distinguished in bone marrow.

Megakaryocyte count is classified as decreased, normal or increased by visual inspection at a small magnification.

Current Russian guidelines use healthy people myelograms as proposed by V.V. Sokolov and I.A. Gribova in 1972 [6]. They are shown in table 1.

Таблица 1

Результаты исследования стеральных пунктатов у 30 здоровых лиц.

Показатели миелограммы	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm 1,5\sigma$
Абсолютное содержание клеток в пунктате	110 400 $\pm$ 11 480	25 800 – 195 000
Ретикулярные клетки	0,85 $\pm$ 0,065	0,33 – 1,37
Гемогистиобласты	0,13 $\pm$ 0,031	0 – 0,38
Бласты %	0,69 $\pm$ 0,057	0,22 – 1,15
Промиелоциты %	1,9 $\pm$ 0,197	0,3 – 3,5
Миелоциты %	10,6 $\pm$ 0,345	7,75 – 13,45
Метамиелоциты %	11,3 $\pm$ 0,317	8,7 – 13,9
Палочкоядерные нейтрофилы %	19,5 $\pm$ 0,580	14,73 – 24,27
Сегментоядерные нейтрофилы %	17,8 $\pm$ 0,65	12,55 – 23,05
Индекс созревания нейтрофилов	0,63 $\pm$ 0,024	0,45 – 0,81
Сумма гранулоцитов %	61,8 $\pm$ 0,86	54,75 – 68,65
Эозинофилы %	3,4 $\pm$ 0,331	0,7 – 6,10
Базофилы %	0,3 $\pm$ 0,052	0 – 0,72
Моноциты %	2,0 $\pm$ 0,151	0,75 – 3,25
Лимфоциты %	7,6 $\pm$ 0,619	2,5 – 12,70
Плазмциты %	1,2 $\pm$ 0,105	0,35 – 2,05
Пронормобласты %	0,5 $\pm$ 0,054	0,07 – 0,93
Базофильные нормобласты %	3,4 $\pm$ 0,209	1,75 – 5,05
Полихроматофильные нормобласты %	13,6 $\pm$ 0,532	9,25 – 17,95
Оксифильные нормобласты %	3,0 $\pm$ 0,249	0,96 – 5,04
Индекс созревания нормобластов	0,78 $\pm$ 0,008	0,72 – 0,82
Сумма нормобластов	21,1 $\pm$ 0,73	15,1 – 27,10
Лейко-эритробластическое отношение	3,25 $\pm$ 0,16	1,95 – 4,55

Сопоставление результатов исследования миелограмм здоровых людей, полученных разными исследователями, свидетельствует об определенных различиях в получаемых данных. Не всегда указываются принципы определения пределов нормальных колебаний (принимаются либо минимальные и максимальные показатели, либо данные в пределах $\bar{x} \pm 1,5\sigma$ или $\bar{x} \pm 2\sigma$). За прошедшие 40 лет изменилась гистогенетическая характеристика ряда клеток, исчезли из гематологической номенклатуры такие термины как ретикулярные клетки, гемогистиобласты, введено понятие «бласт». Современная миелограмма несколько трансформировалась [10]. Образец миелограммы, принятый в Российском онкологическом центре им. Н.Н. Блохина, представлен в табл. 2

Table 1

Sternal puncture biopsy findings in 30 healthy donors.

Myelogram parameters	$x \pm m$	$x \pm 1,5\sigma$
Absolute cell count in puncture biopsies	110 400 $\pm$ 11 480	25 800 – 195 000
Reticular cells	0.85 $\pm$ 0.065	0.33 – 1.37
Hemohistioblasts	0.13 $\pm$ 0.031	0 – 0.38
Blasts, %	0.69 $\pm$ 0.057	0.22 – 1.15
Promyelocytes, %	1.9 $\pm$ 0.197	0.3 – 3.5
Myelocytes, %	10.6 $\pm$ 0.345	7.75 – 13.45
Metamyelocytes, %	11.3 $\pm$ 0.317	8.7 – 13.9
Stab neutrophils, %	19.5 $\pm$ 0.580	14.73 – 4.27
Segmented neutrophils, %	17.8 $\pm$ 0.65	12.55 – 23.05
Neutrophil maturation index	0.63 $\pm$ 0.024	0.45 – 0.81
Granulocyte total, %	61.8 $\pm$ 0.86	54.75 – 68.65
Eosinophils, %	3.4 $\pm$ 0.331	0.7 – 6.10
Basophils, %	0.3 $\pm$ 0.052	0 – 0.72
Monocytes, %	2.0 $\pm$ 0.151	0.75 – 3.25
Lymphocytes, %	7.6 $\pm$ 0.619	2.5 – 12.70
Plasmocytes, %	1.2 $\pm$ 0.105	0.35 – 2.05
Pronormoblasts, %	0.5 $\pm$ 0.054	0.07 – 0.93
Basophilic normoblasts, %	3.4 $\pm$ 0.209	1.75 – 5.05
Polychromatophilic normoblasts, %	13.6 $\pm$ 0.532	9.25 – 17.95
Oxyphilic normoblasts, %	3.0 $\pm$ 0.249	0.96 – 5.04
Normoblast maturation index	0.78 $\pm$ 0.008	0.72 – 0.82
Normoblast total	21.1 $\pm$ 0.73	15.1 – 27.10
Leukoerythroblast ratio	3.25 $\pm$ 0.16	1.95 – 4.55

Results of study of healthy people myelograms by different investigators demonstrate certain differences. Criteria for establishing normal ranges are not always clear (whether minimal and maximal values or $x \pm 1,5\sigma$ or $x \pm 2,5\sigma$ are used). Over the past four decades there were certain changes in histogenetic characterization of some cells, several terms such as “reticular cells”, “hemohistioblastoma” were excluded from hematology nomenclature while the term “blast” was introduced. The currently used myelogram also demonstrates some transformation [10]. Table 2 shows a myelogram sample as used in the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.

Таблица 2

Миелограмма

Абс. сод. миелокариоцитов		× 10 ⁹ /мкл (41,6–195)		Мегакариоциты в препарате	
Бласты		0,2 – 0,6			
Гранулоцитарный росток					
Промиелоциты	1,0 – 4,1				
	нейтроф		эозиноф		базофил
Миелоциты	7,0 – 12,2		0 – 1,0		0
Метамиелоциты	8,0 – 15,0		0 – 1,2		0
Палочкоядерные	12,8 – 23,7		0,1 – 1,2		0
Сегментоядерные	13,1 – 24,1		0,4 – 2,4		0 0 – 0,4
Сумма гранулоцитов			57,1 – 66,5		
Индекс созревания нейтрофилов			0,5 – 0,9		
Моноцитарный росток					
Монобласты	0				
Промоноциты	0				
Моноциты	0,7 – 3,1				
Лимфоидный росток					
Лимфоидные клетки	0		Плазмобласты	0	ВКЛ
Пролимфоциты	0		Проплазмocyты	0	0
Лимфоциты	4,3 – 13,7		Плазмат. клетки	0,1 – 1,8	
Эритроидный росток					
Пронормобласты			0,2 – 1,1		
Нормобласты базофильные			1,4 – 4,6		
Нормобласты полихроматофильные			8,9 – 16,9		
Нормобласты оксифильные			0,8 – 5,6		
Сумма клеток эритроидного ряда			14,5 – 26,5		
Индекс созревания эритроидных клеток			0,7 – 0,9		
Лейко-эритробластическое соотношение			2,1 – 4,5		

Самые ранние клетки в миелограмме обозначаются как бласты. Их отличительными признаками являются нежная структура хроматина и наличие нуклеол. В норме бласты морфологически сходны и не подразделяются по их линейной принадлежности. В нормальной миелограмме они составляют 0,2–0,6%. Увеличение доли бластов до 20% дает основание заподозрить МДС, более 20% позволяет диагностировать ОЛ, БК МПН. Характеристика бластов в обязательном порядке должна базироваться на результатах морфоцитохимического и иммунофенотипического исследований, дополненных цитогенетическими и молекулярно-биологическими данными. Комплексный анализ позволяет диагностировать гемобластозы и характеризовать варианты ОЛ.

Table 2

A myelogram example.

Abs myelokaryocyte count	× 10 ⁹ /mcl (41.6 – 195)	Megakaryocytes in the specimen		
Blasts	0.2 – 0.6			
Granulocyte pool				
Promyelocytes	1.0 – 4.1			
	neutroph.	eosinoph.		basoph.
Myelocytes	7.0 – 12.2	0 – 1.0	0	
Metamyelocytes	8.0 – 15.0	0 – 1.2	0	
Stab	12.8 – 23.7	0.1 – 1.2	0	
Segmented	13.1 – 24.1	0.4 – 2.4	0	0 – 0.4
Granulocyte total		57.1 – 66.5		
Neutrophil maturation index		0.5 – 0.9		
Monocyte pool				
Monoblasts	0			
Promonocytes	0			
Monocytes	0.7 – 3.1			
Lymphoid pool				
Lymphoid cells	0	Plasmoblasts	0	Hairy cells
Prolymphocytes	0	Proplasmocytes	0	0
Lymphocytes	4.3 – 13.7	Plasmatic cells	0.1 – 1.8	
Erythroid pool				
Pronormoblasts		0.2 – 1.1		
Normoblasts, basophilic		1.4 – 4.6		
Normoblasts, polychromatophilic		8.9 – 16.9		
Normoblasts, oxyphilic		0.8 – 5.6		
Erythroid cell total		14.5 – 26.5		
Erythroid cell maturation index		0.7 – 0.9		
Leukoerythroblast ratio		2.1 – 4.5		

Blasts are the earliest cells in the myelogram. They are characterized by tender chromatin structure and the presence of nucleoli. Normal blasts are morphologically similar and are not subdivided with respect to lineage. Blasts are normally 0.2 to 0.6%. Increase in blast fraction up to 20% suggests MDS, blast fraction above 20% is indicative of AL or blast crisis of MPN. Blast characterization should always be based on morphocytochemical and immunophenotypic findings supplemented with cytogenetic and molecular biological data. Comprehensive analysis helps to diagnose hematology malignancies and to characterize AL types.

В редких случаях бластоз в миелограмме не связан с опухолевой пролиферацией. Он констатируется у новорожденных детей с болезнью Дауна, при резус-конфликтах, при мониторинге пациентов, выходящих из глубокой цитопении.

Гранулопоэз

Среди элементов гранулоцитарной линии различают элементы трех типов: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы. В своем созревании в костном мозге они проходят идентичные стадии от миелобласта до зрелых форм. Сумма клеток гранулоцитарного ряда в норме колеблется от 57,1 до 66,5%. Индекс созревания нейтрофилов равен отношению суммы молодых форм (промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов) к зрелым (палочкоядерным и сегментоядерным). В норме он равен 0,6–0,8. Его увеличение при гипер- и нормоклеточном костном мозге говорит о пролиферации молодых форм нейтрофилов, что наблюдается при МПН, или о задержке созревания в процессе цитостатической терапии. Уменьшение индекса обычно наблюдается при гипоклеточном костном мозге, выражается в снижении числа молодых и увеличении зрелых форм из-за разведения периферической кровью.

Расширение гранулоцитарного ряда в костном мозге в сочетании с лейкоцитозом, как правило, является следствием либо опухолевой пролиферации нейтрофильного клона при ХМЛ, либо септических процессов различной этиологии. В первом случае диагноз основывается на цитогенетических и/или молекулярно-биологических данных. Наличие Ph-хромосомы и/или BCR-ABL 1 гена дает основание для диагноза ХМЛ. В редких случаях отсутствия генетических маркеров диагностируется хронический нейтрофильный лейкоз или атипичный хронический миелоидный лейкоз.

Наряду с количественной, важную роль играет характеристика морфологических особенностей гранулоцитов, выявление признаков дизгранулопоэза. Оценивается размер нейтрофилов, форма ядер, структура хроматина и особенности зернистости в цитоплазме. Обнаружение пельгеровских или пельгероидных клеток дает основание для проведения дифференциального диагноза между врожденной аномалией гранулоцитов и неоплазией миелопоэза, как правило, МДС и ОМЛ. Наличие гигантских форм нейтрофилов может свидетельствовать о нарушении гранулоцитопоэза в процессе химиотерапии или дефиците витамина В₁₂.

Клональная пролиферация гранулоцитов и моноцитов с признаками миелодисплазии в костном мозге является основанием для диагностики хронического миеломоноцитарного лейкоза.

Увеличение числа эозинофилов в миелограмме более 6% может носить клональный или реактивный характер. В первом случае диагностируется либо хронический эозинофильный лейкоз (без специфических признаков), либо миелоидная или лимфоидная неоплазия с аномальной перестройкой PDGFRA, PDGFRB или FGFR1[11].

In rare cases blastosis by the myelogram is not associated with neoplastic proliferation. It is found in newborns with Down's disease, in patients with rhesus conflict and those recovering from severe cytopenia.

Granulopoiesis

There are 3 types of cells within the granulocyte lineage, i.e. neutrophils, eosinophils and basophils. During maturation in bone marrow they pass similar stages from myeloblasts to mature forms. Granulocytes are normally 57.1 to 66.5%. Neutrophil maturation index is a ratio of young (promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes) to mature (stab and segmented) forms. Normal index is 0.6 to 0.8. Its increase in hyper- or normocellular bone marrow is indicative of proliferation of young neutrophils as seen in MPN or retarded maturation during cytostatic therapy. The index usually decreases in hypocellular bone marrow, reflects a fall in young and a rise in mature forms due to blood dilution.

Enlargement in granulocyte lineage in bone marrow associated with leucocytosis as a rule is evidence of either neutrophil clonal neoplastic proliferation in CML or septic processes of various origins. In the former case the diagnosis is based on cytogenetic and/or molecular biological data. The presence of Ph chromosome and/or *BCR-ABL 1* gene is characteristic of CML. In rare cases when genetic markers are lacking the diagnosis is chronic neutrophil leukemia or atypical chronic myeloid leukemia.

Characterization of morphological features of granulocytes and detection of signs of dysgranulopoiesis plays an important role. It involves determination of neutrophil size, shape of the nuclei, chromatin structure and granularity in cytoplasm. The presence of Pelger or pelgeroid cells necessitates differentiation between inborn granulocyte abnormality and myelopoietic neoplasia, as a rule, MDS or AML. The presence of giant neutrophils suggests disorder in granulocytopoiesis during chemotherapy or due to vitamin B₁₂ deficiency.

Granulocyte and monocyte clonal proliferation with signs of myelodysplasia in bone marrow is indicative of chronic myelomonocytic leukemia.

Eosinophil rise above 6% in the myelogram may be clonal or reactive. In the former case the diagnosis is either chronic eosinophilic leukemia (no specific features) or myeloid/lymphoid neoplasia with abnormal rearrangement PDGFRA, PDGFRB or FGFR1 [11].

Кроме того, у онкологических больных может быть констатирован либо идиопатический гиперэозинофильный синдром с реактивной эозинофилией, либо паранеопластическая эозинофилия при Т-клеточной лимфоме, лимфоме Ходжкина, мастоцитозе, остром лимфобластном лейкозе и ряде МПН. Причиной реактивной эозинофилии могут быть аллергические болезни, гельминтозы, дерматиты различной этиологии.

Сумма нормобластов в костном мозге в норме составляет 14,5–26,5%. По данным В. Bain [12] у мужчин число нормобластов в костном мозге достоверно выше, чем у женщин (28,1 к 22,5%). Индекс созревания красного ряда составляет 0,8–0,9 и определяется отношением суммы полихроматофильных и оксифильных нормобластов к общему количеству всех нормобластов. Снижение индекса свидетельствует об увеличении числа молодых нормобластов. Наиболее частой причиной является анемия из-за дефицита витамина В12 или фолатов. Однако подобная ситуация может ассоциироваться с пролиферацией неопластических клеток красного ряда при остром эритроидном лейкозе или МДС.

Редукция красного ростка в костном мозге часто констатируется в онкологической практике [13]. Она может быть следствием метастазирования опухолевых клеток в костный мозг и является постоянным симптомом подавления кроветворения в процессе химио- и лучевой терапии.

Характеристика элементов красного ряда костного мозга включает многочисленные параметры оценки ядер и цитоплазмы нормобластов, в том числе – размер клеток, структура ядерного хроматина и формы ядер, равномерность окраски цитоплазмы, содержания железа. При дизэритропоэзе обнаруживаются большие клетки, с мегалобластной структурой хроматина, многоядерные формы, диссоциация созревания ядер и цитоплазмы, межъядерные мостики. Все эти признаки патогномоничны для МДС и эритромиелоза.

В норме у отдельных доноров в костном мозге в единичных нормобластах могут быть выявлены признаки дисплазии: двуядерность нормобластов, межъядерные мостики, вакуолизация и недостаточная гемоглобинизация цитоплазмы. Однако число подобных клеток не превышает 7% [12].

Показателем неэффективности эритропоэза является увеличение числа сидерофильных гранул в нормобластах, образующих венчик вокруг ядра. Количество кольцевых сидеробластов более 15% дает основание диагностировать рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами (МДС РАКС).

Количество мегакариоцитов в костном мозге в норме может значительно варьировать. Их число на щетке мазка может колебаться от 7 до 50.

Снижение числа мегакариоцитов и тромбоцитов может быть следствием метастатического поражения костного мозга, ятрогенного воздействия химио и/или лучевого лечения, лейкемической трансформации гемопоэза при ОЛ, продукции антитромбоцитарных антител – в частности, при ЛПЗ.

Besides, cancer patients may have either idiopathic hypereosinophilic syndrome with reactive eosinophilia or paraneoplastic eosinophilia in T-cell lymphoma, Hodgkin's lymphoma, mastocytosis, acute lymphoblastic leukemia and some MDS types. The reactive eosinophilia may be caused by allergic reactions, helminthosis, dermatitis of various origin.

Bone marrow normoblasts normally total 14.5 to 26.5%. According to B. Bain bone marrow normoblast count in men is significantly higher than in women (28.1 vs. 22.5%) [12]. Maturation index for red cells is defined as ratio of the total of polychromatophilic and oxyphilic normoblasts to the total of all normoblasts and reaches 0.8 to 0.9. The lower the index the higher the number of young normoblasts. Anemia due to vitamin B₁₂ or folate deficiency is the commonest cause. However this situation may be associated with proliferation of neoplastic erythroid cells in cases with acute erythroid leukemia or MPN.

Reduced bone marrow red cell pool is often seen in cancer patients [13]. This condition may be caused by tumor cell metastasis to bone marrow and is a common symptom of hemopoiesis suppression during chemo- and radiotherapy.

Characterization of erythroid elements in bone marrow involves multiple parameters of the normoblast nucleus and cytoplasm including cell size, nuclear chromatin structure and nucleus shape, even distribution of color in cytoplasm, iron content. Dyserythropoiesis is associated with the presence of large cells, megaloblast chromatin structure, multinuclear cells, dissociation of the nucleus and cytoplasm maturation, internuclear bridges. All these signs are characteristic of MDS and erythromyelosis.

Some donors may normally present with isolated normoblasts demonstrating signs of dysplasia such as double-nuclear normoblasts, vacuoles and lack of hemoglobin in cytoplasm. However these cells are not more than 7% [12].

Deficient erythropoiesis often manifests itself by increase in siderophilic granules in normoblasts that form a ring around the nucleus. A fraction of ring sideroblasts more than 15% is evidence of refractory anemia with ring sideroblasts.

Megakaryocytes in bone marrow may normally vary in number. In smear samples the variation may be from 7 to 50.

Decrease in megakaryocytes and platelets may be due to bone marrow metastasis, iatrogenic effect of chemo- and/or radiotherapy, leukemic hemopoiesis transformation in AL, production of anti-platelet antibodies in LPD.

Высокий тромбоцитоз в крови и мегакариоцитоз в КМ с выраженной морфологической дисплазией ассоциируется с наличием хромосомной аномалии 3(q21;q26), что наблюдается при ОМЛ и МДС. Дизмегакариоцитопоз выражается в наличии мелких одноядерных форм и клеток с разьединенными ядрами [14].

Оценка миелограммы включает использование вспомогательных расчетных индексов. Соотношение показателей процентного содержания гранулоцитарного и эритроидного ростков (лейко-эритробластическое отношение) составляет в норме 2,1–4,5. Увеличение этого показателя при нормо- и гиперклеточном костном мозге связано с гиперплазией белого ростка. Увеличение числа нейтрофилов с одной стороны может быть реакцией на бактериальную инфекцию или на неопластический процесс при ЛХ, с другой – иметь опухолевый генез. Расширение гранулоцитарного ростка – характерный симптом ХМЛ.

Уменьшение лейко-эритробластического отношения при нормо- и гиперклеточном костном мозге является следствием абсолютного расширения красного ростка и сужении гранулоцитарного ряда. Эта ситуация специфична для анемий различной этиологии (В₁₂- и фолат-дефицитной, гемолитической, при хронических заболеваниях), а также для острого эритромиелоза и МДС.

При гипоклеточном костном мозге снижение лейко-эритробластического индекса свидетельствует о значительной редукции гранулоцитарного ростка у онкологических больных в процессе терапии и при агранулоцитозе.

Отдельную проблему при оценке миелограммы представляет анализ числа лимфоцитов. В норме их количество колеблется существенно – от 4,3 до 13,7%. Это связано с тем, что при частичном разведении пунктатов периферической кровью число лимфоцитов увеличивается до пограничных и более цифр. В определенной степени число лимфоцитов может служить показателем наличия примеси крови в аспирате, так как широкие границы клеточности костного мозга в норме не всегда дают возможность судить об этом, с другой стороны лимфоцитоз костного мозга ассоциируется с инвазией неопластическими клетками при ЛПЗ.

Судя по данным литературы, оценка числа лимфоцитов в аспирате нормального костного мозга в разных работах варьирует значительно. В табл. 3 представлены показатели доли лимфоцитов в нормальной миелограмме отечественных и зарубежных исследователей за разные годы. В большинстве работ оценка числа миеелокариоцитов проводилась визуально и только в двух отечественных работах подсчитывались точные показатели. В то же время отдельные авторы акцентируют внимание на минимальном объеме исследованного аспирата для избежания разведения периферической кровью.

Как видно из табл. 3, среднее число лимфоцитов в костном мозге в норме колеблется у разных авторов от 7,5 до 18%. Значительные различия определяются как в нижних границах нормы (1,2–11%), так и в верхних (8,4–35%). Таким образом, до настоящего времени нет убедительных данных о числе лимфоцитов, специфичных только для костномозговой ткани. Проблема истинного состава костного мозга без разведения остается до последнего времени нерешенной.

High blood thrombocytosis and bone marrow megakaryocytosis with marked morphological dysplasia are associated with chromosomal aberration 3(q21;q26) characteristic of AML and MDS. Dysmegakaryocytopoiesis is manifested by the presence of small uninucleate cells with disintegrated nuclei [14].

Myelogram interpretation involves use of supplementary indices. Ratio of percentages of granulocyte and erythroid blasts (leukoerythroblast ratio) is normally 2.1 to 4.5. Increase in this parameter in normo- or hypercellular bone marrow is associated with hyperplasia of white cells. Increased neutrophil count may, on the one hand, be a reaction to bacterial infection or neoplastic process in Hodgkin's lymphoma, or, on the other hand, result from tumor development. Enlarged granulocyte pool is a characteristic sign of CML.

Decrease in leukoerythroblast ratio in normo- or hypercellular bone marrow is due to absolute enlargement in the erythroid and narrowing of the granulocyte pools. This situation is specific of anemias of various origin (B_{12} - and folate-deficient, hemolytic anemia, chronic conditions), and of acute erythromyelosis and MDS.

Decrease in leukoerythroblast ratio in hypocellular bone marrow is evidence of a considerable reduction in granulocyte pool in cancer patients on therapy or in agranulocytosis.

Analysis of lymphocyte count is a special problem in myelogram interpretation. Normally these cells are 4.3 to 13.7%. This is because the number of lymphocytes increases to maximum levels or higher due to dilution of specimens with peripheral blood. Lymphocyte count may to a certain degree be indicative of blood admixture, because the broad ranges of bone marrow cellularity may not always allow correct judgment, on the other hand, bone marrow lymphocytosis is associated with invasion of neoplastic cells in LPD.

Normal lymphocyte ranges in bone marrow aspirates are differently assessed by different authors. Table 3 summarizes lymphoid fractions in normal myelogram as proposed by Russian and foreign investigators. In most publications myelokaryocyte count was determined by visual inspection, while exact numbers were given in 2 Russian papers only. At the same time some authors focus on minimal amount of specimens to avoid dilution.

As seen in table 3, mean number of lymphocytes in bone marrow normally ranges from 7.5 to 18%. Considerable differences are seen both in the lower (1.2 to 11%) and the upper (8.4 to 35%) normal limits. So, there are no definite data about the number of lymphocytes specific of bone marrow only. The problem of true bone marrow composition free from dilution has to be solved yet.

Таблица 3

Количество лимфоцитов в костном мозге в норме

Авторы	Год	п иссл.	Пол	Воз- раст (годы)	V пунктата (мл)	Клеточ- ность $\times 10^9/\text{л}$	Лимфоциты %
[15]	1941	28	М, ж	20–29	$\leq 0,5$	–	14,6 (6,7–22,5)
[16]	1935	52	м	20–30	0,2	–	16,8 (7,2–26,3)
		40	ж	20–30	3,0	–	18,1 (10,5–25,7)
[17]	1947	50	М, ж	17–45	–	–	16,2 (7,5–26,5)
[18]	1974	12	м	>18	0,1–0,2	–	16,2 8,6–23,8)
[12]	1996	50	М, ж	21–56	–	–	13,1 (6–20)
[19]	1996	67	М, ж	>18	–	–	16,1 (6,0–26,2)
[9]	–	–	М, ж	>18	–	–	16,2 (11–23)
[10]	2002	–	М, ж	>18	–	118,4 (41,6–195,0)	9,0 (4,3–13,7)
[1]	1938	–	М, ж	>18	–	–	10–13
[2]	1940	–	М, ж	>18	–	–	1,2–11,5
[3]	1941	–	М, ж	>18	–	–	4,0–19,8
[4]	1951	–	М, ж	>18	–	–	2,9–10
[20]	1952	–	М, ж	>18	–	–	4,0–8,4
[21]	1954	–	М, ж	>18	–	–	7,50 (2,5–15)
[22]	1997	–	М, ж	>18	–	50–250	1,2–11,5
[23]	1960	–	М, ж	>18	–	–	14 (4,0–35,0)

Table 3

Normal bone marrow lymphocyte count

Au- thors	Year	No. of stud- ies	Gen- der	Age, years	Punctate volume, ml	Cellularity, $\times 10^9/l$	Lymphocytes, %
[15]	1941	28	m, f	20 – 29	≤ 0.5	–	14.6 (6.7 – 22.5)
[16]	1935	52	m	20 – 30	0.2	–	16.8 (7.2 – 26.3)
		40	f	20 – 30	3.0	–	18.1 (10.5 – 25.7)
[17]	1947	50	m, f	17 – 45	–	–	16.2 (7.5 – 26.5)
[18]	1974	12	m	>18	0.1 – 0.2	–	16.2 (8.6 – 23.8)
[12]	1996	50	m, f	21 – 56	–	–	13.1 (6 – 20)
[19]	1996	67	m, f	>18	–	–	16.1 (6.0 – 26.2)
[9]			m, f	>18	–	–	16.2 (11 – 23)
[10]	2002	–	m, f	>18	–	118.4 (41.6 – 195.0)	9.0 (4.3 – 13.7)
[1]	1938		m, f	>18	–	–	10 – 13
[2]	1940		m, f	>18	–	–	1.2 – 11.5
[3]	1941		m, f	>18	–	–	4.0 – 19.8
[4]	1951		m, f	>18	–	–	2.9 – 10
[20]	1952		m, f	>18	–	–	4.0 – 8.4
[21]	1954		m, f	>18	–	–	7.50 (2.5 – 15)
[22]	1997	–	m, f	>18	–	50 – 250	1.2 – 11.5
[23]	1960	–	m, f	>18	–	–	14 (4.0 – 35.0)

Самостоятельную клиническую проблему представляет диагностика вторичных МДС, ОМЛ и МПН у пациентов различными опухолевыми заболеваниями, получавших ранее химио- или лучевую терапию. Характерными признаками вторичного гемобластоza являются выраженная дисплазия гранулоцитов, нормобластов и мегакариоцитов, наличие бластов в аспирате костного мозга и отпечатках трепанобиоптата. Время возникновения второго заболевания колеблется в широких пределах и зависит от характера проводимого лечения. Риск возникновения гемобластоza прямо пропорционален стадии первичной опухоли и обратно возрасту больных. Так, при РМЖ степень риска колеблется от 1,87 при I до 5,66 при III стадии и последовательно снижается от 10,6 в возрасте 20 – 49 лет до 1,28 старше 75 [25]. Изменение схем лечения уменьшает степень риска лейкоза. Так при неходжкинской лимфоме режим ABVD снизил риск по сравнению с COPP с 3,4 до 0,7% [26], а ограничение дозы алкилирующих агентов при неоплазиях уменьшило число вторичных лейкозов с 5,7 до 0,3% [27].

Поиск метастазов в костном мозге при рутинном морфологическом исследовании аспирата, отпечатка трепанобиоптата и собственно трепаната имеет относительно низкую диагностическую ценность. Показано, что у больных РМЖ с прижизненным отсутствием метастазов на аутопсии они выявляются в 80% случаев [28].

В настоящее время усилия диагностов направлены на использование методов иммунохимии, ПЦР, проточной цитометрии для выявления не только комплексов, но и изолированных опухолевых клеток (ИОК) в костном мозге [29]. Так, у больных РМЖ, при стандартном методе исследования которых метастазы отсутствовали, по данным ПЦР обнаруживались у 52% с II стадией заболевания, у 57% с III и у 82% с IV. В работе О.Б. Бжадуг при иммуноцитологическом исследовании метастазы выявлялись у 40% больных РМЖ в I стадии, у 50–60% во II, у 60% в III и у 62,5% в IV [30]. Показано, что микрометастазы выявляются существенно чаще (45,3%) при использовании МКА к эпителиальным клеткам, чем при обычном цитологическом исследовании (3,77%) [31]. Рекомендуется при обследовании пациенток на ранних стадиях болезни использовать иммуноцитологический подход для уточнения степени распространенности процесса.

Многообразие методических подходов к поиску раковых клеток значительно расширило границы диагностических возможностей. С помощью проточной цитометрии выявляется одна ИОК с частотой на 100 000 клеток, а при исследовании с ПЦР – одна на 20 000 000 клеток. Результаты проведенных исследований оказались клинически значимыми для прогнозирования течения болезни. Так, установлена достоверно большая выживаемость ИОК⁻ больных РМЖ, раком толстой кишки, желудка по сравнению с пациентами ИОК⁺. Однако патогенетические механизмы переноса раковых клеток в костный мозг и формирование метастатических очагов остаются недостаточно ясными и являются в настоящее время задачей для многочисленных исследований.

The diagnosis of secondary MDS, AML and MPN in cases with various tumors receiving previous chemo- or radiotherapy is a separate problem. Secondary hematology malignancies are characterized by marked dysplasia of granulocytes, normoblasts and megakaryocytes, the presence of blasts in bone marrow aspirates and trepan biopsy smears. Time to development of the second disease varies greatly and depends on type of previous therapy. The risk of the second tumor is directly correlated with stage of the primary and inversely correlated with patient age. For instance, in breast cancer the risk is from 1.87 for stage I to 5.66 for stage III and decreases gradually from 10.6 for patients aged 20 to 49 years to 1.28 for those above 75 years of age [25]. Improvement in treatment schedules decreases the risk of leukemia. For instance, use of ABVD schedule instead of COPP reduced the risk from 3.4% to 0.7% in non-Hodgkin's lymphoma [26], and limited use of alkylating agents in neoplasia resulted in a decrease in incidence of second leukemia from 5.3 to 0.3% [27].

Search for bone marrow metastasis by routine morphological study of aspirates, trepan biopsy smears or trepan biopsies is but of limited diagnostic value. It is shown that post mortem examination discovered metastases in 80% of breast cancer cases free from metastases by biopsy [28].

The investigators currently focus their effort on utilization of immunochemistry, PCR, flow cytometry to detect both clusters of and ITC in bone marrow [29]. For instance, in breast cancer free from metastasis by standard study the portion of metastasis-positive cases by PCR reaches 52% for stage II, 57% for stage III and 82% for stage IV. According to Bzhadug [30] rates of immunocytological detection of metastasis from breast cancer are 40% in stage I, 50 to 60% in stage II, 60% in stage III and 62.5% in stage IV. Micrometastasis is detected much more frequently (45.3%) by analysis with MAB to epithelial cells than by standard cytology (3.77%) [31]. It is recommended to use immunocytological approach when examining patients with early cancer to make a more accurate assessment of disease extent.

Use of multiple methodologies for detection of cancer cells has enlarged considerably potentials of the diagnosis. Flow cytometry can detect a single ITC per 100 000 cells, while PCR capacity is 1 per 20 000 000 cells. The results are of clinical significance for the prognosis of disease course. Survival of ITC-negative as compared to ITC-positive patients is significantly higher in breast, colonic and gastric cancers. However pathogenetic mechanisms of cancer cell transition to bone marrow and development of bone marrow metastases are yet unclear and are addressed by multiple investigators.

Одним из разделов этих поисков является изучение минимальной резидуальной болезни у пациентов с ОЛ, множественной миеломой и ЛПЗ. Использование широкой палитры моноклональных антител в проточной цитометрии позволяет выявить минимальную пролиферацию опухолевых клеток в костном мозге, что позволяет скорректировать терапию и определить прогноз течения заболевания.

Таким образом, следует констатировать, что пункция и трепанобиопсия костного мозга являются важными диагностическими мероприятиями, информативность которых расширяется по мере внедрения новых высоко технологических подходов. Характеристика неоплазий миелоидного и лимфоидного ряда, обнаружение макро- и микро- метастатических очагов и изолированных опухолевых клеток позволяют индивидуализировать терапевтические подходы. Исследование костного мозга играет ведущую роль в изучении закономерностей диссеминации в организме неопластических клеток из первичного очага.

Minimal residual disease in AL, multiple myeloma and LPD is one of issues under study. Use of broad panels of monoclonal antibodies in flow cytometry helps to detect minimal proliferation of cancer cells in bone marrow for the clinician to make correct clinical decisions and prognosis of disease course.

In conclusion, bone marrow puncture and trepan biopsy are valuable diagnostic tools whose informative significance is increasing in parallel with implementation of novel high-technology approaches. Characterization of myeloid and lymphoid neoplasia, detection of macro- and micrometastasis and IST help to individualize therapy. Study of bone marrow plays the leading role in the understanding of mechanisms of tumor cells dissemination from the primary lesion.

Литература / Literature

1. *Аринкин М.И.* Клиническая медицина 1938; 16, 8.
1. *Arinkin M.I.* Clinical medicine 1938, 16, 8 (in russian)
2. *Алексеев Г.И.* Клин. Медицина 1952; 30, 1, 68.
2. *Alekseev G.I.* Clinical Medicine 1952; 30, 1, 68.(in russian)
3. *Фарбер В.В.* Клин. Медицина 1941; 19, 5:109–112
3. *Farber V.V.* Clinical Medicine 1941; 19, 5:109–112(in russian)
4. *Пунус А.Г.* Сов. Мед.1941; 9: 11
4. *Pinus A.G.* Soviet Medicine 1941; 9:11(in russian)
5. *Кассирский И.А., Алексеев Г.А.* Клиническая гематология. М. 1970.
5. *Kassirsky I.A., Alekseev G.A.* Clinical hematology. М 1970 (in russian).
6. *Соколов В.В., Грибова И.А.* Гематологические показатели здорового человека. Москва, “Медицина” 1972.

6. *Sokolov V.V., Gribova I.A.* Haematological parameters of a healthy person. Moscow 'Medicine' 1972 (in russian)
7. *Берензон Д.П., Колосков А.В., Тарасов В.А.* Поражение костного мозга при солидных опухолях. Гематология и трансфузиология 2000; 5:25–7
7. *Berenzon D.P., Koloskov A.V., Tarasov V.A.* Bone marrow involvement in solid tumors. Hematology and Blood Transfusion 2000; 5:25–7(in russian)
8. *Bain B.J., Clark D.M., Lampert I.A., Wilkins B.S.* Bone marrow pathology. 2001; 3th edn. Blackwell Science,
9. *Mazza J.* Manual of Clinical Hematology. 1994; Sec edn. Little, Brown and Company, Boston.
10. *Грибова И.А., Воробьев П.А.* Гематологическая норма. В руководстве по гематологии под ред. акад. А.И. Воробьева. 2002; т 1: 61–3.
10. *Gribova I.A., Vorobyev P.A.* Hematologic norm. The manual hematology edited by acad. A.I Vorobyev. 2002;V 1: 61–3(in russian).
11. World Health Organisation Classification of tumors. Press , Lyon, 2007.
12. *Bain B.J.* The bone marrow aspirate in healthy subjects . Br. J. Haematol., 1996; 94: 206–7
13. *Тимонина Е.Г., Френкель М.А., Колбацкая О.П., Подвизников С.О.* Характеристика гемопоэза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2009; 20, 3 :75–82
13. *Timonina E.G., Frenkel M.A., Kolbatskaya O.P., Podvyznikov S.O.* Characteristics of hematopoiesis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS 2009; 20, 3:75–82(in russian)
14. *Френкель М.А., Тупицын Н.Н., Волкова М.А., Кулагина О.Е., Флейшман Е.В.* Дисплазия мегакариоцитов костного мозга при ОМЛ: данные морфологических, цитохимических и цитогенетических исследований Экспер. Онкол.1996; 18, 3:262–7.
14. *Frenkel M.A., Tupitsyn N.N., Volkova M.A., Kulagina O.E., Fleishman E.V.* Dysplasia of bone marrow megakaryocytes in AML: morphological, cytochemical and cytogenetic studies Experimental Oncology 1996; 18, 3:262–7(in russian)
15. *Jacobsen R.V.* Untersuchungen uber das Knochenmarkspunktat bei normalen Individuen verschiedener Altersklassen. Acta med. Scand. 1941; 106: 417–46.
16. *Segerdahl E.* Ubersternalpunktionen. Acta Med Scand. 1935; 64 (Suppl): 1–105
17. *Vaughan S.L. and Brockmyr F.* Normal bone marrow as obtained by sternal puncture. Blood 1947; 1 (special issue): 54–9.
18. *Wintrobe M.M., Lee R.G., Boggs D.R. et al.* Clinical Hematology, 1974; 7th edn. Lea and Febiger, Philadelphia

19. *den Ottonlander G.J.* The bone marrow aspirate in healthy subjects. Br. J. Haematol, 1996; 95: 574–5.
20. *Владос Х.Х., Файнштейн Ф.Э.* Клин. мед. 1952; 30, 2, 33
20. *Vlados H.H., Feinstein F.E.* Clinical medicine 1952; 30, 2, 33(in russian)
21. *Opitz H., Weicker H.* Das Blut Biologishe Daten fur den Kinderartz. J. Springer Heidelberg, 1954.
22. *Юрковский О.И., Грицюк А.М.* Общеклинические анализы в практике врача М. 1997.
22. *Yurkovski O.I., Gritsyuk A.M.* Clinical analyzes in the practice M. 1997.(in russian)
23. *Тодоров Й.* Изд-во “Медицина и физкультура” София 1960.
23. *Todorov J.* Publ ‘Medicine and physical culture’ Sofia 1960 (in russian)
24. *Френкель М.А., Чигринова Е.В., Купрышина Н.А., Павловская А.И.* Диагностическое значение исследования отпечатков трепанобиоптатов костного мозга больных неходжкинскими лимфомами. Клин. лаб. диагностика 2007; 11: 44–8.
24. *Frenkel M.A, Chigrinova E.V, Kupryshina N.A, Pavlovskaya A.I.* Diagnostic value of trephine bone marrow biopsy imprints study patients with non-Hodgkin’s lymphomas. Clinical laboratory diagnostics 2007; 11: 44–8. (in russian).
25. *Kaplan H.G., Malmgren J.A., Li Ci G.S.* Age related risk of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia among breast cancer survivors. Breast Cancer Res. Treat. 2013; Dec ,142(3):629–36.
26. *Delwail V., Jais J.P., Colonna P., Andrieu J.M.* Fifteen-year secondary leukemia risk observed in 761 patients with Hodgkin s disease prospectively treated by MOPP or ABVD chemotherapy plus high-dose irradiation.Br.Haematol.2002; Jul; 118 (1): 189–94.
27. *Koontz M.Z., Horning S.J., Balise R. et al.* Risk of therapy-related secondary leukemia in Hodgkin lymphoma: the Stanford University experience over three generations of clinical trials. J.Clin Oncol. 2013; Feb 10;31(5):592–8.
28. *Mansi J.L., Godas H., Bills J.M. et al.* Outcome of primary –breast-cancer patients with micrometastases: a long term follow-up study. Lancet 1999; 17; 354 (9174): 197–202.
29. *Pantel K.* Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. J. Hemother. 1994; 3:165–73
30. *Бжадуз О.Б., Тупицын Н.Н., Тюлядин С.А.* Значение выявления микрометастазов в крови и костном мозге у больных раком молочной железы. Совр. Онкология 2004; 6 (4): 149–54

30. *Bzhadug O.B., Tupitsyn N.N., Tjulandin S.A.*, Value of micrometastases detection in blood and bone marrow of patients with breast cancer. Current Oncology 2004; 6 (4): 149–54(in russian)
31. *Krokina O.V., Lityagin V.P., Tupitsin N.N., Blindar V.N., Ermilova V.D.* Immunocytological diagnosis of micrometastatic bone marrow involvement in patients with breast cancer. Hematopoiesis immunology 2008 ; 1: 116.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Б. Брандо, А. Гатти

АНАЛИЗ НОРМАЛЬНОГО КОСТНОГО МОЗГА МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Лаборатория гематологии и центр переливания крови, больница Легано, Легано

Абстракт

Изучение структуры клеточных популяций нормального КМ человека имеет огромное значение для точной диагностики и правильной классификации гемобластозов. На основании относительного содержания определенных клеточных субпопуляций в КМ были определены многие патологические состояния, однако выявление субпопуляций, составляющих 5% и менее от общего числа клеток, представляет определенные трудности; еще одной проблемой является неприемлемо широкое расхождение результатов анализа, проведенного разными исследователями.

МПЦ суспензии аспиратов КМ представляет ценный инструмент цитоморфологического анализа, особенно в тех случаях, когда требуется выявить «неуловимые» типы клеток и определить их относительное содержание.

Однако цитоморфологический анализ мазков КМ и МПЦ суспензий клеток КМ не являются полностью перекрывающимися друг друга методиками, в связи с тем, что в последнем случае разбавление образца периферической кровью может существенно повлиять на концентрацию отдельных субпопуляций клеток КМ в образце и изменить соответствующее относительное содержание этих субпопуляций. Кроме того, некоторые типы клеток, например, плазмциты, могут слипаться, что затрудняет получение одноклеточной суспензии и приводит практически всегда к недооценке их концентрации при анализе методом МПЦ по сравнению с цитоморфологическим анализом мазков КМ. Тем не менее, МПЦ не имеет себе равных при качественном анализе сложных клеточных смесей. В тех случаях, когда необходимо определить степень созревания гематопозитических клеточных линий, оценить сложный состав бластов и клеток-предшественников, дифференцировать реактивный и злокачественный рост клеток, определить клеточный фенотип для оценки прогноза заболевания и сделать точный анализ минимального остаточного заболевания, исследователи выбирают МПЦ как метод непревзойденной точности, надежности и скорости.

МПЦ особенно хорошо подходит для оценки возрастоспецифических изменений клеточных субпопуляций нормального КМ, физиологической реакции КМ на воспалительные состояния или восстановление КМ после химиотерапии, а также для исследований популяции В-клеток.

В данной статье рассматриваются и критически обсуждаются вопросы применения МПЦ при исследовании типов клеток, определении их относительного содержания и структуры созревания в нормальном КМ, а также при иммунофенотипировании. Цель работы – анализ примеров, которые могут служить отправной точкой для комплексного изучения гемобластозов.

Bruno Brando and Arianna Gatti

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF NORMAL BONE MARROW

Haematology Laboratory and Transfusion Center, Legnano General Hospital

Key Words: Normal Bone Marrow, Multicolor Flow Cytometry, Immunophenotyping.

Abstract

The knowledge of the cellular population patterns of the normal human BM is of utmost importance in the precise diagnosis and correct classification of haematological malignancies. Many disease states are now defined according to specific frequencies of BM cell subset types, but human eye may be quite imprecise around 5% or less, and inter-observer variability can be unacceptably wide in many instances.

FCM analysis of the BM aspirate suspensions is a valuable tool to support the cytomorphologic assessment, especially when elusive cell types have to be identified and their frequency evaluated.

However, the cytomorphologic analysis of BM particle smears and the FCM evaluation of BM cell suspensions are not entirely overlapping techniques, since in the latter case the dilution by sinusoidal blood may modify remarkably the cellular concentration of BM cell subsets in the sample and change the respective actual cell frequencies. Moreover, certain cell types like Plasmacells are sticky and difficult to bring into a single-cell suspension, thus making their FCM evaluation almost invariably underestimated, as compared to cytomorphology of BM particle smears.

FCM is nevertheless unbeatable when the quality of complex cell mixtures is to be evaluated. The maturation patterns of haematopoietic cell lines, the complexity of BM blasts and precursor cells, the discrimination between reactive and malignant cell growth, the prognosis-related cell phenotypes and the accurate analysis of minimal residual disease are all managed by FCM with unsurpassed accuracy, reliability and speed.

The evaluation of age-related changes of normal BM cell populations and the physiological BM response to inflammatory states or post-chemotherapy recovery are particularly well suited to multicolor FCM analysis, and particularly useful in the study of B cell compartment.

In this review the normal BM cell types, frequencies and maturation patterns that can be evaluated by FCM and immunophenotyping analysis are described and critically discussed. The aim of the present review is to provide examples that may serve as a baseline reference in the complex and delicate study of haematological malignancies.

Введение

Непрерывная продукция зрелых клеток крови обеспечивается упорядоченным развитием гематопозитических линий в КМ. Для этого требуется кооперация костномозговых предшественников, цитокинов, хемокинов и А-клеток в высокоорганизованном микроокружении [1; 2]. Механизмы КМ должны быть готовы ответить на внешние стимулы, например, неожиданное повышение потребности в периферических клетках, инфекции, воздействие токсических веществ и химиотерапевтических препаратов. Кроме того, на протяжении жизни человека происходят значительные изменения характеристик клеток КМ [3].

В связи с этим «нормальность» клеточного состава КМ является довольно изменчивым понятием, которое должно учитывать влияние различных факторов.

В соответствии с многими клиническими руководствами цитоморфологическое исследование традиционно является «золотым стандартом» для определения клеточности КМ в целях диагностики и стадирования различных гемобластозов [4]. Однако при микроскопическом анализе и подсчете клеток возникают определенные трудности, связанные с высоким уровнем субъективности в интерпретации результатов, а также расхождением оценок у разных исследователей. Особенно трудно достичь приемлемого консенсуса при анализе популяций с низкой концентрацией (т.е. около 5% и менее), даже в тех случаях, когда диагноз не вызывает сомнения [5; 6]. ПЦ приобретает все более важное значение в анализе гемобластозов, благодаря скорости и высокой воспроизводимости результатов определения и количественной оценки разнообразных клеточных типов, даже в случае очень редких событий или наличия примесей огромного числа нерелевантных сопутствующих клеток [7]. Тем не менее, роль этого метода как альтернативы цитоморфологическому исследованию и даже более предпочтительного подхода по сравнению с визуальным микроскопическим анализом все еще оспаривается, при этом утверждается его применимость только для небольшого числа клинических состояний [8–10].

Для проведения цитоморфологического анализа аспиратов КМ требуется 2–3 мл суспензии первого забора в ЭДТА, из которой необходимо осторожно выделить частицы КМ и подготовить серию мазков на предметных стеклах. В настоящее время общепринятый стандарт надежного цитоморфологического анализа включает такие требования, как паноптическая окраска для дифференциального микроскопического подсчета не менее 500 ядросодержащих клеток и не менее 200 клеток миелоидной линии, окрашивание берлинской лазурью и цитохимическое окрашивание по необходимости [11; 12].

Для МПЦ-анализа гетерогенный образец КМ необходимо преобразовать в монодисперсную клеточную суспензию, предпочтительно механическими средствами. Неиспользованные остатки образцов объединяются с сопутствующей кровью, остаточные частицы подвергают дезинтеграции с использованием пипетки или нейлоновой сетки.

Introduction

The continuous production of mature blood cells is ensured by the orderly development of haematopoietic lineages in the bone marrow (BM). This requires the cooperation of BM precursors, cytokines, chemokines and accessory cells in a well regulated microenvironment [1; 2]. The BM machinery must be ready to respond to external stimuli, such as unexpected increases of peripheral cell demand, infections, insults from toxic or chemotherapeutic agents. Moreover, throughout human life BM cell features change remarkably with age [3].

Therefore 'normality' in the BM cell composition must be kept as a very flexible concept and must take into account the effects of a number of interfering factors.

According to many clinical guidelines, cytomorphology is kept as the traditional golden standard to obtain the required cell frequency values that assist the diagnosis and the definition of the clinical grading of different haematological diseases [4].

However, microscopic cell evaluation and counting is hampered by a high level of subjective interpretation and interobserver variability. Acceptable consensus may be particularly difficult to obtain especially when low cell frequencies (i.e. around 5% or less) have to be evaluated, even in cases with a well established diagnosis [5; 6].

Flow Cytometry (FCM) has gained an ever increasing role in the analysis of haematological malignancies due to its rapid and highly reproducible detection and enumeration of many different cell types at a time, also if they are very rare or admixed to an overwhelming number of non-relevant accompanying cells [7]. Its role as an alternative to cytomorphology or even its better performance over the visual microscopic analysis is however still debated, having been unequivocally demonstrated in a few clinical conditions only [8–10].

Cytomorphological analysis of BM aspirates requires a 2–3 mL 'first pull' suspension in EDTA, in which BM particles must be carefully isolated and smeared flat on a series of slides. Panoptic stains for a differential microscope cell count of at least 500 nucleated cells and at least 200 myeloid lineage cells, prussian blue and cytochemical stains, if required, are the currently accepted standard for a reliable cytomorphological analysis [11; 12].

For Flow Cytometry (FCM) analysis the dishomogeneous BM sample should be reduced to a monodisperse cell suspension, preferably by mechanical means. The sample leftovers are put together again along with the accompanying blood, the residual particles are submitted to a gentle disruption maneuver by either squeezing with a pipette or passing through increasing gauge needles or nylon meshes.

Это помогает понять, почему два метода не способны дать одинаковый результат определения клеточности. Решающую роль играет разбавление КМ периферической кровью в клеточных суспензиях, которые используются для МПЦ-анализа.

Несмотря на указанные технические проблемы, цитоморфологический анализ и МПЦ в настоящее время являются двумя основными и дополняющими друг друга методами получения основного массива информации на аспиратах КМ. Суммируя вышесказанное, цитоморфологический анализ можно считать основным количественным методом, тогда как МПЦ обычно позволяет получить больше качественной информации. Однако из этого правила есть и исключения. Общие результаты, полученные этими двумя методами, всегда требуют сравнения и должны как можно больше совпадать. В следующих разделах приводится краткий обзор вопросов МПЦ-анализа основных популяций клеток КМ в норме.

Проблема гемодилюции образцов КМ

Разбавление диссоциированных клеток КМ зрелыми элементами периферической крови представляет собой практически непреодолимую проблему. Массивное загрязнение образца кровью не позволяет сделать точный количественный анализ клеточного состава КМ и существенно снижает статистическую ценность анализа образца и его информативность при патологических состояниях [13]. Для оценки контаминации образца кровью и соответствующего правильного подсчета клеточности КМ предложено несколько подходов, в основе которых лежит различие профилей поверхностных антигенов у зрелых элементов периферической крови и созревающих элементов КМ [14–17].

Один из наиболее популярных методов точного МПЦ-подсчета бластов КМ (также и по содержанию других клеточных субпопуляций КМ) на основе определения степени контаминации зрелыми элементами крови предложил Loken [16]. В основе этого метода лежит предположение, что на долю незрелых клеток гранулоцитарной линии CD16-neg/dim приходится 80% всей миелоидной популяции КМ, что определяется анализом трепанобиоптатов у нормальных доноров. Разбавление зрелыми ПМЭ периферической крови значительно снижает это количество. В связи с этим, нормализованное относительное содержание любой субпопуляции клеток КМ можно рассчитать по формуле: Нормализованный % = $(80\% / \%$ клеток CD16-neg/dim) $\times$ Измеренный %.

Если содержание зрелых ПМЭ менее 30%, клеточность, определенная методом МПЦ-анализа более или менее совпадает с результатом микроскопического подсчета. Противоречивым моментом этого подхода, касающимся необходимости исключить эозинофилы (клетки CD16-neg), является вопрос, как определить четкий порог для оценки методом МПЦ-анализа, чтобы значения, превышающие этот порог могли быть отвергнуты, и как определить ее правильность в тех случаях, когда снижено содержание созревающих клеток гранулоцитарного ряда при таких патологических состояниях, как миелодисплазия.

This may help to understand why the two techniques cannot yield exactly the same calculated cell frequencies. A major role is played by the variable dilution exerted on BM cells by sinusoidal blood in cell suspensions used for FCM analysis.

Despite these technical differences, cytomorphology and FCM are now the two major and complementary techniques to obtain a great deal of information from BM aspirates: to summarize, cytomorphology can be considered as the leading quantitative technique, whereas FCM can usually provide more qualitative data. Exceptions to this rule can however occur in some instances. The overall results obtained by the two techniques must always be compared and be as coherent as possible.

A quick review of the FCM analysis of the major BM cell compartments in normal steady-state conditions is presented in the following chapters.

The Problem of Haemodilution of BM Samples

Dilution of dissociated BM resident cells by mature elements from the aspirated sinusoidal blood is an almost unavoidable problem. A massive contamination by blood hampers the correct enumeration of BM cells and greatly reduces the statistical representation of the sample and its informative value in pathologic conditions [13].

Several methods have been proposed to evaluate the overall contamination by blood and to calculate the correct BM cell representation accordingly, thanks to the different surface antigen profile between peripheral mature and BM maturing elements [14–17].

Loken has developed one of the most popular methods to correct the FCM count of BM blast (and by extension of other BM resident cell subsets) by estimating the rate of mature blood contamination [16]. This method assumes that immature CD16-neg/dim granular lineage cells represent the 80% of the whole BM resident myeloid population, as determined in dissociated trephine biopsies from normal donors. The dilution exerted by mature peripheral Polymorphs (PMN) reduces this proportion accordingly. Therefore a normalized percentage of any BM cell subset can be evaluated using the following formula: *Normalized % = (80% / CD16-neg-dim cells%) x Measured %*.

When mature PMN are < 30% the FCM count overlaps more or less to the microscopic count. The controversial points of this approach regard the need to exclude Eosinophils (CD16-neg cells), how to assess a clearcut threshold level over which a FCM count should be rejected and its validity when the BM maturing granular lineage is underrepresented in disease states, such as myelodysplasia.

Еще одним подходом к оценке клеточности диссоциированного аспирата КМ является определение пропорции ядросодержащих эритроцитов после лизиса хлоридом аммония, которое может считаться приемлемым на уровне > 15% (личное наблюдение). Для точности, все заключения МПЦ-анализа должны включать оценку полной контаминации образца КМ кровью.

Гематопоэтические предшественники в КМ

При проведении цитоморфологического анализа термин «бластные клетки КМ» включает ряд незрелых предшественников различных линий, т.е. гематопоэтических предшественников, монобластов/промоноцитов, мегакариобластов и незрелых предшественников В-клеток [5]. Традиционно антиген CD34 считается маркером клеток, обладающих клоногенной способностью, и уровень CD34+ клеток КМ по данным МПЦ-анализа в течение длительного времени считался эквивалентом «бластных клеток» по результатам микроскопического анализа [18]. CD34+ клетки КМ являются биологически и морфологически гетерогенными и принадлежат по крайней мере трем различным линиям, таким как: а) лимфобласты или молодые предшественники В-клеток (CD34+, CD45+low; характеристики SSC очень низкие); б) коммитированные клетки миелоидной линии CD34+, CD45+dim; характеристики SSC промежуточные; и в) другие гематопоэтические клетки (CD34+, CD45+ промежуточный уровень; характеристики SSC низкие) [8; 19–21]. Однако, другие CD34-отрицательные предшественники, такие как монобласты и мегакариобласты, должны учитываться при визуальном подсчете бластов, но не учитываться при МПЦ-анализе CD34+ клеток. В связи с этим число CD34+ бластов по данным МПЦ-анализа меньше числа всех бластных клеток, полученного при визуальном подсчете. Более того, содержание CD34 бластов очень чувствительно к разбавлению КМ кровью, поскольку их процентное содержание постепенно снижается с увеличением числа заборов образцов из той же зоны аспирации [16]. Также описаны вариации, обусловленные возрастными особенностями и зоной аспирации КМ [22].

В настоящее время в качестве метода для получения числа бластных клеток КМ при МПЦ-анализе, максимально близкого к числу бластов при микроскопическом анализе (в норме менее 3%), предлагается помимо CD34+ использовать дополнительные маркеры, например, CD117 и HLA-DR, и применять в качестве знаменателя CD45+ клетки [23]. Еще одним важным моментом является определение нормальной фракции незрелых В-клеточных предшественников по отношению к общей популяции бластных клеток (в среднем 10% от общего числа бластов КМ). Этот показатель не зависит от разбавления кровью, кроме того при миелодиспластических состояниях с воспроизводимым результатом показано снижение пропорции В-клеточных предшественников [24].

Another approach to assess the representation of a dissociated BM aspirate can be to evaluate the proportion of nucleated red cells after ammonium chloride lysis, that may be kept as acceptable when > 15% (personal observation). For sake of correctness an estimate on the overall BM sample contamination by blood should be included in all FCM reports.

BM Haematopoietic Precursors

In the cytomorphologic analysis the term of 'BM blast cells' encompasses a number of immature precursors of different lineages, i.e. haematopoietic precursors, monoblasts/promonocytes, megacaryoblasts and immature B cell precursors [5].

CD34 has been traditionally considered as the marker of cells endowed with clonogenic capability, and the level of CD34+ BM cells by FCM has long been considered as an equivalent of the 'blast cells', as counted by microscope analysis [18]. BM CD34+ cells are biologically and morphologically heterogeneous and belong to at least three different cell compartments: a) Lymphoblasts or young B cell precursors (CD34+, CD45+low, Side Scatter very low); b) Myeloid lineage committed cells (CD34+, CD45+dim, Side Scatter intermediate); and c) Other haematopoietic cells (CD34+, CD45+ intermediate, Side Scatter low) [8; 19–21]. However, other CD34-negative precursors such as monoblasts and megakaryoblasts must be included in the visual blast count, but escape the FCM enumeration of CD34+ cells. The mere FCM 'CD34+ blast' count is therefore underestimating the visual enumeration of all blast cells. Moreover, CD34 blast cell count is very sensitive to dilution by sinusoidal blood, since its percentage gradually decreases with the number of subsequent pulls using the same aspiration site [16]. Age-related and aspiration site-dependent changes have been also described [22].

The addition of other progenitor cell markers, such as CD117 and HLA-DR, to CD34+ and the usage of CD45+ cells as the denominator of the calculated percentage is now considered a FCM method to obtain a BM blast count as close as possible to microscope count (normal values <3%) [23]. Another important point is the definition of the normal fraction of immature B cell precursor compartment in relation to the overall blast cell population (average 10% of all BM blasts). This parameter is dilution-independent, and a reduced proportion of B cell precursors is reproducibly observed in Myelodysplastic conditions [24].

Эритроидные предшественники в КМ

Ядросодержащие предшественники эритроидного ряда нечувствительны к лизирующим веществам и их можно изучать методами фенотипирования.

Эритроидные предшественники также могут определяться среди CD34+ клеток КМ как клетки CD36+CD71+CD105+. Однако наименее зрелые клетки-предшественники эритроидной линии характеризуются как CD34-отрицательные элементы, содержащие внутриклеточный фермент альдегиддегидрогеназу (ALDH), который определяется при помощи флуоресцентных субстратов и анализа методом МПЦ [19; 25; 26]. Незрелые эритроидные клетки-предшественники CD34-ALDH+ CD71+CD105+ больше по размеру, чем клетки CD34+ КМ. По мере созревания в эритроидных клетках-предшественниках наблюдается прогрессирующее уменьшение размера ядра, утрата ALDH, CD45 и CD105 и появление гликофорина-A (CD235a). Этот процесс, по-видимому, имеет характер дискретных шагов, а не протекает непрерывно, на что указывает окрашивание на CD71/CD235a. Высокодифференцированные эритроциты утрачивают CD71 и демонстрируют яркую окраску на CD235a+. Относительное содержание разнообразных типов эритроидных клеток представляет хороший эквивалент визуального сдвига вправо или влево, который регистрируется при микроскопическом анализе.

Нарушение процесса созревания при миелодисплазии может привести к дезорганизации этих упорядоченных шагов созревания, что четко показывает МПЦ-анализ, особенно при снижении уровня CD71 [27].

Неэффективный эритропоэз может наблюдаться при различных гематологических заболеваниях и характеризуется экспансией эритроидного ряда КМ и накоплением изоферритинов в митохондриях красных клеток [28]. В этих условиях при окрашивании берлинской лазурью отложений железа могут формироваться «кольцевые сидеробласты», содержание которых имеет большое значение для стадирования миелодиспластических состояний [5]. Точное определение числа кольцевых сидеробластов бывает затруднительным и субъективным, в связи с этим предпринимаются попытки применять МПЦ-анализ для выявления внутриклеточных изоферритинов с использованием флуоресценции [28]. Однако эти попытки пока далеки от применения в практике, тогда как обнаруженная в недавнем времени мутация SF3B1 представляется надежным индикатором миелодиспластических/миелопролиферативных состояний с тромбоцитопенией и кольцевыми сидеробластами [29].

Созревание клеток миелоидной линии в КМ

Для изучения процессов созревания клеток миелоидной линии из коммитированных CD34+ предшественников необходимо использовать несколько клеточных маркеров, позволяющих различать гранулоцитарную и моноцитарную дифференцировки [3; 30].

BM Erythroid Precursors

Nucleated erythroid precursors are insensitive to lysing agents and can be studied by phenotypic analysis.

Within the heterogenous BM CD34+ cell compartment also erythroid precursors can be found, and they are identified as CD36+ CD71+ CD105+ cells. However, the most immature erythroid precursor fraction has been characterized as made by CD34-negative elements endowed with the intracellular enzyme Aldehyde Dehydrogenase (ALDH), that can be detected by fluorescent substrates and FCM analysis [19; 25; 26]. The immature CD34- ALDH+ CD71+ CD105+ erythroid precursors are larger than BM CD34+ cells. Following maturation, erythroid precursors undergo progressive nuclear shrinking, lose ALDH, CD45 and CD105 and acquire Glycophorin-A (CD235a). This process seems to proceed by discrete maturation steps rather than continuously, as demonstrable by CD71/CD235a staining patterns. Well differentiated red cells lose CD71 and are CD235a+ bright. The relative proportion of the various red cell compartments is a good equivalent of the visual 'shift' to the right or the left used in microscopical analysis reports.

Maturation derangements occurring in myelodysplasia may disrupt these orderly maturation steps, and this is clearly demonstrable by FCM analysis, especially with the down-regulation of CD71 [27].

Ineffective erythropoiesis can occur in various haematological diseases and is characterized by an expansion of BM red cell compartment and by the accumulation of isoferritins within red cell mitochondria [28]. Under such conditions the Perls' prussian blue staining of iron deposits can generate the 'ringed sideroblasts', whose proportion is crucial in the grading of myelodysplastic states [5]. The precise counting of ringed sideroblast is difficult and quite subjective, therefore FCM attempts have been developed to detect intracellular isoferritins by fluorescent techniques [28]. Such attempts are however still far from their routine application, whereas the recent detection of the SF3B1 mutation seems now a reliable indicator of myelodysplastic/myeloproliferative states with thrombocytopenia and ringed sideroblasts [29].

BM Myeloid Lineage Maturation

The study of the myeloid lineage maturation stemming from committed CD34+ precursors requires a number of cell markers to discriminate between granulocytic and monocytic differentiation [3; 30].

Экспрессия антигена CD45 отрицательно коррелирует со степенью зрелости клетки. Как общее правило, хорошо известно, что чем менее зрелой является субпопуляция клеток КМ, тем слабее экспрессия CD45. Однако CD45 достаточно стабильно экспрессируется на нормальных зрелых лимфоцитах на уровне приблизительно 200 000 единиц ABC [33]; таким образом, экспрессия CD45 может использоваться в качестве биологической референсной величины для оценки степени созревания других типов клеток. В норме отношение СИФ экспрессии CD45 для CD34+ миелобластов и лимфоцитов должно быть более 4, т.е. указывать на снижение экспрессии CD45, наблюдающееся в аномальных миелобластах при миелодисплазии и других патологических состояниях по сравнению с соответствующими клеточными субпопуляциями в норме [34].

Визуальное количественное определение подмножеств клеток моноцитарной линии на микроскопе особенно затруднительно, при этом определение относительного содержания монобластов и промоноцитов имеет критическое значение для диагностики моноцитарного/миеломоноцитарного хронического и острого лейкозов [4]. Как указывалось выше, общий подсчет бластных клеток на микроскопе должен, по рекомендации ВОЗ (2008), включать подсчет монобластов и промоноцитов. Из практических соображений линия созревания моноцитов (по данным МПЦ-анализа) включает три основные подмножества: монобласты (2–7% моноцитарной линии) CD14– CD15– CD33++ CD64–/+ CD300e–; промоноциты (15–25% моноцитарной линии) CD14–/+ CD15+/- CD33+ CD64+ CD300e+/- и зрелые моноциты (65–80% моноцитарной линии) CD14+ CD15+ CD33+ CD64+ CD300e+ [35]. Физиологическое развитие миелоидной линии в нормальном КМ также можно изучать, используя оценку общей гранулярности созревающих клеток. Эту оценку можно сделать по соотношению распределений по оси SSC гранулярных клеток и лимфоцитов. В норме это соотношение должно быть ≥ 6 [34].

При ряде миелодиспластических состояний миелоидные клетки могут проявлять линейную неверность, при этом чаще всего встречается аберрантная экспрессия CD7 и CD56. Однако здесь необходимо проявлять осторожность, т.к. слабая экспрессия CD56 может наблюдаться и на нормальных миелоидных клетках у престарелых лиц или при активации [32; 36; 37].

Если этапы созревания довольно легко поддаются оценке, количественное определение искажений ожидаемых распределений интенсивности флуоресценции, обусловленных повышением или снижением экспрессии поверхностных антигенов в результате нарушения клеточной физиологии, представляется более сложной задачей [38].

Созревание В-клеточной линии в КМ

Изучение В-лимфоцитарной линии (в норме около 2–12% CD45+ клеток) в КМ не вызывает затруднений, и знание нормального соотношения В-клеточных субпопуляций имеет особое значение в диагностике реактивных состояний, при восстановлении после химиотерапии и при В-клеточных лейкозах [3].

CD45 antigen expression is inversely correlated with cell maturity. As a general rule, it is well known that the more immature a BM cell subset, the dimmer its CD45 antigen expression. CD45 is however quite stably expressed on normal mature lymphocytes, at around 200 000 ABC units [33]; therefore this expression can be used as a biological reference to evaluate the degree of maturation of other cell types. The mean fluorescence intensity (MFI) ratio of CD45 expression between CD34+ myeloblasts and lymphocytes should be >4 in normal subjects, thus stressing the reduced CD45 expression occurring in abnormal myeloblasts in myelodysplasia and other pathological conditions as compared to their respective normal counterparts [34].

The visual enumeration of monocyte lineage compartments is particularly difficult to perform on the microscope, although the relative proportions of monoblasts and promonocytes are critical in the diagnosis of monocytic/myelomonocytic chronic and acute leukemia diagnosis [4]. As already mentioned, monoblasts and promonocytes must be included in the overall blast count by microscopy, according to WHO 2008.

For practical purposes monocyte maturation line, as analyzed by FCM, includes three major subsets: monoblasts (range 2–7% of monocyte lineage) CD14– CD15– CD33++ CD64–/+ CD300e–; promonocytes (range 15–25% of monocyte lineage) CD14–/+ CD15+/- CD33+ CD64+ CD300e+/- and mature monocytes (range 65–80% of monocyte lineage) CD14+ CD15+ CD33+ CD64+ CD300e+ [35].

The physiological development of myeloid lineage in normal BM can be also studied by evaluating the overall granularity of maturing cells. This can be accomplished by ratioing the mode channels of granular cells and lymphocytes SSC distributions. In normal subjects this ratio should be ≥ 6 [34].

In a number of myelodysplastic conditions, lineage infidelities can be demonstrated in myeloid cells, with the aberrant expression of CD7 or CD56 being the most commonly found. Caution must be however applied since CD56 can be also weakly expressed by normal myeloid cells in elderly people or if activation takes place [32; 36; 37].

While maturation fluxes are evaluable rather easily, the distortion of the expected fluorescence patterns due to up- or down-regulation of membrane antigens caused by derangements of cell physiology is more difficult to quantitate [38].

BM B Cell Lineage Maturation

The B Lymphocyte lineage (normally around 2 to 12% of the CD45+ cells) can be easily studied in the BM, and the knowledge of the normal maturing B cell patterns is of utmost importance when performing analyses of reactive states, post-chemotherapy regeneration or acute B cell leukemias [3].

В-клетки участвуют в сложных процессах перемещения между лимфоузлами, периферической кровью и КМ. Они проходят этапы созревания в КМ, которые по необходимости можно определить при помощи антигенов CD19 (якорный маркер), CD34, CD10, CD20 и TdT. Хорошо установлено, что в процессе созревания В-клетки постепенно утрачивают CD10 и приобретают CD20 [20; 39; 40].

Первым важным шагом в анализе является различение лимфобластов (TdT+ CD19+ CD10++ CD34+ CD45-/+ SSClow) и гематогонов или молодых В-клеток (TdT- CD19+ CD10+ CD34- CD38++ CD45interim SSCvery low) (рис. 1; см. вклейку). Эти популяции проявляют четкие различия в зависимости от возраста и функционального состояния, т.к. лимфобласты и гематогоны присутствуют в большом количестве в юношеском возрасте и в период восстановления после химиотерапии и встречаются редко после 60 лет [3].

Кроме того, со специфическими этапами созревания и функциональной дифференцировки связаны такие маркеры, как sIgD, CD24, CD27, CD38 и CD81. Кратко, путь от покоящихся «необученных» В-клеток (CD19+ CD27- sIgD+) до В-клеточных эффекторов (CD19+ CD27+ sIgD-), плазмобластов (CD19+ CD24- CD27++ CD38+ CD138- sIgD-) и плазмочитов (CD19+dim CD20- CD38++ CD138++) можно проследить, используя многоцветное окрашивание и МПЦ. Анализ клоальности В-клеток в нормальном зрелом КМ проводят на основе экспрессии тяжелой или легкой цепи поверхностного Ig по той же методике, что и при анализе периферической крови.

Сравнительное количественное определение предшественников В-клеток и миелоидных предшественников является параметром МПЦ-анализа, который получил признание в оценке миелодиспластических состояний. В крупной популяции клеток в КМ с характеристиками CD34+ CD45interim/dim В-клеточные предшественники определяются как клетки CD45+dim SSClowCD10+ (в среднем 10% в норме в юношеском возрасте), а миелоидные предшественники как клетки CD45+ SSCinterim CD13/CD33+ (в среднем в норме 0,9%). Соотношение миелоидного кластера и кластера В-предшественников не зависит от разбавления кровью и может служить надежным индикатором миелодисплазии [34].

Плазмочиты в КМ

В норме плазмочиты определяются как клетки CD45+dim SSCinterim CD38++ CD138++ CD27+ CD117- с поликлональным распределением легкой цепи внутриклеточного Ig. В норме они составляют 3–4% всех незеритроидных клеток КМ и характеризуются цитоплазматическим соотношением каппа/лямбда от 1/10 до 8/1 [41–43]. Долгоживущие плазмочиты представляют незначительное подмножество, характеризующееся снижением или отсутствием CD45, отрицательным значением CD19 и иногда положительным значением CD56.

B cells are subject to a complex trafficking between the lymph node, the peripheral blood and the BM. They undergo maturation steps in the BM, that can be studied by a staining panel made by CD19 (anchor marker), CD34, CD10, CD20 and TdT, if needed. The stepwise loss of CD10 and the progressive acquisition of CD20 during B cell maturation are well established [20; 39; 40].

A first important discrimination must be established between lymphoblasts (TdT+ CD19+ CD10++ CD34+ CD45-/+ SSC_{low}) and hematogones or young B cells (TdT- CD19+ CD10+ CD34- CD38++ CD45_{interm} SSC_{very low}) (Fig. 1; see insets). These populations display striking differences with age and functional states, since lymphoblasts and hematogones are highly represented in the BM of juveniles and during recovery from chemotherapy, whereas they become increasingly rare after the 6th decade of life [3].

Additional markers that may be correlated to specific maturation or functional differentiation steps are sIgD, CD24, CD27, CD38 and CD81. Briefly, the pathway between quiescent naive B cells (CD19+ CD27- sIgD+) to effector B cells (CD19+ CD27+ sIgD-) to plasmablasts (CD19+ CD24- CD27++ CD38+ CD138- sIgD-) and plasmacells (CD19+dim CD20- CD38++ CD138++) can be followed by multicolor staining and FCM. Clonality analysis of normal mature BM B cells is performed by surface Ig heavy or light chain expression with the same techniques used for peripheral blood.

The enumeration of B cell precursors in comparison to myeloid precursors is a FCM parameter that has gained importance in the assessment of myelodysplastic conditions. Within the large BM CD34+ CD45_{interm}/dim cell population B cell precursors can be selected as CD45+dim SSC_{low} CD10+ cells (average 10% in juvenile normals), whereas myeloid precursors are CD45+ SSC_{interm} CD13/CD33+ (average 0.9% in normals). The proportion between myeloid and B progenitor-related clusters is a dilution-independent parameter, and can be used as a reliable indicator of myelodysplasia [34].

BM Plasmacells

Normal plasmacells can be identified as CD45+dim SSC_{interm} CD38++ CD138++ CD27+ CD117- cells, with a polyclonal intracellular Ig light chain distribution. They must normally be within 3–4% of all non-erythroid BM cells and display a cytoplasmic Kappa/Lambda ratio between 1/10 and 8/1 [41–43]. The long-living plasmacells are a minor subset characterized by reduced or absent CD45, negative CD19 and sometimes positive CD56.

Однако, частота регистрации плазмочитов при МПЦ значительно ниже, чем при цитоморфологическом анализе, что объясняется прилипанием этих клеток к матриксу КМ и тенденции к агрегации.

При МПЦ-анализе не является необычной регистрация плазмочитов в 10 раз реже, чем в мазках КМ. Это значит, что МПЦ нельзя считать подходящим методом для оценки уровней плазмочитов в диагностике МГНЭ и миеломы, и использование этого метода следует ограничить качественной оценкой [44].

Одним из частых вопросов клинической практики является вопрос о присутствии в КМ и размере аномальной популяции плазмочитов на основе результатов биохимического и гематологического анализа.

МПЦ имеет фундаментальное значение в классификации нормальных и аномальных популяций, особенно если они являются примесями и морфологический анализ не позволяет сделать определенный вывод, или в случае реактивного плазмочитоза с очень высокими уровнями плазмочитов [45] (рис. 2). Также четко показано превосходство МПЦ в оценке минимального остаточного заболевания после лечения миеломы [9; 42].

Гетерогенность является основной характеристикой нормальных и аномальных плазмочитов [46].

При множественной миеломе может определяться большое число различных генетических нарушений: они образуют спектр морфологических и фенотипических изменений в аберрантных плазмочитах, поэтому классический фенотип поверхностных антигенов (CD45dim/neg CD19– CD20+ CD38++ CD56+ CD138++) может иметь ряд вариаций с непредсказуемым снижением экспрессии CD45 и CD138 [47; 48], вариабельной экспрессией CD20, CD28, CD117 и CD200. В частности, с осторожностью нужно относиться к традиционному представлению, что антиген CD56 является отличительным признаков аберрантных плазмочитов, потому что CD56 и другие менее частые поверхностные маркеры (например, CD117) могут встречаться и на нормальных плазмочитах [47]. В этой связи всегда наряду с анализом поверхностных маркеров необходимо проводить анализ на клональность внутриклеточных цепей каппа и лямбда.

Другие нормальные клеточные типы

Более редкие клетки КМ, такие как мегакарициты и гистициты обычно не всегда надежно определяются методом МПЦ.

Однако мастоциты в нормальном КМ (SSChigh CD2– CD25– CD30– CD45+ CD63– CD117+) могут определяться методом МПЦ-анализа и легко отличаются от аномальных мастоцитов [49]. Также возможно выявление методом МПЦ-анализа дендритных клеток в КМ, как это часто происходит в периферической крови и лимфоузлах [50].

Plasmacell frequency, however, turns out much lower in FCM analyses than in cytomorphology, and this has been attributed to their stickiness to the BM matrix and tendency to aggregate.

In FCM analyses it is not unusual to obtain plasmacell frequencies around 10 times less than in BM smears. This means that FCM cannot be considered a suitable mean to count plasmacell levels in MGUS or Myeloma diagnosis, and its usage must be restricted to qualitative rather than to quantitative analyses [44].

One of the commonest clinical questions is whether an abnormal plasmacell population is present in the BM and what is its size, on the basis of biochemical and hematological findings.

FCM analysis of plasmacells proved to be fundamental in the classification of normal and abnormal populations, especially when they are admixed and morphologic analysis is indeterminate or in case of reactive plasmocytoses with very high plasma cell numbers [45] (fig. 2). Moreover, the superiority of FCM analysis in the evaluation of minimal residual disease after treatment for myeloma has been clearly demonstrated [9; 42].

Cell heterogeneity is a major feature of both normal and abnormal plasmacells [46].

Many different genetic derangements may be present in multiple myeloma: they produce a spectrum of morphological and phenotypic changes in aberrant plasmacells, so that the classic myeloma surface phenotype (CD45+dim/neg CD19- CD20+ CD38++ CD56+ CD138++) can display a number of variations with unpredictable down-regulation of CD45 and CD138 [47; 48], variable expression of CD20, CD28, CD117 and CD200. In particular, the traditional evidence that CD56 antigen is an hallmark of aberrant plasmacells should be considered with caution, since CD56 and other less common surface markers (i.e. CD117) can be detected also on normal plasmacells [47]. Clonality analysis of intracellular Kappa and Lambda chains is therefore always mandatory along with surface markers.

Other Normal Cell Types

Rarer normal BM cells, such as Megakaryocytes and Histiocytes are usually not well detectable by FCM.

Normal BM Mastocytes (SSC high CD2- CD25- CD30- CD45+ CD63- CD117+) are however suitable to FCM analysis and can be easily distinguished from abnormal mastocytes [49]. Dendritic cells can be spotted by FCM also in the BM, as it commonly occurs in peripheral blood and lymph nodes [50].

Заключение

МПЦ-анализ в настоящее время является незаменимым инструментом, дополняющим цитоморфологический анализ костного мозга, и служит для уточнения его результатов. Он позволяет получить большой массив качественных и, в некоторых случаях, количественных данных, которые невозможно с большой степенью надежности получить только при микроскопическом анализе.

«Нормальный» костный мозг может представлять широкий репертуар физиологических вариаций в зависимости от возраста, функциональных потребностей и реакции на внешние модификаторы. Некоторые из таких «нормальных» свойств могут имитировать патологические состояния, затрудняя, таким образом, дифференцированную диагностику. Высокий современный уровень стандартизации, чувствительности и надежности многоцветной ПЦ обеспечивает возможность интегрированного подхода к диагностике гематологических заболеваний.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Conclusion

FCM analysis is nowadays an indispensable tool to support the cytomorphological analysis of bone marrow and to corroborate its results. It provides a large array of qualitative and sometimes also quantitative data that cannot be reliably obtained by visual microscopy alone.

The 'normal' bone marrow may however display a vast repertoire of physiological variations related to age, functional demands and response to external modifiers. Some of these 'normal' features may sometimes mimic pathological conditions, thus posing difficult challenges to differential diagnosis. The high degree of standardization, sensitivity and reliability that can be obtained by state-of-the-art multicolor FCM is of great help in a modern, integrated diagnostic approach to hematological diseases.

The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Calvi LM, Link DC. Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Calcif Tissue Int* 2014; 94: 112–124.
2. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia micro-environment. *Brit J Haematol* 2014; Jan 9. doi: 10.1111/bjh.12725.

3. *Van Lochem EG, van der Velden VJH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, and van Dongen JJM.* Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004; 60B: 1–13.
4. *Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW.* WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
5. *Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, Cazuela M et al.* Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* 2008; 93: 1712–1717
6. *Senent L, Arenillas L, Luño E, Ruiz JC, Sanz G and Florensa L.* Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2013; 98: 568–575.
7. *Bjornsson S, Wahlstrom S, Norstrom E, Bernevi I, O'Neill U, Eva Johansson E, Runstrom H, and Simonsson P.* Total Nucleated Cell Differential for Blood and Bone Marrow Using a Single Tube in a Five-Color Flow Cytometer. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2008; 74B: 91–103.
8. *Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, Barcena P, Rasillo A, et al.* The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008; 22: 1175–1183.
9. *Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, Mateo G, Montalbán MA, Mateos MV, Bladé J, Lahuerta JJ, Orfao A, and San Miguel JF.* Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 2009; 94: 1599–1602.
10. *Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, Zuchlinsky D, Calvo K, Kurlander R, Bhutani M, Tageja N, et al.* Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res* 2013 Dec 11. pii: S0145–2126(13)00426–8. doi: 10.1016/
11. *Bates I.* Bone marrow biopsy. In: *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Lewis SM, Bain BJ and Bates I (eds), Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia 2006, pp 115–130.
12. *Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC.* ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30: 349–364.

13. *Helgestad J, Rosthøj S, Johansen P, Varming K, Østergaard E.* Bone marrow aspiration technique may have an impact on therapy stratification in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 224–226.
14. *Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Loewenberg B, and Gratama JW.* Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009; 76B: 18–26.
15. *Lee SH, Ho SJ, Thomas DT, Giri P, Lee H, Sia H, To LB, Sullivan TR.* A partial nucleated differential cell count of the bone marrow aspirate that is independent of peripheral blood dilution. *Int J Lab Hematol.* 2008; 30: 473–479.
16. *Loken MR, Chu SC, Fritschle W, Kalnoski M, and Wells DA.* Normalization of Bone Marrow aspirates for hemodilution in Flow Cytometric analyses. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009; 76B: 27–36.
17. *Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez P, Marinov I et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25: 567–574.
18. *Maynadié M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, Le Roux G, Campos L, Alex Dromelet A et al.* Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002; 100: 2349–2356.
19. *Prefffer F and Dombkowski D.* Advances in complex multiparameter Flow Cytometry technology: Applications in stem cell research. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009; 76B: 295–314.
20. *Chantepie SP, Cornet E, Salaun V, Reman O.* Hematogones: An overview. *Leuk Res* 2013; 37: 1404–1411.
21. *Garg S, Madkaikar M, Ghosh K.* Investigating cell surface markers on normal hematopoietic stem cells in three different niche conditions. *International Journal of Stem Cells* 2013; 6: 129–133.
22. *Farrell TL, McGuire TR, Bilek L, Brusnahan SK, Jackson JD, Lane JT, Garvin KL, et al.* Changes in the frequencies of human hematopoietic stem and progenitor cells with age and site. *Exp Hematol* 2014; 42: 146–154.
23. *Sandes AF, Kerbauy DMB, Matarraz S, Chauffaille MLLF, Lopez A, Orfao A, and Yamamoto M.* Combined Flow Cytometric assessment of CD45, HLA-DR, CD34, and CD117 expression is a useful approach for reliable quantification of blast cells in Myelodysplastic Syndromes. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2013; 84B: 157–166.
24. *Della Porta MG, Lanza F, and Del Vecchio L.* Flow Cytometry Immunophenotyping for the Evaluation of Bone Marrow Dysplasia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2011; 80B: 201–211.

25. *Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, Morabito P, Abate G, Gorrese M, Raia M, Pascariello C, Scalia G, Gemei M, Mariotti E and Del Vecchio L.* Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiology* 2008; 8: 13.
26. *Schuurhuis GJ, Meel MH, Wouters F, Min LA, Terwijn M, de Jonge NA, Kelder A, Snel AN, Zweegman S, Ossenkoppele GJ, Smit L.* Normal hematopoietic stem cells within the AML bone marrow have a distinct and higher ALDH activity level than co-existing leukemic stem cells. *PLoS ONE* 8(11): e78897
27. *Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR.* Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol* 2013; Oct 3. doi: 10.1111/ijlh. 12151
28. *Invernizzi R, Travaglini E, Della Porta MG, Galli A, Malcovati L, Rosti V, Bergamaschi G, Erba BG, Bellistri F, Bastia R, Santambrogio P, Levi S, Cazzola M.* Effects of mitochondrial ferritin overexpression in normal and sideroblastic erythroid progenitors. *Br J Haematol* 2013; 161: 726–737.
29. *Haferlach T.* Molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2012; 36: 1459–1462.
30. *Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, Andersen M, Xiao Z, Raza A, Woda BA, Wang SA.* Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: Emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res* 2008; 32: 215–224.
31. *Chu SC, Wang TF, Li CC, Kao RH, Li DK, Su YC, et al.* Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2011; 35: 868–873.
32. *Westers TM, van der Velden VHJ, Alhan C, Bekkema R, Bijkerk A, Brooimans RA, Cali C, Dräger AM, de Haas V, Homburg C, et al.* Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: Report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Leuk Res* 2012; 36: 422–430.
33. *Bikoue A, Janossy G, Barnett D.* Stabilised cellular immuno-fluorescence assay: CD45 expression as a calibration standard for human leukocytes. *J Immunol Methods* 2002; 266: 19–32.
34. *Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, Czader M, Freeman S, Vyas P, Porwit A, Saft L, Westers TM, Alhan C, et al.* Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 2012; 97: 1209–1217.

35. Brckalo T, Calzetti F, Pérez-Cabezas B, Borrás FE, Cassatella MA and Lopez-Botet M. Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2010; 40: 722–732.
36. Lacronique-Gazaille C, Chaury MP, Le GA, Faucher JL, Bordessoule D, Feuillard J. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica*. 2007; 92: 859–60.
37. Muroi K, Fujiwara S, Tatara R, Sugimoto M, Yamamoto C, Uehara E, Meguro A, Hatano K, et al. CD56 expression in normal immature granulocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Exp Hematol* 2013; 53: 247–250.
38. Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, Li Y, Chang A, Norwood TH, and Wood BL. Four-Color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 170–181.
39. Sanz E, Muñoz-A N, Monserrat J, Van-Den-Rym A, Escoll P, Ranz I, Álvarez-Mon M and De-la-Hera A. Ordering human CD34+CD10–CD19+ pre/pro-B-cell and CD19– common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways. *PNAS* 2010; 107: 5925–5930.
40. Agrawal S, Smith SABC, Tangye SG and Sewell WA. Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clin Exp Immunol* 2013; 174: 53–59.
41. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama JW, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431–438.
42. Cannizzo E, Carulli G, Del Vecchio L, Ottaviano V, Bellio E, Zenari E, Azzarà A, Petrini M and Preffer F. The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of Multiple Myeloma by Flow Cytometry: A New Statistical Model. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 377–386.
43. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A and Perez-Andres M. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138– and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010; 95: 1016–1020.
44. Smock KJ, Perkins SL, Bahler DW. Quantitation of plasma cells in bone marrow aspirates by Flow Cytometric analysis compared with morphologic assessment. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 951–955.
45. Ioannou MG, Stathakis E, Lazaris AC, Papathomas T, Tsiambas E, Koukoulis GK. Immunohistochemical evaluation of 95 Bone Marrow reactive plasmacytoses. *Pathol Oncol Res* 2009; 15: 25–29.

46. Liu D, Lin P, Hu Y, Zhou Y, Tang G, Powers L, Medeiros LJ, Jorgensen JL, Wang SA. Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *J Clin Pathol* 2012; 65: 823–829.
47. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, Zuchlinsky D, Calvo K, Kurlander R, Bhutani M, Tageja N, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res* 2014; 38: 371–376.
48. Conticello C, Giuffrida R, Parrinello N, Buccheri S, Adamo L, Sciuto MR, Colarossi C, Aiello E, Chiarenza A, Romano A, et al. CD200 expression in patients with Multiple Myeloma: Another piece of the puzzle. *Leuk Res* 2013; 37:1616–1621.
49. Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Alvarez-Twose I, Matito A, Escribano L, Teodosio C, Jara-Acevedo M, García-Montero AC, Mayado A, Orfao A. Flow cytometry criteria for systemic mastocytosis: bone marrow mast cell counts do not always count. *Am J Clin Pathol* 2013; 139: 404–406.
50. Osaki Y, Yokohama, Saito A, Tahara K, Yanagisawa K, Ogawa Y, Ishizaki T, Mitsui T, Koiso H, Takizawa M. Characterization of CD56+ Dendritic-Like Cells: A normal counterpart of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell neoplasm? *PLoS ONE* 8(11): e81722.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Б. Паива

**ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ
И ИХ СУБПОПУЛЯЦИИ В КОСТНОМ МОЗГЕ:
МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Лаборатория проточной цитометрии, Наваррский университет, Памплона, Испания

Представляет интерес тот факт, что клеточная популяция конечной стадии развития –ПК характеризуются выраженной гетерогенностью в отношении продолжительности жизни, функциональности и гено-/фенотипов. Как следствие долгой жизни и персистенции, долгоживущие ПК по типичным свойствам находятся всего в одном шаге от патологических клеток (например, онкогенных элементов, которые усиливают клональное доминирование за счет пролиферативной экспансии). Прогресс в технологии проточной цитометрии в последнее время привел к значительному совершенствованию иммунофенотипических исследований ПК при ММ, которые позволили открыть существование четко различающихся функциональных субклонов. Одним из примеров таких субклонов служат ЦОК ММ. В работе приводится обзор современных представлений о ЦОК ММ и обсуждаются дальнейшие направления исследований.

Ключевые слова: долгоживущие плазматические клетки, иммунофенотипирование, аутоиммунитет, миелома, клональная гетерогенность, циркулирующие опухолевые клетки.

В-клетки могут развиваться в два основных типа клеток памяти – В-клетки памяти и ПК памяти. В-клетки памяти конститутивно не выполняют каких-либо эффекторных функций и требуют повторной стимуляции, чтобы внести свой вклад в анамнестическую реакцию. Эта форма памяти отличается гибкостью и ее можно регулировать в зависимости от количества антигенов и иммунного окружения. ПК памяти секретируют огромное число эффекторных молекул, т.е. специфических антител в течение продолжительного периода времени (более 1 года), при этом присутствуя в КМ как неделяющиеся клетки. Они функционируют независимо от антигенной стимуляции и утратили молекулярное «оборудование», необходимое для выявления мишени – микроорганизма или антигена. Благодаря своей долгой жизни и персистенции, долгоживущие ПК по своим типичным свойствам находятся всего в одном шаге от патологических клеток (например, онкогенных элементов, которые усиливают клональное доминирование за счет пролиферативной экспансии). Таким образом, ПК, благодаря постоянной секреции патогенных антител, могут вызывать различные патологические проявления, такие как хронический воспалительный процесс при аутоиммунных заболеваниях, или развитие неоплазий (например, моноклональной гаммапатии), которые могут малигнизироваться (множественная миелома и ОЛ-амилоидоз) или оставаться доброкачественными в течение нескольких лет (MGUS, МГНЭ).

B. Paiva

**BONE MARROW PLASMA CELLS AND ITS SUBSETS:
METHODOLOGICAL ASPECTS OF STUDY**

Flow Cytometry Core CIMA LAB diagnostics University of Navarra

It is sticking to see that for an end-stage population, PCs show significantly heterogeneity regarding longiness, functionality and geno/phenotypes. As a consequence of their longevity and persistence, long-lived PCs are just one step behind typical features of pathological cells (e.g.: oncogenic events that enhance clonal predominance through proliferative expansion). Given the recent advance on flow cytometry technology, immunophenotypic studies on MM PCs have remarkably improved, and led to the identification of distinct functional subclones. One example of such subclones is MM CTCs. Here, we will review our current knowledge on MM CTCs, and discuss further research areas.

Keywords: long-lived plasma cells; immunophenotyping; autoimmunity; myeloma; clonal heterogeneity; circulating tumor cells

B cells can develop into two major types of memory cells, namely memory B cells and memory PCs. Memory B cells do not constitutively express any effector function, requiring restimulation before they can contribute to the memory response. This form of memory is flexible, and can be regulated according to the amount of antigen encountered, and the immune environment. Memory PCs secrete abundant amounts of effector molecules, i.e. specific antibodies for extended periods of time (> 1 year) while remaining as non-dividing cells in bone marrow. They persist independently of antigenic stimulation, and have lost the molecular equipment necessary for sensing their target microorganism/ antigen. As a consequence of their longevity and persistence, long-lived PCs are just one step behind typical features of pathological cells (e.g.: oncogenic events that enhance clonal predominance through proliferative expansion). Thus, PCs can give rise to different pathological manifestations such as chronic inflammatory processes in autoimmune diseases by continuously secreting pathogenic antibodies, or neoplasms such as monoclonal gammopathies that can either turn malignant (e.g.: multiple myeloma and AL amyloidosis) or remain benign for several years (e.g.: MGUS).

Представляет интерес тот факт, что популяция в последней стадии развития обнаруживает существенную клеточную гетерогенность. На уровне фенотипа нормальные ПК демонстрируют гетерогенную экспрессию CD45 и CD19, содержат небольшую CD20-положительную популяцию и, несмотря на гомогенную сильную экспрессию CD81, этот тетраспанин не определяется примерно в 5% общей популяции нормальных ПК. В небольшой субпопуляции ПК (5–20% всех ПК) наблюдается экспрессия других маркеров, например, CD56 и CD28. Также значительная гетерогенность наблюдается и в экспрессии на ПК маркеров определенных заболеваний. На ПК ММ исследование SNP и секвенирование всего генома позволили определить три четких различных типа геномной эволюции: стабильные геномы без различий между клонами при постановке диагноза и при рецидиве; линейная эволюция, при которой рецидивный клон очевидно произошел из субклона, присутствующего при постановке диагноза, но продолжает развитие в сторону отличия от него за счет дополнительно приобретенных связей; и разветвляющаяся (нелинейная) модель, в которой рецидивный клон произошел из небольшого субклона, слабо представленного при постановке диагноза. Клональная гетерогенность, отмеченная на геномном уровне, транслируется на уровень РНК, и расширенное изучение ПГЭ позволяет открывать новые биологические факторы, имеющие прогностическое значение при ММ.

В большинстве молекулярных классификаций, созданных на основе различных ПГЭ, определены специфические генетические «подписи», ассоциирующиеся с конкретной транслокацией IGН или статусом пloidности, а также с характерным клиническим поведением.

Как следствие геномной и транскрипционной гетерогенности, также существенно различаются и профили иммунофенотипической экспрессии клональных ПК ММ. Важно отметить, что уже установлены корреляции различных исходов и даже различных цитогенетических профилей с наличием или отсутствием различных антигенов.

Прогресс в технологии проточной цитометрии в последнее время привел к значительному совершенствованию иммунофенотипических исследований ПК ММ, которые позволили открыть существование четко различающихся функциональных субклонов. Одним из примеров таких субклонов служат ЦОК ММ. Установлено, что ЦОК присутствуют в подавляющем большинстве случаев ММ (80%), а также в большом числе (20%) «тлеющих» процессов и МГНЭ (Paiva, Leukemia 2011). Возможным объяснением рециркуляции клональных ПК на ранних стадиях заболевания (например, МГНЭ) может служить пожилой возраст больных МГНЭ, что приводит к снижению числа имеющихся ниш в КМ. Однако нам не удалось установить какие-либо корреляции между наличием клональных ПК в периферической крови и возрастом больных, что оставляет открытым вопрос о точном биологическом значении ЦОК при ММ.

It is sticking to see that for an end-stage population, there is still significant cell heterogeneity. At the phenotypic level, normal PCs show heterogeneous expression of CD45 and CD19, harbor a small subpopulation positive for CD20 and despite an homogeneous bright expression of CD81, approximately 5% of total normal PCs lack this tetraspanin. Other markers such as CD56 and CD28 expression is observed in a small subset of non-neoplastic plasma cells (between 5–20% of all plasma cells). That notwithstanding, disease related PCs also show severe heterogeneity. Focusing on MM PCs, the study of sequential samples by SNP-arrays and WGS has demonstrated three distinct patterns of genomic evolution: the stable genomes without differences between diagnosis and relapse clones; the linear evolution in which the relapse clone apparently derives from the major subclone at diagnosis, but continues to diversify through additionally acquired lesions; and the branching (nonlinear) model where the relapse clone clearly derives from a minor subclone, barely present at diagnosis. The clonal heterogeneity observed at the genomic level translates into the RNA level, and massive GEP has allowed the recognition of new biological findings with prognostic impact in MM. Most of the molecular classifications based on different gene expression profiles displays specific genetic signatures associated with a particular IGH translocation or ploidy status and with a characteristic clinical behavior. Consequent with the genomic and transcriptomic heterogeneity, also the immunophenotypic expression profiles of MM clonal PCs greatly differ. Importantly, the presence or absence of different antigens has already been correlated with different outcome and even different cytogenetic profiles.

Given the recent advance on flow cytometry technology, immunophenotypic studies on MM PCs have remarkably improved, and led to the identification of distinct functional subclones. One example of such subclones is MM circulating tumor cells (CTCs). We have recently observed that CTCs are present in the vast majority of MM patients (80%), and also in a significant number of smoldering and MGUS (20%) cases (Paiva, Leukemia 2011). A potential explanation for the recirculation of clonal PC in the early stages of the disease (e.g. MGUS) could rely on the advanced age of MGUS patients, which could lead to lower numbers of available BM niches. However, we failed to show any correlation between the presence of clonal PC in PB and patients' age, which left us with the following question: what is the precise biological significance of CTCs in MM?

Предварительное фенотипическое сравнение ПК КМ и ЦОК у одних и тех же больных показало, что клональные ПК периферической крови имеют несколько менее зрелый иммунофенотипический профиль (например, более низкие уровни внутренней сложности и более низкие уровни экспрессии CD38, CD138 и CD40). Интересно, что клонотипические клетки с менее зрелым фенотипом постоянно обнаруживаются в периферической крови больных миеломой, и снижение экспрессии CD138, отмеченное на клональных ПК периферической крови, может означать, что они обогащены клоногенными клетками, что согласуется с обнаружением свойств стволовых клеток среди иммунофенотипических свойств клональных ПК.

Несмотря на все вышесказанное, биологические характеристики ЦОК ММ еще плохо изучены, и многие вопросы остаются открытыми, например: 1) Все ли клональные ПК КМ способны выходить в периферическую кровь или только их специфические субпопуляции? 2) Все ли ЦОК обладают свойствами стволовых клеток или они обогащены клоногенными клетками? и 3) Влияют ли циркадные ритмы на ЦОК (аналогично CD34+ гематопозитическим стволовым клеткам)?

Таким образом, можно предположить, что небольшая фракция клональных ПК, которая покидает КМ и циркулирует в периферической крови больных МГНЭ и ММ, может представлять специфический субклон, потенциально обладающий некоторыми типичными характеристиками стволовых клеток (нахождение в покое, хеморезистентность и способность к самообновлению) и является причиной первичного распространения заболевания (МГНЭ) или поздних (экстрamedулярных) рецидивов заболевания (ММ). В период 2012–2013 гг. мы провели углубленное изучение биологических и функциональных характеристик ЦОК, анализируя фенотипические, цитогенетические и циркадные свойства ЦОК у больных ММ и сравнивая их с клональными ПК КМ.

В группе из 32 больных с впервые диагностированной ММ мы показали, что миеломные ЦОК имеют уникальный иммунофенотипический профиль экспрессии белков. По сравнению с клональными ПК КМ, ЦОК ММ показали снижение экспрессии интегринов CD11a, CD11c, CD29, CD49d и CD49e, а также молекул адгезии CD33 и CD56 и рецептора фактора стволовых клеток CD117. На ЦОК определялось типичное снижение уровня экспрессии CD138. В то же время не выявлено различий в экспрессии других маркеров, связанных с созревaniem, таких как CD19, CD20, CD27, CD45 и CD79b, а также рецептора 4 хемокина SDF-1 (CXCR4). Сравнение иммунофенотипических профилей экспрессии ЦОК и клональных ПК КМ у больных показало, что ЦОК постоянно демонстрировали совпадение фенотипических характеристик с клональными ПК КМ; однако у большинства больных ЦОК образовывали кластеры в уникальной ограниченной области, занятой клональными ПК КМ, тогда как в единичных остальных случаях ЦОК распределялись по всему компартменту клональных ПК КМ.

A preliminary phenotypic comparison between BM vs patient-matched CTCs showed that PB clonal PC displayed a slightly more immature immunophenotypic profile (e.g. lower internal complexity and lower expression of CD38, CD138 and CD40). Interestingly, clonotypic cells with a more immature phenotype have been repeatedly found in the PB of patients with myeloma, and the decreased CD138 expression we noted on circulating PB clonal PC could also indicate they are enriched in clonogenic cells, in line with the previously reported immunophenotypic properties of clonal PC showing stem cell properties.

Despite all the above, the biological characteristics of MM CTCs remained largely unexplored with many unanswered questions e.g.: i) Are all BM clonal PCs capable to egress into PB, or only a specific subpopulation? ii) Do CTCs have stem cell-like features and are they enriched on clonogenic cells? or iii) Do circadian rhythms also affect CTCs (similarly to CD34+ hematopoietic stem cells; HSCs)?

Thus, we hypothesized that the small fraction of clonal PC that exit the BM and circulate in the PB of MGUS and MM patients may represent a specific sub-clone that potentially harbors some of the typical stem-cell characteristics (quiescent, chemoresistant and able of self-renewing), and are responsible for the initial spreading of the disease (MGUS) and late (extramedullary) relapse of the disease (MM). Between 2012 and 2013, we investigated in-depth the biological and functional characteristics of CTCs, by analyzing the phenotypic, cytogenetic, and circadian characteristics of CTCs from MM patients, and comparing them to patient-paired BM clonal PCs.

Based on 32 newly-diagnosed MM patients, we showed that myeloma CTCs display a unique immunophenotypic protein expression profile. Compared to BM clonal PCs, MM CTCs showed down-regulation of the CD11a, CD11c, CD29 CD49d and CD49e integrins, as well as of the CD33 and CD56 adhesion molecules, and the stem-cell factor receptor CD117. CD138 was typically underexpressed on CTCs. In turn, no differences were noted for other maturation-related markers such as CD19, CD20, CD27, CD45, and CD79b, as well as for the SDF-1 chemokine receptor 4 (CXCR4). Patient-based comparisons between the immunophenotypic expression profile of CTCs and BM clonal PCs revealed that CTCs consistently displayed overlapping phenotypic features with BM clonal PCs; however, in the majority of patients CTCs clustered in a uniquely restricted area of that occupied by BM clonal PCs, whereas in the few remaining cases CTCs were spread throughout the whole BM clonal PC compartment.

Эти результаты подтверждают предположение о том, что ЦОК представляют фенотипическое подмножество миеломных ПК в КМ с более низким уровнем экспрессии интегрина и молекул адгезии и, как следствие, менее выраженную зависимость от ниш стромальных клеток КМ и более выраженную способность выходить в периферическую кровь.

Интересно отметить, что CD81 – тетраспанин, участвующий в активации и пролиферации В-клеток, также имел низкий уровень экспрессии на ЦОК. CD81 является более ранней молекулой пути В-клеточного корцептора, которая также участвует в сигнальных путях и активации В-клеток. Мы показали недавно, что экспрессия CD81 в ПК КМ при ММ ассоциируется с повышением индекса пролиферации и, что согласуется с этими результатами, ЦОК ассоциируются со спокойным состоянием и значительным снижением уровня пролиферирующих клеток по сравнению с клональными ПК КМ (медиана 0,8% против 0%; диапазон 0,5% – 5% против 0% – 0,8%; $P = 0,005$).

Сравнение иммунофенотипических профилей экспрессии клональных ПК КМ и ЦОК указывает, что, по крайней мере, у большого процента больных ЦОК представляют уникальную субпопуляцию компартмента клональных ПК всего КМ. Для дальнейшего анализа этих данных мы исследовали определенные хромосомные aberrации в FACS-отсортированных клональных ПК КМ высокой степени очистки у 5 больных. Анализ методом FISH FACS-отсортированных ЦОК высокой степени очистки и парных клональных ПК КМ показал, что эти две опухолевые субпопуляции имеют различные цитогенетические профили у большинства больных ММ. Что особенно интересно, несмотря на наличие общих цитогенетических предков, клональные ПК КМ систематически проявляли более одного цитогенетического изменения, которые не определялись в ЦОК. Эти предварительные результаты показали, что ЦОК могут иметь цитогенетический профиль, отличный от клональных ПК КМ, и что необходимо продолжить исследования с использованием более широкого диапазона новейших геномных методов.

Несмотря на то, что ЦОК в основном находятся в состоянии покоя, они должны проявлять определенный потенциал к экспансии, если участвуют в процессе «метастазирования»/диссеминации миеломы. В этом случае ЦОК должны обладать клоногенным потенциалом, когда после этапа циркуляции в периферической крови они снова попадут в другую область КМ. Для моделирования этого процесса мы культивировали ЦОК 10 разных больных со стромальными клетками КМ; через 14 дней в существенном проценте случаев наблюдались колонии и/или кластеры клеток, происходивших из ЦОК. В свою очередь, в идентичном числе случаев при культивации в аналогичных условиях клональные ПК КМ образовали меньше колоний и кластеров у меньшего числа больных. Эти предварительные результаты *in vitro* дают основания считать, что фракция клональных ПК, покинувшая КМ и перешедшая в периферическую кровь (ЦОК), может обогащаться клоногенными клетками, но также и то, что клоногенные клетки встречаются относительно редко среди общего числа миеломных клеток, особенно в КМ.

These results support the hypothesis that CTCs represent a phenotypic subset of BM myeloma PCs with lower expression of integrin and adhesion molecules and consequently a lower dependence on BM stromal cell niches would have an enhanced capacity to egress into PB.

Of note, CD81 – a tetraspanin involved in B-cell activation and proliferation — was also down-regulated in CTCs. CD81 is an upstream molecule of the B-cell coreceptor which is also involved in B-cell signaling and activation; interestingly, we have recently described that CD81 expression in MM BM PCs is associated with an increased proliferation index, and in line with these findings, CTCs were associated with a quiescent state, and a markedly reduced number of proliferating cells as compared with paired BM clonal PCs (median of 0.8% vs. 0%; range 0.5% – 5% vs. 0% – 0.8%; $P = 0.05$).

The comparison between the immunophenotypic expression profiles of BM clonal PCs and CTCs suggested that, at least in a large subset of patients, CTCs would represent a unique subset of the whole BM clonal PC compartment. To build up on these observations, we investigated a selected number of chromosomal abnormalities in highly-purified FACS-sorted BM clonal PCs and CTCs from 5 patients. FISH analysis on highly purified FACS-sorted CTCs and their paired BM clonal PCs, unraveled a different cytogenetic profile between the 2 tumor subpopulations in most MM patients analyzed. Most interestingly, despite a common cytogenetic background, BM clonal PCs showed systematically > 1 cytogenetic alteration which was not detected in CTCs. These preliminary results illustrate that CTCs may have a different cytogenetic profile as compared with BM clonal PCs, and highlight the need for further investigations using novel and wider genomic techniques.

Though CTCs were mostly quiescent, they should display some potential to expand if they are involved in the myeloma “metastatic”/dissemination process. In such case, CTCs should have clonogenic potential when, after circulating in PB, they home again into the BM at a different location. To mimic this process, we co-cultured CTCs from 10 different patients with BM stromal cells; after 14 days, colonies and/or clusters derived from CTCs were observed in a significant proportion of cases. In turn, identical numbers of paired BM clonal PCs showed lower numbers of colonies and clusters restricted to fewer patients when cultured in identical conditions. These initial results obtained *in vitro* suggest that the fraction of clonal PCs that exit the BM into the PB (CTCs) could be enriched on clonogenic cells, but also that clonogenic cells are relatively rare among all myeloma tumor cells, particularly in the BM.

И, наконец, исследование циркадного ритма миеломных ЦОК показало удивительный результат: мы наблюдали выраженные флуктуации абсолютного числа ЦОК в периферической крови больных ММ в течение суток, при этом пик приходился на период с 4 часов утра до 12 часов дня, а минимальный уровень – с 4 часов вечера до 12 часов ночи. Эти результаты, хотя и носят предварительный характер, указывают, что аналогично CD34+ гематопоэтическим стволовым клеткам, ЦОК ММ могут выходить в периферическую кровь больных в период без лечения и колонизировать/метастазировать в другие отделы КМ или экстрамедуллярные ткани. Также представляется, что транспорт ЦОК модулируется уровнем SDF1, который вместе с уровнем экспрессии CXCR4 на поверхности ПК флуктуирует в зеркальном отражении по отношению к абсолютному числу ЦОК ММ. Необходимо продолжить исследования для более полного изучения механизмов модуляции транспорта ЦОК, а также для ответа на вопрос, является ли он специфическим биологическим свойством течения ММ или наоборот, вторичным проявлением нормального циркадного ритма, обычно присущего нормальным миелоидным стволовым клеткам.

В заключение, новые иммунофенотипические подходы позволили впервые показать, что ЦОК ММ представляют уникальную субпопуляцию клонональных ПК КМ, которая, по-видимому, обогащена преимущественно спящими клоногенными клетками — своими цитогенетическими предками, а также, что распространение в периферическую кровь носит циркадный характер, подобно CD34+ гематопоэтическим стволовым клеткам. Для подтверждения и углубленного анализа полученных результатов необходимо продолжить исследования с акцентом на специфическом транскриптомном и эпигенетическом профиле ЦОК, которые позволят разработать специфические методы терапии, направленной на эту субпопуляцию.

Finally, while investigating the circadian rhythm of myeloma CTCs, it was surprising to see the marked fluctuation of the daily absolute number of CTCs in the PB of MM patients, peaking between 4:00 AM and 12:00 PM, with a nadir between 4:00 PM and 12:00 AM. These results, although preliminary due to low patient number, suggest that similarly to CD34+ HSCs, MM CTCs may egress to PB during the patients' resting period to colonize/metastasize other sites in the BM or at extramedullary tissues. Moreover, the traffic of CTCs also seems to be modulated by SDF1 levels, which together with CXCR4 expression on the PC surface, fluctuated in a mirror basis with respect to the absolute number of MM CTCs. Subsequent studies are needed to fully elucidate the mechanisms modulating the traffic of CTCs, and to clarify whether this is specific MM biological behavior or instead, a secondary manifestation of normal circadian rhythms typically observed in normal myeloid stem cells.

In summary, novel immunophenotypic approaches have unravel for the first time that MM CTCs represent a unique subpopulation of clonal BM PCs, which seems to be enriched in mostly quiescent clonogenic cells, an ancestral cytogenetic background, and a circadian spread into PB that mimics that of CD34+ HSCs. Further investigations in larger series of patients are now warranted to confirm and extent on these findings, focusing on the specific transcriptome and epigenetic profile of CTCs, so that specific therapies targeting this subpopulation can be developed.

Литература / Literatures

1. *Ghobrial IM*. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*. Jul 5 2012;120(1):20–30.
2. *Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al*. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer cell*. Jan 13 2014;25(1):91–101.
3. *Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al*. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *The Journal of clinical investigation*. Apr 1 2013;123(4):1542–1555.
4. *Neben K, Jauch A, Hielscher T, et al*. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Dec 1 2013;31(34):4325–4332.
5. *Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, et al*. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood*. Jan 2 2014;123(1):78–85.
6. *Fernandez de Larrea C, Kyle RA, Durie BG, et al*. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. Apr 2013;27(4):780–791.
7. *Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, et al*. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia*. Dec 1998;12(12):1977–1982.
8. *Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, et al*. CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *British journal of haematology*. Apr 2003;121(1):36–43.
9. *Kraj M, Kopec-Szlezak J, Poglod R, Kruk B*. Flow cytometric immunophenotypic characteristics of 36 cases of plasma cell leukemia. *Leukemia research*. Feb 2011;35(2):169–176.

10. *Oliveira AM, Maria DA, Metzger M, et al.* Thalidomide treatment down-regulates SDF-1alpha and CXCR4 expression in multiple myeloma patients. *Leukemia research*. Jul 2009;33(7):970–973.
11. *Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, et al.* Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood*. Feb 1 1999;93(3):1032–1037.
12. *Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, et al.* Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*. May 2008;22(5):1044–1052.
13. *Usmani SZ, Nair B, Qu P, et al.* Primary plasma cell leukemia: clinical and laboratory presentation, gene-expression profiling and clinical outcome with Total Therapy protocols. *Leukemia*. Nov 2012;26(11):2398–2405.
14. *Chaidos A, Barnes CP, Cowan G, et al.* Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood*. Jan 10 2013;121(2):318–328.
15. *Paiva B, Paino T, Sayagues JM, et al.* Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. Nov 21 2013;122(22):3591–3598.
16. *Morgan GJ, Walker BA, Davies FE.* The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*. May 2012;12(5):335–348.
17. *Paiva B, Perez-Andres M, Vidriales MB, et al.* Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia*. Apr 2011;25(4):697–706.
18. *Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, et al.* Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. Oct 1 2005;106(7):2276–2279.
19. *Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, et al.* Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Mar 20 2010;28(9):1606–1610.
20. *Merz M, Hielscher T, Wagner B, et al.* Predictive value of longitudinal whole-body magnetic resonance imaging in patients with smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. Feb 18 2014.
21. *Hillengass J, Weber MA, Kilk K, et al.* Prognostic significance of whole-body MRI in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*. Jan 2014;28(1):174–178.
22. *Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al.* Prognostic relevance of 18-F

FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood*. Dec 1 2011;118(23): 5989–5995.

23. *Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA, et al.* Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Aug 20 2005;23(24):5668–5674.
24. *Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, et al.* High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. Mar 2013;27(3):680–685.
25. *Blade J, Fernandez de Larrea C, Rosinol L, Cibeira MT, Jimenez R, Powles R.* Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Oct 1 2011;29(28):3805–3812.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Энди С. Роустрон

**МИНИМАЛЬНОЕ ОСТАТОЧНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ
КАК КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ:
ОБНОВЛЕННЫЕ ДАННЫЕ
ОБЩЕСТВЕННОГО РАБОЧЕГО СОВЕЩАНИЯ В USFDA**

Институт онкологии Сент-Джеймса, Учебные клиники Лидса, Фонд НСЗ

Введение

Разработан ряд новых препаратов, обладающих потенциальной эффективностью в лечении ХЛЛ. Применяющиеся в настоящее время терапевтические средства позволяют получить клинический эффект у большей части пациентов. Однако высокие показатели результатов стандартной терапии могут быть доказаны, только если в качестве единственных критериев оценки в клинических исследованиях новых препаратов используются показатели ОБ и выживаемость без прогрессирования заболевания, при этом на проведение рандомизированного исследования III фазы может потребоваться от 5 до 10 лет.

Для того, чтобы новые эффективные препараты могли поступить в клиническую практику как можно раньше, USFDA разрешает регистрировать новые препараты по ускоренной программе с применением суррогатных критериев, способных с высокой вероятностью предсказывать клиническую пользу. Любой биомаркер, который потенциально может служить суррогатным критерием, должен отвечать строгим квалификационным требованиям, и тогда клиническая польза будет подтверждена как вторичный критерий оценки. Имеются сообщения о том, что уровни МОЗ, выявляемые иммунофенотипическими методами, лучше предсказывают клинический исход при отсутствии морфологических признаков заболевания, чем обычные критерии оценки эффекта.

В нашей работе обсуждаются схема квалификации биомаркеров и данные об использовании МОЗ как критерия оценки при ХЛЛ, представленные на общественном рабочем совещании FDA 27 февраля 2013 г. Его открыли представители FDA, рассказавшие о требованиях, которым должны соответствовать биомаркеры для использования в качестве суррогатных критериев в клинических исследованиях. После этого были представлены следующие данные: снижение МОЗ до уровня ниже стандартного порога является независимым предиктивным фактором клинической пользы. И наконец, были рассмотрены технические аспекты высокочувствительных методов определения МОЗ.

Регуляторные вопросы и их предпосылки

Доктор Альберт Диссерот (Albert Deisseroth) из отделения гематологических препаратов представил данные о клинической пользе, необходимые для регистрации новых препаратов USFDA. В компетенцию последнего входит регистрация новых препаратов на основании данных об эффективности при

приемлемой безопасности, полученных в результате проведения адекватных, хорошо контролируемых исследований, и возможности определения показаний к применению препарата в соответствующей популяции больных, а также предоставление адекватной информации, обеспечивающей безопасное и эффективное применение и назначение препаратов. В рамках своих обязанностей FDA обладает определенной свободой в принятии научных решений по определению типа и качества данных и информации, которые следует представить, чтобы заявленный на регистрацию препарат отвечал установленным стандартам. В качестве научного обоснования возможности использования МОЗ в качестве оценочного критерия были продемонстрированы примеры определения вирусной нагрузки при ВИЧ и количественного определения мРНК bcr-abl при ХМЛ. В случае ВИЧ до 1996 г. применяли следующие клинические критерии: снижение уровня CD4 Т-клеток, новые инфекции условно патогенных возбудителей или летальный исход. Появление надежных методов анализа мРНК ВИЧ послужило стимулом для использования «молекулярных» критериев, позволяющих начать лечение до развития заболеваний, вызванных условно патогенными микроорганизмами. USFDA провело анализ данных более 5000 больных, участвовавших в клинических исследованиях, которые показали, что снижение вирусной нагрузки через короткий промежуток времени коррелирует с устойчивой ремиссией, повышением выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости. К 1996 г. мониторинг РНК ВИЧ для определения вирусной нагрузки в реальном времени стал стандартным методом, и Консультативный комитет USFDA квалифицировал определение вирусной нагрузки через 24 недели в качестве критерия оценки в рамках программы ускоренной регистрации, а показатели через 48 недель – в качестве критерия для обычной регистрации. В случае ХМЛ было показано, что определение мРНК bcr-abl в периферической крови вскоре после проведения терапии является предиктивным фактором исхода в долгосрочной перспективе, и в 2003–2005 гг. эти методы были гармонизированы. По прошествии 7–8 лет результаты многочисленных клинических исследований подтвердили, что молекулярный эффект через 3–18 мес после начала терапии Иматинибом коррелирует с клиническим исходом, и высокий молекулярный эффект (т.е. снижение числа копий гена bcr-abl в периферической крови более, чем на 3 log) был принят в качестве основного критерия в регистрационном исследовании Нилотиниба.

С учетом этих двух ситуаций началась работа по подготовке к принятию МОЗ в качестве стандартного критерия оценки в клинических исследованиях с последующей разработкой и стандартизацией соответствующих методов анализа для его определения. Предстоит определить эффективность стандартизированных методов в проспективных клинических исследованиях, и если будет подтверждена эффективность МОЗ как предсказательного фактора клинической пользы, то этот показатель можно будет использовать в качестве суррогатного критерия в клинических исследованиях по программе ускоренной регистрации.

Доктор Роберт Беккер (Robert Becker) из отдела регулирования медицинских средств сообщил о необходимости регистрации диагностического метода или способа определения МОЗ *in vitro*. Для квалификации биомаркера необходимо представить пакет данных, демонстрирующих «интерпретируемое значение» результатов аналитического метода, который в дальнейшем может широко применяться в других клинических исследованиях. Квалифицированный биомаркер должен идентифицироваться раньше, чем стандартные показатели выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости. Также должна быть показана сильная корреляция с этими клиническими показателями. В связи с тем, что квалифицируется биомаркер, а не конкретный метод анализа, регуляторными органами не будет предъявляться специфических требований для регистрации к таким методам, хотя, тем не менее, ожидается наличие убедительных доказательств аналитических возможностей метода по результатам применения в каком-либо исследовании. В частности, необходимо будет провести стандартизацию, валидацию и документирование либо зарегистрированного диагностического метода *in vitro*, либо согласованной парадигмы исследования, в том числе – все необходимые валидационные и контрольные мероприятия, необходимые для подтверждения приемлемых возможностей метода.

Специфический валидированный метод анализа, скорее всего, подойдет для конкретной ситуации заболевание – лечение, тогда как подходящий биомаркер будет отражать характеристику заболевания, которую можно измерять разными методами, однако при этом необходимо определить «золотой стандарт» для валидации методов анализа, и данный биомаркер должен подходить для использования в разных клинических ситуациях.

Доктор Марк Ротман (Mark Rothman) посвятил свое выступление вопросам валидации суррогатных критериев. Суррогатный критерий должен коррелировать с клиническим исходом на уровне больного независимо от метода лечения и должен полностью отражать чистое влияние лечения на клинический исход. Докладчик рассмотрел пример определения CD4 клеток и вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных. Число CD4 клеток — биомаркер, который предсказывает инфекцию условно патогенных организмов, но не является показателем течения заболевания, а скорее служит вторичной мерой активности заболевания. Вирусная нагрузка ВИЧ представляет прямую меру активности заболевания и фактором прогноза снижения числа CD4 клеток. Вирусная нагрузка у ВИЧ-инфицированной матери является фактором прогноза риска передачи инфекции от матери к ребенку, тогда как число CD4 клеток в организме матери таким свойством не обладает. Таким образом, вирусная нагрузка ВИЧ отражает течение заболевания и коррелирует с клиническим исходом в тех условиях, когда число CD4 клеток не обладает этими свойствами, и следовательно, вирусная нагрузка ВИЧ является более подходящим биомаркером для оценки потенциальной клинической пользы лечения, чем изменение числа CD4 клеток.

Биомаркер, подходящий для использования в качестве суррогатного критерия в клинических исследованиях, должен отражать понимание патологического процесса так, чтобы изменения его значений могли бы предсказывать значимую клиническую пользу, причем должна быть установлена сильная корреляция между изменениями величины биомаркера и клинической пользой по результатам нескольких рандомизированных клинических исследований.

***Состояние оценки МОЗ при ХЛЛ в настоящее время:
наличие тесной связи между МОЗ статусом
и улучшением клинического результата***

Доктор Паоло Гиа (Paolo Ghia) открыл очередное заседание докладом о клинических данных, подтверждающих возможность использования МОЗ в качестве критерия оценки в клинических исследованиях. Он указал, что степень эффекта в течение многих лет считалась лучшим маркером прогноза исхода, и применяющиеся в настоящее время терапевтические подходы, такие как FCMR, дают эффект у более 80% ранее нелеченных больных. Д-р Гиа сделал обзор клинических исследований по оценке МОЗ при ХЛЛ и подчеркнул тот факт, что клиническая ремиссия при отсутствии МОЗ определяется как выявление в крови или костном мозге менее одной клетки на 10 000 или 10^4 лейкоцитов. Докладчик рассмотрел вопросы применения различных методик проточной цитометрии и ПЦР, а также преимущества и недостатки каждого метода. Количественная ИГХ-ПЦР является методом, специфичным для больного, и имеет предел определения 0,001%, может применяться у 90% пациентов, но требует наличия материала для анализа, полученного до лечения. Предпочтительнее использовать свежие срезы, но также можно исследовать образцы, полученные более чем за 48 часов до анализа. Проточно-цитометрическое определение МОЗ является методом, специфичным для заболевания, и не требует материала, полученного до лечения. Проточная цитометрия может применяться более чем в 95% случаев (все больные с типичным фенотипом), но требует материала, полученного менее чем через 48 часов до анализа. Перспективным подходом представляется высокоэффективное секвенирование, т.к. этот метод объединяет в себе преимущества real time PCR без необходимости использования пациент-специфических праймеров, однако эта технология пока не валидирована. И, наконец, д-р Гиа подтвердил эффективность МОЗ как суррогатного маркера исхода, продемонстрировав связь между улучшением клинического исхода и снижением МОЗ до уровня ниже 0,01%.

Доктор Себ Боттхер (Seb Böttcher) сделал доклад об оценке МОЗ в немецком исследовании CLL8 по оценке режимов флударабин-циклофосфамид (FC) и FC-ритуксимаб при ХЛЛ. Результаты проведенного исследования подтвердили, что МОЗ является независимым прогностическим фактором для выживаемости без прогрессирования заболевания и ОВ при многофакторном анализе.

Следует подчеркнуть, что тип лечения, который обладает высокой значимостью для прогноза исхода по результатам однофакторного анализа, теряет статистическую значимость после корректировки с учетом статуса МОЗ: исход для больных с МОЗ⁺ статусом после лечения FC был таким же, что и после лечения режимом FCR.

Доктор Билл Вьерда (Bill Wierda) из M.D. Andersson Center сообщил об опыте США в оценке МОЗ после химиоиммунотерапии. Несмотря на то, что результаты пока не могут быть опубликованы, т.к. являются частью продолжающегося клинического исследования, имеющиеся на настоящее время данные с высокой степенью значимости подтверждают возможность использования статуса МОЗ как суррогатного критерия.

Доклад доктора Эмили Монсеррат (Emili Montserrat) был посвящен опыту барселонского центра, в котором 255 больных проходили лечение с применением разных режимов, в том числе хлорамбуцил, СНОР, РА, FC(M) и (FC(M)-R. Результаты показали повышение клинической эффективности за последние двадцать лет и еще раз продемонстрировали, что МОЗ является независимым прогностическим фактором для оценки выживаемости без лечения и ОВ.

Профессор Питер Хиллмен (Peter Hillmen) рассказал об опыте Великобритании. МОЗ является мощным прогностическим фактором исхода по данным нескольких клинических исследований, а также независимым предиктивным фактором исхода у больных, получавших различные режимы лечения.

Доктор Джон Бирд (John Byrd) из Университета штата Огайо высказал особую точку зрения на значение оценки МОЗ в контексте новых препаратов, подавляющих сигнальный путь рецептора В-клеток (BCR), таких как GS-1101 и Ибрутиниб.

Эти новые препараты продемонстрировали эффективность по показателю контроля заболевания и очень высокую выживаемость без прогрессирования даже среди пациентов из когорты лиц высокого риска, определяемой по наличию немутированного IGHV, делеции 17p или делеции 11q. Однако кинетика эффекта этих новых ингибиторов сильно отличается от таковой при использовании обычной химиотерапии и характеризуется первоначальным перераспределением клеток ХЛЛ из лимфоузлов в периферическую кровь. В результате часто наблюдается значительное повышение уровня лимфоцитов в периферической крови в первые несколько месяцев с последующим постепенным снижением в последующие месяцы и годы.

Относительно небольшое число больных достигает обычной ремиссии, тогда как у большинства отмечается персистирующий лимфоцитоз. Д-р Бирд указал, что определение МОЗ имеет значение для терапевтических стратегий, требующих эрадикации заболевания, но не обязательно для стратегий, предусматривающих контроль за ним, и предложил считать МОЗ факультативным, но не обязательным критерием.

И, наконец, доктор Нил Кей (Neil Kay) рассказал о клинических протоколах, которые в настоящее время находятся в стадии разработки, и отметил, что МОЗ займет центральное место в анализах, предусмотренных будущими исследованиями.

***Определение МОЗ методом проточной цитометрии:
технические вопросы***

Для квалификации биомаркера помимо демонстрации клинической пользы необходимо наличие одного и более надежных методов количественного определения этого биомаркера. Технические аспекты обеспечения надежного количественного определения МОЗ обсуждались в докладах Энди Роустрона (Andy Rawstron), Меризлис Стетлер-Стивенсон (Maryalice Stetler-Stevenson) и Джерарда Лозовски (Gerard Lozonski).

Консорциум Европейской исследовательской инициативы при ХЛЛ (ERIC) в течение более десяти лет проводит работу по разработке аналитических методов для определения МОЗ при ХЛЛ, и обзор полученных данных подтверждает, что мультипараметрическая проточная цитометрия вполне подходит для количественного определения ХЛЛ до 0,01% (10^{-4}). Валидирован ряд методов с использованием от 4 до 6–8 цветов с использованием одних и тех же основных антител, многие из которых используются в постановке диагноза в течение десятилетий. Оценку приемлемых погрешностей проводили путем сравнения предсказательной значимости определения МОЗ после добавления в разной степени случайных ошибок. Для существенного повышения выживаемости (например, более 1 года) требуется снижение ХЛЛ на $> 1 \log$, поэтому погрешность в определении до 0,5 log (например, 0,01% = 0,005 – 0,05%) не влияет на прогноз исхода. Дальнейший анализ данных по контаминации, полученных в различных лабораториях, показал, что аналитические погрешности, обусловленные проведением анализа в разных лабораториях, попадают в приемлемый диапазон. И, наконец, были представлены первые данные, которые дают основания ожидать появления в ближайшем будущем материала о проверке квалификации (EQA).

В отношении более специфических аспектов применения методов анализа МОЗ в клинических исследованиях отмечалось, что необходим ХЛЛ-специфичный метод количественного определения, а не качественные подходы, основанные на клональности. Материал, полученный до лечения, должен в идеале подходить для мониторинга МОЗ. Для получения воспроизводимого предела обнаружения 0,01% выявление методом проточной цитометрии 20–50 событий с ХЛЛ-подобным фенотипом вполне вероятно будет представлять популяцию ХЛЛ, однако воспроизводимость этих результатов будет ниже, чем при установленном минимуме 50 событий. В идеале будет применяться контроль контаминации (CD3) для результатов на уровне 0,005–0,05%.

Необходимо проводить независимую валидацию результатов либо с использованием частичного избыточного контроля с 4/6 цветами по нескольким пробиркам, либо с независимой подготовкой пробирок, либо валидации независимым методом, например, RQ-ASO IGH-PCR. Если клиническое решение принимается по результату определения МОЗ, до начала лечения потребуется несколько положительных тестов в разных временных точках, указывающих на повышение уровня МОЗ. Могут потребоваться дополнительные исследования для определения альтернативных маркеров гейтирования В-клеток с появлением препаратов, направленных на CD19.

Минимальное остаточное заболевание как суррогатный критерий при ХЛЛ

Накоплен существенный массив данных, указывающих, что снижение количества клеток ХЛЛ до уровня ниже 0,01% (1 клетка ХЛЛ на 10 000 или 10^{-4}) является независимым предсказательным фактором повышения выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости. МОЗ не всегда подходит для всех клинических условий: так, ингибиторы сигнальных путей В-клеточных рецепторов могут давать клиническую пользу без эрадикации заболевания. Однако для подходов, направленных на эрадикацию заболевания, уровень МОЗ, определенный высокочувствительными количественными методами, такими как проточная цитометрия или RQ-ASO IGH-PCR, может представлять надежный критерий в клинических исследованиях. Такие методы могут применяться в специализированных лабораториях, но используются в большинстве стран, что позволяет проводить многоцентровые международные исследования с использованием МОЗ как оценочного критерия при условии, что будут предприняты достаточные шаги для обеспечения согласованности между центрами; решению этой задачи будет способствовать получение стабилизированных образцов для проверки квалификации в ближайшем будущем. Обсуждались вопросы оптимального времени забора образцов и материала для определения МОЗ, и хотя имеются данные, указывающие, что оптимальной процедурой является забор периферической крови через 6 мес после окончания лечения, большинство имеющихся данных было получено на основании исследовании аспиратов костного мозга, отобранных для обычной оценки эффекта. **Представленные доводы убедительно доказали возможность использования уровня МОЗ как суррогатного критерия в клинических исследованиях, которые проводятся для регистрации новых препаратов для лечения ХЛЛ.**

A.A. Ван де Лоосдрехт, Т.М. Вестерс

РОЛЬ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

*Отделение гематологии, Амстердамский онкологический центр,
Университетский медицинский центр, Амстердам, Нидерланды*

ПЦ признана одним из важных инструментов в диагностике МДС, особенно в тех, случаях, когда цитоморфологическое и цитогенетическое исследования не позволяют сделать определенное заключение. Международное рабочее совещание Европейской сети лейкозов по стандартизации ПЦ при МДС предложило минимальные требования для анализа дисплазии методом ПЦ. Последняя должна входить в интегрированную схему диагностики как ее составная часть, а не как самостоятельный метод исследования. В данной работе рассматриваются вопросы применения ПЦ в диагностике МДС. Также рассмотрены последние достижения в применении ПЦ для диагностики и прогноза МДС.

Введение

Цитоморфологическое исследование считается основным методом в диагностике МДС, однако его результаты могут быть неоднозначными, особенно в случаях низкого уровня бластов и слабовыраженных признаков дисплазии. В частности, у больных с цитопенией и нормальной или неоднозначной морфологией и нормальной цитогенетикой, необходимо исследовать дополнительные диагностические маркеры. Ключевую роль в этом случае может сыграть ПЦ. Проточная цитометрия применяется в диагностике МДС как важный дополнительный критерий. Более того в последнее время этот метод рекомендован к применению в диагностике МДС в клиническом руководстве «Стандартизация ПЦ при МДС» Рабочей группы Европейской сети лейкозов (ELNet) [1–4]. В этом документе ELNet приводятся рекомендации по применению ПЦ (т.е. такие технические вопросы, как подготовка образцов, настройка приборов и оценка качества, получение данных и стратегия гейтирования). Рабочая группа ELNet также разработала минимальные критерии для диагностики и прогноза МДС и других форм цитопении [2; 3].

Анализ клеток костного мозга методом ПЦ позволяет идентифицировать специфические aberrации как незрелых, так и зрелых клеток различных гематopoietических линий. В связи с тем, что понятие МДС объединяет разнородную группу миелоидных неоплазий, вряд ли можно дифференцировать МДС от других форм цитопении на основе всего одного маркера. Следовательно, наличие множественных aberrаций имеет большее предсказательное значение для МДС, чем единственная [5–8]. Это согласуется с рекомендациями ВОЗ 2008 г., в которых признается наличие трех и более aberrаций по ПЦ, характерных для МДС [9].

Как показали результаты многоцентрового исследования, проведенного ELNet, [10] применение только четырех параметров позволяет дифференцировать МДС низкого риска от неклональных цитопений без других специфических маркеров (т.е. цитогенетических или кольцевых сидеробластов).

Это следующие ключевые параметры:

- (1) повышение уровня $CD34^+$ клеток-предшественников среди нуклеарных клеток костного мозга ($\geq 2\%$);
- (2) снижение процента предшественников В-клеток в пуле $CD34^+$ клеток ($\leq 5\%$);
- (3) снижение или повышение экспрессии $CD45$ на миелоидных клетках-предшественниках по сравнению с лимфоцитами (≤ 4 или $\geq 7,5$);
- (4) снижение SSC нейтрофилов по сравнению с лимфоцитами (≤ 6).

Наличие двух и более из этих специфических aberrаций позволяет идентифицировать 70% случаев МДС низкого риска при специфичности метода 93% [10].

Ценную информацию может дать оценка aberrаций по данным ПЦ в миелоидных клетках предшественников и созревающих миеломоноцитах [5; 11]. Также дополнительную информацию может дать ПЦ эритроидной дисплазии, особенно в отношении МДС низкого риска [12–14].

ПЦ также применяется в ряде случаев для анализа линии мегакариоцитов, однако эти подходы пока не стандартизованы [15]. В следующем абзаце приводятся рекомендации для ПЦ-анализа при МДС.

Следует отметить, что оценка дисплазии методом ПЦ требует знания уровней экспрессии в соответствующих нормальных и патологических контрольных образцах костного мозга.

Оценка дисплазии

в компартменте незрелых миелоидных предшественников

Компартмент незрелых клеток отличается большой гетерогенностью. В связи с этим, помимо классического профиля $CD45^{dim}/SSC^{low/int}$, для идентификации миелоидных клеток-предшественников ($CD45^{dim}$ и $SSC^{low/int}$) среди других популяций, демонстрирующих наложение признаков $CD45^{dim}$ и $SSC^{low/int}$ (например, предшественники В-клеток, плазмоциты, монобласты, базофилы, эритробласты и предшественники плазмациитоидных дендритных клеток), требуются такие комбинации антител, как $CD45/CD34/CD117/HLA-DR$ и $CD45/CD34/CD123/HLA-DR$ [2].

При МДС aberrации в компартменте незрелых миелоидных клеток включают аномальную интенсивность или отсутствие экспрессии $CD45$, $CD34$, $CD117$, $HLA-DR$, $CD13$, $CD33$, асинхронное присутствие $CD11b$ и/или экспрессию таких маркеров линейной неверности как $CD5$, $CD7$ или $CD56$ [5; 7; 11; 12; 16–19].

Оценка дисплазии в компартменте нейтрофилов

Созревающие нейтрофилы распознаются по их профилю CD45^{int}SSC^{int-bright}. Другие маркеры, такие как CD33, CD64, HLA-DR и CD11b, полезны для определения моноцитов и гипогранулярных нейтрофилов. Нейтрофилы имеют пониженную экспрессию CD33 и CD64, гетерогенную до сильной экспрессию CD11b и практически отсутствие экспрессии HLA-DR по сравнению с CD33^{bright}, HLA-DR⁺ и CD11b⁺ моноцитами.

Одной из наиболее часто регистрируемых ПЦ-аббераций в компартменте созревающих нейтрофилов является аномальное снижение SSC, отражающее гипогранулярность (пример на рис. 1) [2]. Помимо снижения SSC диспластические нейтрофилы могут давать aberrантные уровни экспрессии определенных антигенов или aberrантное соотношение двух и более антигенов, например, aberrантное соотношение между CD13 и CD11b и/или CD13 и CD16 и между CD15 и CD10 (ibid) [2; 3].

Оценка дисплазии в компартменте моноцитов

При отсутствии выраженного моноцитоза морфологическая оценка дисмонопоэза при МДС затруднительна. Методом ПЦ моноциты можно определить на основе их экспрессии CD45 (промежуточная-яркая), SSC (яркое), и дополнительным маркерам, таким как HLA-DR, CD11b, CD64, CD36, CD33 и CD14. Применение одного CD14 может дать заниженную оценку процента моноцитов, особенно в случае присутствия незрелых форм. Абберации, представляющие интерес, в моноцитарной линии включают аномальное распределение стадий созревания, аномальное соотношение HLA-DR и CD11b, аномальную интенсивность CD13 и гиперэкспрессию CD56. CD56 (и CD2) могут помочь даже при дифференцировке ХММЛ и МДС/миелопролиферативных неоплазий [20; 21].

Оценка дисплазии в эритроидном компартменте

Эритроидную популяцию можно выявить по очень слабой до отрицательной экспрессии CD45 и низким FSC и SSC. Обычно используют маркеры CD45, CD71, CD235a, CD36, CD117 и, реже, CD105. Одной из наиболее часто наблюдаемых aberrаций (80% случаев МДС низкого риска) является повышение числа эритроидных клеток-предшественников, которое ассоциируется с увеличением пропорции незрелых эритроидных клеток (CD117⁺ или CD105⁺). Кроме того, приблизительно у 70% больных наблюдается аномальное соотношение CD71 и CD235a и/или пониженная экспрессия CD36 [7; 12–14; 22].

Проточная цитометрия и прогноз при МДС.

На сегодня единственной валидированной системой оценки прогноза методом ПЦ является система Wells et al. [5; 8; 19; 23]. По ней учитывают

процент миелоидных клеток-предшественников и их аберраций и количество аберраций в компартменте созревающих миеломоноцитов. В клинической практике широко применяют хорошо валидированные классификацию ВОЗ, Международную прогностическую шкалу (IPSS, IPSS-пересмотренная) и Прогностическую шкалу на основе ВОЗ (WPSS) [9; 24–26]. Интересно отметить, что в пределах подгрупп или групп риска оценки по шкалам ВОЗ, IPSS(-пересмотренной) и WPSS сильно различаются. Это значит, что ПЦ может идентифицировать больных с менее благоприятным прогнозом в пределах валидированных категорий риска.

Применение проточной цитометрии в прогнозе и мониторинге эффекта лечения

Анализ костного мозга методом ПЦ позволяет идентифицировать подгруппы МДС низкого и промежуточного-1 риска с определенными клиническими характеристиками в плане зависимости от трансфузий и прогрессирования [19]. Кроме того, в соответствии с моделью принятия клинических решений отсутствие аберрантных миелоидных клеток-предшественников по ПЦ в комбинации с низкими уровнями эндогенного эритропоэтина указывает на эффективность применения факторов роста [27]. Также установлено, что аберрантная экспрессия маркеров на миелоидных предшественниках позволяет идентифицировать группу больных, у которых будет эффективным лечение гипометилирующими препаратами (такими как азацитидин) при МДС промежуточного-2 и высокого риска [28]. Имеется небольшое количество данных, указывающих, что больные с полной ремиссией ОМЛ после высокодозной химиотерапии, но с дисплазией, по ПЦ могут иметь менее благоприятный клинический исход, обусловленный возможной персистенцией невыявленного (ранее) МДС. И, наконец, установлены специфические ПЦ-подписи в определенных цитогенетических подгруппах, таких как МДС с изолированной *del(5q)*. Эти подписи могут иметь значение для мониторинга при МДС на фоне лечения леналидомидом.

Заключительные замечания

Проточно-цитометрический анализ признан и даже рекомендован как диагностический инструмент при МДС при условии проведения анализа в соответствии с руководством ELNet [2; 3]. Следует отметить, что ПЦ при МДС можно применять только как часть интегрированного диагностического подхода. Результаты ПЦ можно использовать в дополнение для уточнения прогноза. В настоящее время проводятся исследования с целью оценки роли ПЦ в мониторинге течения заболевания у больных МДС (низкого риска) без лечения, а также в отборе больных, у которых может быть эффективным применение новых препаратов при МДС низкого и высокого риска.

Выражаем благодарность всем членам рабочей группы ELNet и Голландской рабочей группы МДС-ПЦ за вклад в разработку руководства ELNet по проведению ПЦ-анализа при МДС.

Литература

1. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007 Jun;31(6):727–36.
2. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager AM, Feuillard J, 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 Aug;94(8):1124–34.
3. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012 Jul;26(7):1730–41.
4. Malcovati L, Malcovati L, Bowen D, Cermak J, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults. Recommendations from the European Leukemia Net. Submitted for publication.
5. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003 Jul 1;102(1):394–403.
6. Arroyo JL, Fernandez ME, Hernandez JM, Orfao A, San Miguel JF, Del Canizo MC. Impact of immunophenotype on prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. Its value in patients without karyotypic abnormalities. *Hematol J* 2004;5(3):227–33.
7. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, Pascutto C, Vanelli L, Travaglino E, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2005 May;19(5):776–83.
8. Scott BL, Wells DA, Loken MR, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008 Oct 1;112(7):2681–6.

9. *Brunning R, Orazi A, Germing U, LeBeau MM, Porwit A, Baumann I, et al.* Myelodysplastic syndromes/neoplasms. In: Swerdlow et al., editor. WHO classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
10. *Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, et al.* Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 2012 Aug;97(8):1209–17.
11. *Tang G, Jorgensen JL, Zhou Y, Hu Y, Kersh M, Garcia-Manero G, et al.* Multi-color CD34(+) progenitor-focused flow cytometric assay in evaluation of myelodysplastic syndromes in patients with post cancer therapy cytopenia. *Leuk Res* 2012 Aug;36(8):974–81.
12. *Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, et al.* Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001 Aug 15;98(4):979–87.
13. *Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, et al.* Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006 Apr;20(4):549–55.
14. *Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, et al.* Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on A series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 May;78(3):154–68.
15. *Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, Chauffaille ML, Quijano S, Lopez A, et al.* Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2012 Jun;97(6):895–902.
16. *Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Taniguchi O, et al.* Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002 Dec 1;100(12):3887–96.
17. *Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, Andersen M, Xiao Z, Raza A, et al.* Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res* 2008 Feb;32(2):215–24.

18. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, *et al.* The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008 Jun;22(6):1175–83.
19. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VHJ, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008 Feb 1;111(3):1067–77.
20. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol* 2005 Nov;124(5):799–806.
21. Lacronique-Gazaille C, Chaury MP, Le GA, Faucher JL, Bordessoule D, Feuillard J. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica* 2007 Jun;92(6):859–60.
22. Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CS, Batista LS, Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res* 2007 Feb;31(2):147–55.
23. Chu SC, Wang TF, Li CC, Kao RH, Li DK, Su YC, *et al.* Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2011 Jul;35(7):868–73.
24. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997 Mar 15;89(6):2079–88.
25. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012 Sep;120(12):2454–65.
26. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, *et al.* Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007 Aug 10;25(23):3503–10.
27. Westers TM, Alhan C, Chamuleau MED, van der Vorst MJDL, Eeltink C, Ossenkoppele GJ, *et al.* Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood* 2010 Mar 4;115(9):1779–84.
28. Alhan C, Westers TM, van der Helm LH, Eeltink C, Santini V, Ossenkoppele GJ, *et al.* Absence of Aberrant Myeloid Progenitors by Flow Cytometry Is Associated with Favorable Response to Azacitidine in Int-2 and High Risk Myelodysplastic Syndromes. 2013. Submitted for publication.

*K. Vilchevska, V. Konashenkova, I. Bakhchyvandzhy,
A. Ryabko, N. Lobkina, O. Melnik*

ANTIGEN EXPRESSION HETEROGENICITY USED FOR MRD MONITORING IN B-LYMPHOBLASTIC LEUKOSIS

SI "Institute of Urgent and Recovery Surgery n.a.V.K. Gusak, NAMS of Ukraine"

Identification of minimal residual disease consists of leukemic cells detection among the normal bone marrow precursors.

In this study we analyzed CD34, CD20, CD10, CD58 antigens expression used for MRD monitoring on the B-lymphoblasts of 68 untreated patients with B-ALL.

In the study results didn't present antigen expression in some samples; in positive expression samples some cells expressed antigens homogeneously; in some tests were revealed positive as well as negative blasts simultaneously (Table 1). During the carrying out of multiple staining with the other antigens (T-lymphoid, myeloid, activation) were observed different cell distribution in tumor population with positive expression CD10, CD34, CD58, CD20. There were revealed sub-populations with different phenotypes: bright/bright, bright/dim, dim/dim.

Table 1

Expression of antigens in patients with B-ALL

Antigen	Absence of expression (n)	Positive expression		
		Presence of positive/negative cells (n)	Homogeneous expression (n)	Distribution heterogeneity in double staining (%)
CD 10	6	62		
		12	50	4
CD 34	18	50		
		14	36	14
CD 58	1	67		
		13	54	67
CD 20	41	27		
		9	18	46

Analysis of antigen CD10, CD34, CD58, CD20 expression by tumor cells showed that in majority of samples in presence of homogeneous co-expression with the standard "anchor" diagnostic markers (CD10+/CD19+, CD34+/HLA-DR+), at least one antigen among CD10, CD34, CD58 or CD20 distributed heterogeneously in population of B-lymphoblasts. The achieved result allowed to conclude that population of B-lymphoid tumor cells at the disease beginning is heterogeneous; there are sub-populations with various physical and functional characteristics. This fact should be considered by MRD monitoring with multi-colored antibody combinations, and control populations with nonstandard phenotype.

Judit Bedekovics, Gabor Mehes

STROMAL ACTIVATION OF BONE MARROW IN INFILTRATIVE, LYMPHOID NEOPLASIAS

Department of Pathology, University of Debrecen Clinical Centre Debrecen, Hungary

Primary or secondary neoplastic diseases of the bone marrow result in pathologic interaction between neoplastic cells and non-neoplastic stroma cells. This may lead to the activation and expansion of the BM stroma creating an altered microenvironment, which is called the neoplastic niche. This modified environment may influence neoplastic cell growth and survival.

The main goal of this study was to assess the stromal activation in lymphoproliferative disorders infiltrating the BM. Altogether 78 paraffin embedded, formalin fixed biopsy specimen were evaluated. 15 of 78 cases were negative for neoplastic disorders and were considered as normal control, while in 63 cases lymphoproliferative neoplasia were diagnosed. 37 of the 63 pathologic cases showed primary lymphoid neoplasia (acute lymphoid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, myeloma multiplex, hairy cell leukemia). 26 of 63 cases were diagnosed with aggressive or indolent lymphoma infiltrating the BM (diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, etc.). Fiber accumulation was evaluated using reticulin staining, while stroma cell activation was assessed using anti-PDGFR β immunohistochemical (IHC) staining. In selected cases the vasculature was visualized by anti-CD31 IHC reaction.

Both the fiber content and the amount of activated stromal cells were elevated in the pathologic subgroup compared to the control group. Significant correlation could be found between the amount of fiber content and cellular component ($r > 0.75$, $p < 0.0001$). Basically two pattern of stromal activation could be detected. In a smaller group of cases neovascularisation was prominent, where the fibroblast proliferation was associated to the perivascular area, while in other cases interstitial fibroblast proliferation was accompanied by significant fiber production.

Lymphoproliferative neoplasias infiltrating the BM cause stromal activation, resulting in fibroblast proliferation and in most cases in fiber accumulation. Sometimes prominent neovascularisation can be also detected. The effect of stromal activation on prognosis should be evaluated in cases with significant stromal activation.

The scientific work (infrastructural background) was supported by the TÁMOP- 4.2.2.A-11/1/KOV-2012- 0045 "Research network on vascular biology/medicine" project and the personal support provided by the TÁMOP 4.2.4. A/2- 11-1-2012-0001 „National Excellence Program – Elaborating and operating an inland student and researcher personal support system. The project was subsidized by the European Union and co-financed by the European Social Fund.

Susanna Mandruzzato

BONE MARROW MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

Oncology and Immunology Section, Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padova and Istituto Oncologico Veneto

One of the mechanisms of immune tolerance induced by the cancer is due to the expansion of myeloid-derived suppressor cells, a population of immature myeloid cells that has been shown to accumulate in the blood, lymph nodes, bone marrow and tumour sites in patients and experimental animals with neoplasia, and capable of inhibiting both adaptive and innate immunity thus limiting both immune-surveillance and immunotherapy.

In cancer patients, the nature of MDSCs is still incompletely defined and based on a synthesis of the clinical data about MDSCs in cancer patients, it appears that MDSCs mainly consist of at least a monocytic population, a more differentiated granulocytic population, and an immature myeloid cell population. In order to dissect the molecular pathways involved in MDSC differentiation, we recently defined *in vitro* culture conditions to elicit MDSCs from human and mouse bone marrow (BM) cells. We demonstrated that the combination of GM-CSF with either G-CSF or IL-6 enriched an immature population from human and murine BM cells, and that after 4 days of culture the resulting myeloid cell population, named BM-MDSCs, was able to inhibit the proliferation of both mitogen and alloantigen-activated T cells. Of note, these cells share phenotype and functions of tumor-induced MDSCs and can be adoptively transferred to recipient mice inducing antigen tolerance. Interestingly, adoptive transfer of syngeneic bone-marrow derived MDSCs to diabetic mice transplanted with allogeneic pancreatic islets resulted in the allograft acceptance of the and long term correction of the diabetic status.

Preclinical evidence strongly supports a beneficial effect of approaches targeting either MDSCs or their inhibitory pathways on the anti-tumor immune response, either endogenous or elicited by immunization/adoptive transfer of tumor-specific T cells. Development of new treatments will thus have a double role: defining new immune modulators to improve the effectiveness of the immunotherapy of cancer but also elucidate the role of MDSCs in various stages of cancer progression. On the other side of the same coin, techniques allowing generation of MDSCs might represent a novel tool to control diseases characterized by excessive activation of the immune systems such as either autoimmune diseases or allograft rejection.

S. Shamansky, I. Fedotova, Y. Popkov, A. Burya, L. Novoseltceva, O. Pisarevskaya, V. Pop, A. Bityukov, Y. Kuchma, N. Tupitsyn, O. Rukavitsin.

THE MONITORING MINIMAL RESIDUAL DISEASE AND MAINTANENCE THERAPY AFTER AUTOLOGOUS STEM CELLS TRANSPLANTATION

IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation.

Introduction: High-dose therapy with autologous stem cell transplantation (auto-Tx) for treatment of the patients (pts) with multiple myeloma has been considered the standard frontline treatment for younger pts even in the era of novel agents (bortezomib and lenalidomide). Posttransplant treatment has clearly shown improvements in the depth and duration of response. However, the optimal post-transplant therapy, if any, is still to be defined, as well as duration of such treatment. Monitoring of the minimal residual disease may helps to deside this problem.

Methods: Since 2001 we performed 72 auto-Tx + 1 allo-Tx in 62 pts. 59 pts included in the analysis. 10 pts recieved 2 auto-Tx (6 planned «tandem» и 4 in progression), 1 pt - auto+allo-Tx. M/F 40/19; middle age of pts - 52,4 y. (34–67); 9pts>60 y., 3pts<40 y. Time from diagnosis to the Tx — mediana 6,5 m (2,5–95,9). Mediana follow up — 25,6 m. (0,7–108). Early mortality (before reconstitution hematopoi-esis) — 0, 100-days mortality — 2 (3,4%). Mediana OS and PFS after Tx — 43,7 m. and 18,8 m. respectively. Mediana OS before 2010 – 32 m. (n = 34), after 2010 — didn't achieve (n = 25). Since 2010 14 pts received posttransplant maintainence therapy with bortezomib (btz) 1,3 mg/m² s.c. This treatment fulfills from the posttransplant period till the progression or excessive toxicity.

Results: Since Nov.2011 monitoring MRD were performed 14 pts. MRD detected by multiparametric flow cytometry. Bone marrow aspirate researches after induction therapy (4–6 VDD or VCD); before Tx; at 3, 6, 9, 12 m after Tx in 1-st year; and every 6 m in the sequel. 8 pts had immunophenotyping remission including 5 pts with immunochemical remission, i.e. sCR, before Tx. This pts received posttransplant therapy btz one beweekly and saved response (3 pts achieved ICR) during follow up (3–18 m after Tx). 6 pts had VGPR and PR without IFR before Tx. This pts received btz weekly after Tx. If the paraprotein or MRD increase, the dexamethasone 40 mg po was added. In this group 2 pts had clinical relapse of the MM in 9 and 12 m., 2 pts achieved sCR (IFR+ICR) after Tx and keep response at 18 m., 2 pts save PR at 3 and 6 m. Thereby, MRD detecting permit to define our treatment in future.

Conclusion: On our data, MRD monitoring is useful tool, which helps to determine prognosis and to choose of the posttransplant strategy in pts with MM. However, longer period of follow up and more pts in further trials are needes to choose the optimal variants and duration of posttransplant treatment.

Albert D. Donnenberg, Ph.D.

CANCER STEM CELLS: CELL TYPE OR CELL STATE?

That cancer is initiated by mutated stem cells is an old hypothesis that has had validity since the 1977 observation of Fialkow that CML arises from a bipotential progenitor capable of myeloid and lymphoid differentiation. Our understanding of stemness has evolved and now encompasses the totipotent cells responsible for embryogenesis as well as multipotent adult stem cells that mediate tissue maintenance and repair. From the field of experimental developmental biology we have learned that stemness, in its most fundamental sense, is an epigenetic state that can be achieved through somatic nuclear transfer, induced by forced expression of a quartet of genes, or selected through exposure to harsh environmental conditions and subsequent exposure to growth and differentiation factors. How does this new information, the concept that stemness is characterized by self-renewal, multipotency and self-protection, square with the cancer stem cell hypothesis? How does our understanding of the roles of epithelial to mesenchymal and mesenchymal to epithelial transitions during embryogenesis inform our understanding of cancer progression and metastasis, and what does this have to do with cancer stem cells? This lecture will trace our understanding of adult stem cells from its origins in experimental hematology to its current status, in an effort to discern whether cancer stem cells, the clonogenic cells responsible for tumor propagation and metastatic spread, are a cell type or a cell state.

Ekaterina Chigrinova

BONE MARROW INVOLVEMENT IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: LYMPHOMA

Hematology department, University Hospital of Geneva (HUG).

Bone marrow involvement in lymphoma represents a complicated interaction between hematological tissue and malignant cells. Bone marrow homing of lymphoma cells is associated with some specific profiles of expression of adhesion molecules from the both sides- hosting hematopoietic tissue and homing lymphoma cells. Detection of BM involvement represents a critical step of staging process in patient newly diagnosed with lymphoma, since it brings the evidence of a disseminated disease requiring a systemic therapeutic approach. The choice of a method for detection of BM involvement by lymphoma depends on lymphoma type's biology and on staging purposes. Growing evidence shows, that an initial staging of a high grade NHL seems do not require bone marrow aspiration or biopsy, but rather a radiological confirmation by positron emission tomography (PET). Clinical importance of a minimal residual disease in certain types of indolent lymphomas requires, at the contrary, a high sensitivity approaches of BM investigation, being based on molecular biology.

M.V. Kiselevsky, I.Zh. Shubina, B.E. Polotsky

DETECTION OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN PATIENTS WITH NSCLC AND ESOPHAGEAL CANCER

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

Introduction. This research was performed to evaluate feasibility of immunomagnetic technique for intraoperative detection of DTC in bone marrow of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and esophageal cancer (EC).

Materials and methods. 25 patients with NSCLC and EC, grade II–IV, underwent radical operation with excision of a rib segment (4–7 cm) used for DTC analysis. Mononuclear cells (MNC) were separated from bone marrow washed out of the rib. Immunocytochemical protocol was used for standard cytokeratin (CK+) cell identification. Immunomagnetic enrichment of CK+ cells derived from bone marrow MNC was achieved by positive selection of CK7/8 expressing cells. Enriched cell population was stained by CD45-FITC monoclonal antibodies for fluorescent microscopy cytological examination. Hematoxylin-eosin was used for control MNC staining.

Results. Immunocytochemical technique for DTC detection showed 14 samples of CK+ cells. According to previously suggested relevant morphological criteria for discrimination from false-positive CK- stained cells only 9 samples were referred to as tumor cells. Immunomagnetic separation of CK+ cells revealed 15 samples with 2–15 bead-rosetted cells. Cytological examination of hematoxylin-eosin stained CK+ samples identified large cells with eccentric nuclei as non-tumor cells. Immunofluorescent analysis of the rosetted cells showed that these cells expressed CD45 marker of hemopoietic cells as well as CK-negative mononuclear leukocytes, which were not isolated from the studied population of bone marrow cells by magnetic separation. And only two samples of CK+ cells isolated with immunomagnetic enrichment technique proved to be malignant after additional cytological examination.

Conclusion. *Immunomagnetic isolation of cytokeratin-positive cells allows collection of enriched population of viable CK+ cells and subsequent morphological control of the isolated cells is required to verify tumor cells. The results suggest that correct intraoperative diagnostics of DTC requires two stages: immunomagnetic separation to obtain enriched population of CK+ cells and histological staining with cytological evaluation.*

M.N. Kostjukova¹, A.F. Karamysheva²

**CD138+ AND CD138– MULTIPLE MYELOMA CELLS
DEMONSTRATE DIFFERENT MEMBRANE EXPRESSION
OF INTERLEUKIN-6 RECEPTOR (CD126)
AND VASCULAR ENDOTHELIAL
GROWTH FACTOR RECEPTOR 3 (VEGFR3)**

*¹Laboratory of Haematopoiesis Immunology, Institute of Clinical Oncology,
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow, Russia*

*²Laboratory of Tumor Cell Genetics, Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin
Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow, Russia*

Multiple myeloma is characterized by proliferation and accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. The adequate method in differential diagnosis and in progression level assessment of the disease is flow cytometry. It is possible to use two plasma cell antigens — CD38 and CD138 (syndecan-1) to discriminate plasma cells from other bone marrow mononuclear cells. However, a number of recent reports have shown heterogeneity of clonal plasma cells in respect of CD138 expression. We investigated levels of surface expression of main myeloma growth factor (IL-6) receptor — CD126 and VEGFR3, separately on CD138+ and CD138– neoplastic plasma cells, with its relation to proportion of plasma cells in bone marrow and to plasma cell immunophenotype. 27 MM patients were studied. The level of CD126 expression was very low. The proportion of CD138– cells ranged from 0% to 74,2% (median 3,1%) of all plasma cells identified on the basis of CD38++ and SSC. There were higher both frequency of CD126-positive cases ($p = 0,001$) and percentage ($p = 0,003$) of CD126+ cells in CD138+ subpopulation of plasmacytes compared to CD138– subpopulation. As well CD138+ cells had higher proportion of CD45–CD19–CD56++CD126+ cells. Mean proportion of VEGFR3+ cells within plasma cells was 83% in 23 MM patients. In 16 cases almost all MM cells expressed this receptor (93–99%). In CD138– cells expression of VEGFR3 was absent.

Mauro Krampera

**STROMAL BONE MARROW MICROENVIRONMENT
IN CANCER DEVELOPMENT**

*Department of Medicine, Section of Hematology, Stem Cell Research Laboratory,
University of Verona, Italy.*

Stromal cells are essential components of the bone marrow microenvironment regulating and supporting the survival of different tumors, including B-cell acute and chronic lymphocytic leukemia (B-ALL and CLL), and acute myeloid leukemia. We investigated the role of Notch signalling in human BM-mesenchymal

stromal cell (hBM-MSC)-promoted ALL, CLL and AML survival and chemoresistance. The block of Notch signalling through γ -secretase inhibitor (GSI) XII reverted the protective effect mediated by co-culture with BM-MSC. The treatment with combinations of anti-Notch neutralizing Abs resulted in the decrease of B-ALL cell survival, either cultured alone or cocultured in presence of BM-MSC from normal donors and B-ALL patients. The inhibition of Notch-3 and -4 or Jagged-1/-2 and DLL-1 resulted in a dramatic increase of apoptotic B-ALL cells by 3 days, similar to what is obtained by blocking all Notch signaling with the GSI XII. The same Notch receptors are involved in CLL survival except for Notch-1 that, in CLL, mediates a synergistic effect with other Notch receptors in inducing the anti-apoptotic phenotype. Some preliminary data showed that Notch system is involved in survival and chemoresistance of acute myeloid leukemia blasts. Overall, our findings show that stromal cell-mediated Notch signaling has a role in promoting ALL, CLL and AML survival and resistance to chemotherapy. Therefore, the target of Notch pathway activation may represent a useful strategy to overcome drug resistance and improve the efficacy of conventional treatments.

V.P. Letyagin, N.N. Tupitsyn, O.V. Krohina, I.V. Vysotskaya, E.M. Pogodina

CLINICO-MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BREAST CANCER AND THEIR RELATIONSHIP WITH MICRO METASTASIS IN THE BONE MARROW

Materials and methods: in 53 patients with I–IV stages of breast cancer held immuno-morphology study of bone marrow cells (sternal puncture, or simultaneously, and sternal puncture the iliac crest) with use of monoclonal antibodies to cytokeratins.

Results: immuno- cytological method has a much higher sensitivity than standard cytology. With his help I was given to determine the presence of metastases from 45.3% of patients against 3.77% with a standard cytology. The size of the primary tumor, localization, histological type and degree of malignancy were not significantly affect the presence or absence of metastases in the bone marrow. There is a significant relationship between receptor status of the tumor and micro metastasis in the bone marrow: negative on the estrogen receptors tumors have a micro metastases in bone marrow in 62.1% cases positive — in 28.6% of the cases. Similar data were obtained in RP+ and RP – tumors: micro metastases in bone marrow diagnosed in 76.9% with RP-negative tumors and only in 25% cases with RP-positive status. No significant correlation was found between the degree of the damage to regional lymph nodes (N0, N1, N2) and micro metastasis in the bone marrow, which is equally probable (72% and 71.5%) is diagnosed when N0 and N1+2.

DYNAMICS OF TUMOURS IMMUNO- PHENOTYPE DURING NEOADJUVANT THERAPY IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

V.P. Letyagin, N.N. Tupitsyn, A.A. Subotina, I.V. Vysotskaya, E.M. Pogodina

For solid tumors and breast cancer, in particular, a consistent system of knowledge about the change immuno- phenotype epithelial cells as their differentiation is the subject of active research.

Materials and methods: thirty patients with breast cancer stages T2-4N1-2M0 studied the following characteristics of tumors immuno- phenotype: CD71, CD29, CD54, HLA I and class II in the dynamics of neoadjuvant treatment (according to the core-biopsy and operating material). The data obtained on the basis of direct and indirect fluorescence reaction and immuno-morphology research on cryostat sections by means of monoclonal antibodies. All patients in the preoperative stage was conducted: mode CAF (4 cycles) of 15 patients, CMFVP(2-cycle) of 15 patients.

Results: during increase of expression CD29 sensitivity (clinical-radiological regress) to treatment decreases ($p < 0.05$). With the severity of pathological changes significantly associated dynamics of CD95 and HLA I. I.e. to chemotherapy CAF, probably with great effect will answer sick, tumors are Express FAS/APO-1 antigen. Patients with complete absence of HLA I on tumor cells reasonable degree of pathological changes were observed twice when Monomeric reaction HLA — 75% and 37.5%, respectively.

Catherine Alix-Panabières

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF VIABLE TUMOR CELLS IN THE BLOOD AND THE BONE MARROW: LIQUID BIOPSY FOR CANCER

Laboratory of Rare Human Circulating Cells, Department of Cellular & Tissue Biopathology of Tumors, Institute of Regenerative Medicine & Biotherapy, Saint-Eloi Hospital, University Medical Centre of Montpellier, 80, avenue Augustin Fliche 34295 Montpellier, France.

Keywords: Circulating tumor cells, Disseminated tumor cells, EPISPOT, Solid tumor, Real-Time Liquid biopsy, Prognostic value, Bone marrow, blood.

The enumeration and characterization of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood and disseminated tumor cells (DTCs) in bone marrow may provide important prognostic information and might help to monitor efficacy of therapy.

Since current assays cannot distinguish between apoptotic and viable DTCs/CTCs, it is now possible to apply a novel ELISPOT assay (designated 'EPISPOT') that detects proteins secreted/released/shed from single epithelial cancer cells. Cells are cultured for a short time on a membrane coated with antibodies

that capture the secreted/released/shed proteins that are subsequently detected by secondary antibodies labeled with fluorochromes.

In breast cancer, we measured the release of cytokeratin-19 (CK19) and mucin-1 (MUC1) and demonstrated that many cancer patients harbored viable DTCs in their bone marrow, even in patients with apparently localized tumors (stage M₀: 54%). Preliminary clinical data (n = 57) showed that patients with DTC-releasing CK19 have an unfavorable outcome. We also studied CTCs or CK19-releasing cells (CK19-RC) in the peripheral blood of 194 M₁ breast cancer patients and showed that patients with CK19-RC had a worse clinical outcome.

In prostate cancer patients (n = 48), we used prostate-specific antigen (PSA) secretion as marker to detect PSA-secreting cells and observed that 83% and 42% of M₁ & M₀ cancer patients, respectively, had CTCs with a difference in the CTC median (29 for M₁ & 9 for M₀) and found that a significant fraction of CTCs also secreted fibroblast growth factor-2 (FGF-2), a known stem cell growth factor.

More recently, **in colon cancer**, a considerable portion of viable CTCs detectable by the Epispot assay is trapped in the liver as the first filter organ in colon cancer patients. The enumeration of CK19-RC by the CK19-Epispot assay in 75 colorectal cancer patients revealed viable CTCs in 65.9% and 55.4% (p = 0.04) patients in mesenteric and peripheral blood, respectively, whereas CellSearch detected CTCs in 55.9% and 29.0% (p = 0.0046) patients. In mesenteric blood, the number of CTC was significantly higher than in the peripheral blood. Our clinical data showed that localized colon cancer patients with a high level of CTCs have an unfavorable outcome (n = 60).

In conclusion, the EPISPOT assay offers a new opportunity to detect and characterize viable DTCs/CTCs in cancer patients and it can be extended to a multi-parameter analysis revealing a CTC/DTC protein fingerprint.

DETECTION OF DISSEMINATED NEUROBLASTOMA CELLS IN BONE MARROW USING MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY

A. Popov^{1,2}, E. Shorikov^{1,2}, T. Verzhbitskaya^{1,2}, G. Tsauro^{1,2}, A. Druy^{1,2},
A. Solodovnikov², L. Saveliev^{1,2,3}, L. Fechina^{1,2}

¹Regional Children's Hospital 1, Pediatric Oncology/Hematology Center, Ekaterinburg, Russian Federation

²Research Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

³Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Bone marrow micrometastases detection in children with neuroblastoma is crucial for correct patients staging and risk group stratification. Flow cytometry is widely available, fast and easy-to-perform approach for finding NB cells among normal BM hematopoietic cells. Aim of the study was to investigate prognostic significance of flow cytometric tumor cells' detection in BM of children with NB at the time of diagnosis.

Patients and methods. 51 patients (24 boys and 27 girls) aged from 6 days to 15 years (median age 1 year 3 months) with NB were included in the study. BM samples at the time of diagnosis were obtained from 1–5 aspiration sites per patient (median 3 samples per patient). 5-color FC was applied for CD45(–)CD56(+)CD81(+)GD2(+)CD9(+)-cells evaluation.

Results. NB cells were detected in BM by FC more frequently comparing to conventional cytomorphology (49.0% and 29.4% patients respectively, $p = 0.043$). Patients with NB cells detected in BM by FC had significantly worse event-free survival, overall survival and progression-free survival ($28.0 \pm 9.0\%$, $35.8 \pm 10.7\%$ and $34.3 \pm 10.4\%$ respectively) in comparison to children with negative result of immunophenotyping ($83.5 \pm 7.6\%$, $87.7 \pm 6.7\%$ и $86.8 \pm 7.1\%$ respectively, $p < 0.001$ in all cases). BM involvement detection by FC maintained its prognostic significance in following patients groups distinguished by other stratification criteria: patients without *MYCN* amplification, patients without BM lesion as assessed by cytomorphology, patients younger than 1 year, patients older than 1 year, patients with stages I–III and IVS, patients with stage IV, patients with localized tumor (stages I–III). In multivariate analysis immunophenotyping proved to be an independent prognostic factor when analyzed jointly with other risk factors such as age, disease stage and *MYCN* amplification.

Conclusion. Thus flow cytometric BM involvement detection could be used in combination with other parameters for the treatment strategy choice in patients with NB.

*V.V. Rodionov^{1,2}, N.N. Tupitsyn³, O.A. Bogomolova^{1,2},
V.V. Kometova², M.V. Rodionova³*

DETECTION OF BONE MARROW DTC IN BREAST CANCER USING FLOW CYTOMETRY

¹*Ulyanovsk State University, Ulyanovsk*

²*Regional Cancer Center, Ulyanovsk*

³*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow*

The purpose. To assess the degree of hematogenous dissemination in breast cancer patients basing on the detection of DTC in bone marrow by flow cytometry.

Materials and methods. The study included 50 breast cancer patients stages I–IV treated in the Ulyanovsk Regional Cancer Center since November 2011 up to date. BM assessment was performed prior to treatment using standard cytological and histological methods and FC with monoclonal antibodies to EpCAM. The volume of BM punctate did not exceed 0.5 ml. FC was conducted in the coordinates CD45/CD326 after immunomagnetic enrichment of cells with anti-EpCAM (CD326). This allowed to estimate up to 50 mln myelokaryocytes. The presence of 1 or more DTC per 1 mln myelokaryocytes was considered to be the threshold level. Core biopsy of poster-lateral upper iliac spines on both sides was performed for histological assessment.

Results. Cytological and histological studies revealed BM metastases in 1 (2.0%) and 2 (4.0%) of 50 patients, respectively. FC confirmed BM involvement in both cases and significantly increased the rate of micrometastases and DTC detection: totally in 8 patients (16.0%). The univariate analysis showed no significant correlation between tumor size, tumor grade, hormone receptor status, status of the regional lymph nodes and DTC detection. The only statistically significant correlation was found with Ulyanovsk prognostic index (UPI) ($p = 0.009$). UPI is a new total pathological index introduced by pathologists of the Regional Cancer Centre.

Conclusion. In our opinion FC is the method of choice for DTC measurement in BM after immunomagnetic enrichment of tumor cells with anti-EpCAM (CD326) antibody.

N.I. Semesiuk, N.O. Bezdieniezhykh, O.O. Lykhova, Yu.I. Kudryavets

CELLULER AND HUMORAL ELEMENTS OF THE BONE MARROW MICROENVIRONMENT OF BREAST CANCER PATIENTS

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology
National Academy of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

The bone marrow constitutes an unique microenvironment for normal resident and cancer cells because rich in growth factors and cytokines that promote their proliferation and survival and as a consequence cancer progression.

The objective was to reveal features of BM of breast cancer patients: detect the disseminated tumor cells in BM, determine cytokine status of BM and investigate the phenotypic characteristics of cells of BM.

Methods: immunocytochemistry, bioassay, ELISA, cell culture, statistical methods.

Patients: 72 BCP with histologically proven diagnosis and 14 healthy donors were enrolled into study. 31 patients with progression of disease and 41 patients with clinical stabilization (conditional remission) were included to “progression” and “remission” group respectively. This division of BC patients was conditional and was made during the 3 years study.

Results. DTC in BM was detected in 47.5% BCP with progression of disease. The levels of proinflammation cytokines — TNF- α , IL-1 β , IL-6 and growth factors — CSF-1, TGF- β 1, VEGF were revealed. This cytokines in BM act as a specific microenvironment and was found that the elevated levels of this cytokines were associated with progression of BC. Obtained data was showed that most prominent predictive markers of tumor recurrence with detection of DTC in BM of BCP are levels of proinflammation cytokines and growth factors. Phenotypic features of cells of BM were studied.

Conclusion. Detection DTC and determination of the levels of TNF, IL-1 β , IL-6, CSF-1, VEGF, and TGF- β 1 in BM of BCP are important to establish the features of BM microenvironment especially for prediction of metastasis and correction antitumor therapy.

Shiekh Aejaz Aziz, MD,DM, Mohmad Hussain Mir, MD**.*

**PATTERN OF BONE MARROW METASTASIS
IN SOLID TUMOURS-A RETROSPECTIVE ANALYSIS
AT A REGIONAL CANCER CENTRE IN KASHMIR,INDIA**

**Prof.and Head Medical Oncology,*

*** Senior Resident, Medical Oncology, Sher-i-Kashmir Institute Of Medical Sciences, Srinagar, Jammu& Kashmir, India.*

Abstract

Background: Though bone marrow involvement is a common occurrence in leukemias and lymphomas, solid tumours may also spread to bone marrow especially the ones which metastasize via the blood stream.

Aims and objectives: The aim was to review the clinical characteristics and the pattern of bone marrow infiltration in various solid tumours in adult and paediatric population.

Material and Methods: This retrospective study was carried out at the Department of Medical Oncology, Regional Cancer Centre, Sher-i-Kashmir Institute Of Medical Sciences, Srinagar, Jammu and Kashmir, India. The clinical, hematological and pathological data of the patients was reviewed over a two years period from January 2012 to December 2013.

Results: Out of 6232 cancer patients registered during the study period, 860 (13.79%) were hematological and lymphoreticular malignancies while as 5372 (86.21%) were solid tumors. The frequency of adult and paediatric solid tumors were 94.64% (5084) and 5.36% (288) respectively. In the adult solid tumors, the bone marrow infiltration was observed in 4 cases each of breast and lung cancer (0.078%), 3 cases each of prostate and colorectal adenocarcinoma (0.059%) and 2 cases of gastric adenocarcinoma (0.039%). A rare case of ovarian epithelial cancer with secondaries bone marrow was found in this study. In the pediatric solid tumors, the frequency of secondaries bone marrow was 4.86% in ewings sarcoma /PNET (14 cases), 2.70% in neuroblastoma (8 cases), 1.04% in rhabdomyosarcoma (4 cases) and 1.04% in wilm's tumor (4 cases). There was a unique case of hepatoblastoma with secondaries bone marrow. The common symptoms include fatigue, low appetite, fever and bleeding. Anaemia was commonest hematological finding (72.5%), followed by thrombocytopenia (63.9%) and neutropenia (12.8%).

Conclusion: Bone marrow infiltration in adult solid tumours is a rare occurrence compared to pediatric solid tumours. There are no definite defined guidelines to assess the occurrence of this problem, so a felt need to raise awareness to that extent is perceived.

I.Zh. Shubina, Yu.A. Borisova, G.B. Smirnova, M.V. Kiselevsky, H.M. Treshalina

EVALUATION OF CK19+ DISSEMINATED TUMOR CELLS IN MURINE BONE MARROW AFTER ANTI-ESTROGEN THERAPY

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

Background. Detection of cytokeratin 19 (CK19) positive cells in peripheral blood (circulating tumor cells, CTCs) and bone marrow (disseminated tumor cells, DTCs) of patients with breast cancer was reported to be a useful tool for monitoring minimal residual disease. Blockade of estrogen-positive (ER+) tumors with anti-estrogen therapy may have dose limitation due to possible tumor cell dissemination resulting from the increase of estrogenic background.

Materials and methods. We used murine transplanted mammary adenocarcinoma Ca755 ER+ in the study of a new phyto-antiestrogen agent #091013-S (dosage: 250 mg/kg/d) and Tamoxifen (dosage: 50 mg/kg/d) *per os* with comparable antitumor activity for 10 days. Bone marrow samples (control and two study groups) obtained at the baseline and final stage of therapy were stained by anti-CK19 antibodies and evaluated by flow cytometry using WinMDI 2.8 program. Live CK19+ cell fluorescence and cytological examination were assessed by fluorescent and light microscopy.

Results. The results showed that both drugs significantly inhibit growth of Ca755 ER+ with tumor growth inhibition, TGI = 67–98% ($p < 0.05$). Mean fluorescence intensity and characteristics of CK19 expression in all bone marrow samples of tumor-bearing animals were similar. Estimation of CK19 showed GeoMean($\pm$ SD) 31.94 ± 5.02 ; 28.87 ± 13.70 ; 28.02 ± 9.50 and CV($\pm$ SD) 24.74 ± 2.60 ; 17.76 ± 1.51 ; 20.11 ± 0.22 in control and both study groups, respectively. Immunofluorescent analysis and cytological examination revealed single Ca755 cells in the given samples.

Conclusion. Bone marrow of all animals with transplanted murine mammary adenocarcinoma Ca755 ER+ stained by CK19 presented single disseminated tumor cells. The studied drugs in effective doses and regimens significantly inhibited tumor growth and did not change CK19 expression comparing to the control group. Therefore, detection of CK19+ cells in bone marrow may be used to control possible disseminating function of new antiestrogen drugs.

Z.D. Yunusova

**ISOLATED SEVERE BONE MARROW
OF HEPATITIS C VIRUS AMONG PATIENTS
WITH ACUTE LEUKEMIA**

Science Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Uzbekistan

One of the pressing questions of modern science is a hematologic finding replication of viral hepatitis B and C (VHB, VHC) not only in the liver, but also in various organs, including bone marrow (BM). In Uzbekistan, the first time we identified markers of VHC in serum and BM in patients with acute leukemia (AL). We first determined the incidence of VHC in AL patients in Uzbekistan — 71.1% (64 patients: 35 — AML, 29 — ALL), the study of the distribution of its genome. Revealed only two genetic variants: 1b — 70% and 30% 3a. Also, out of which 18 patients with AL for the first time the Commission examined for the presence of HCV. Of these 12 (66.6%) patients revealed the presence of HCV RNA (with ALL-4-PLA 2 AML-6). Among them, the stage of remission induction were — 2, consolidation remission — 6, supporting PCT (polychemotherapy) — 4 patients.

As a result, was investigated the clinical course of AL against VHC stages of chemotherapy. All investigated patients had liver disease syndromes: mesenchimal, cytolysis, cholestasis. According to clinical and laboratory data on haemogram persistent thrombocytopenia, leukopenia, on myelogram reduction of megakaryocytes from the norm. Of the 12 HCV positive patients identified in the Commission's increasing bilirubin and cytolytic enzymes are 3–4 times above normal was detected in 4 patients in the consolidation phase of remission. At the time of the study because of lack of anti-HCV in serum by polarization fluoroimmunoassay hepatitis validate as toxic (in connection with which the PCT has been temporarily postponed), but later in the serum also detected HCV RNA. In 7 patients with elevated transaminases was noted by 1.5–2 times, and hepatitis was characterized by a moderate level of activity, in connection with which the program was continued by PCTs.

V.P. Letyagin, N.N. Tupitsyn, A.A. Subotina, I.V. Vysotskaya, E.M. Pogodina.

**ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN LEVELS
OF INFILTRATION OF THE TUMOR SUBPOPULATIONS
OF LYMPHOCYTES AND PATHOMORPHOSIS**

Materials and methods: in 30 patients with locally advanced breast cancer stages T2-4N1-2M0 the analysis of the relationship between levels of infiltration of the tumor tissue of different subpopulations of lymphocytes to destination neoadjuvant chemotherapy (the material of the core-biopsy) and the degree of severity of disease variability (according to operational material). Studied the following parameters: CD 45+, CD 7+, CD 20+, CD 25+.

Results: increase of the level of T-lymphocytes was accompanied by a greater severity of the disease variability in tumor tissue. When expressed infiltration by General leukocyte antigen CD45, moderate disease variability was observed twice the minimum (66.7% and 33.3%, respectively). Similar results were obtained for T cells (CD7) — 73.3% and 26.7% respectively. The largest and reliable relationships obtained for subpopulations of T-lymphocytes (CD25+) — time prevalence of moderate disease variability over a minimum of 90% and 10%, respectively, in the presence of CD25+ cells in tumor tissue before treatment. That is, this parameter can be used as predictor of the possible effectiveness of drug therapy.

Professor Elena B. Vladimirsky, MD, PhD

NORMAL BONE MARROW HEMOPOIESIS AND ITS REGULATION

In spite of great cell production in normal hemopoiesis, the number and composition of every branch of the hemopoietic system is constant. This is due to the main law of kinetics: equal number of cells is born and dies within each time unit. To meet this law the hemopoietic system uses 3 levels of equilibrium control: stem cells, growth factors and stromal microenvironment.

Hemopoietic stem cells (HSCs) can differentiate into all types of blood cells and at the same time proliferate to preserve the constant number of their pool as there is no input from the outside. When the entire body of HSCs is reduced below the critical level (e.g., by chemotherapy or radiation), they stop differentiating, and enlarge the proliferating pool until the standard level is reached again. This is the main cause of cytopenia after chemotherapy and radiation.

Hematopoietic growth factors — glycoproteins — are produced by several blood and stromal cells. The growth factors' action is essential for the realization of any cell programme, but the type of the programme depends solely on the cell itself: its genetic determination and the presence of active signal molecules.

The hemopoietic bone marrow cells lie on the bone trabeculae that are covered with stromal tissue, which consists of stromal cells and the extracellular matrix. The hemopoietic function of the stroma is realized through specific adhesion of HSCs and production of growth factors and molecules of cell interaction. Stromal environment also plays the essential role in the preferential egress of blood cells from the marrow into the peripheral blood.

Evaluation of bone marrow aspirate through smear examination is a very important diagnostic tool. It should be done using the so-called bone marrow indexes, i.e. ratios of several types of hemopoietic cells: the myeloid/erythroid index; the index of neutrophil maturation; the index of red cell maturation. Assessment of these indexes together with the cellularity of aspirate enables the doctor to reach highly important diagnostic conclusions.

Vera S. Donnenberg, Ph.D., F.C.P.

TUMOR ASSOCIATED MACROPHAGES AND CANCER STEM CELLS

The current understanding of cancer and its metastatic potential is that cancer cells must change their shape and gain motility. This process, termed the epithelial-mesenchymal transition (EMT), confers on cancer cells a series of mesenchymal traits and the ability to enter into the cancer stem cell (CSC) state, with self-renewal and self-protection as the key characteristics. We have shown that rare epithelial cells expressing mesenchymal markers are already present in the primary tumors as rare events, but are prevalent in metastatic disease. However, the mechanisms that enable CSCs to interact with their microenvironment are poorly understood. As during development, where tissue macrophages provide a supporting role in EMT, an analogous interaction may be present in primary and metastatic tumors. In this presentation we will discuss how tissue macrophages create a CSC-niche and signal with CSC to amplify their EMT state.

*M. Efimenko, O. Illarionova, O. Malevich,
N. Chripkova, T. Shamanskaya, E. Osipova, S. Plyasunova*

EFFECT OF ALLOGENIC BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF NORMAL HEMATOPOIETIC PROGENITORS AND LEUKEMIC CELLS

Federal Clinical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia (Moscow, RU).

Objectives. The use of transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) to accelerate the engraftment of hematopoietic precursors and for the correction of graft-versus-host disease (GVHD) in malignant hematological diseases makes one wonder what influence may have MSC on leukemic cells present in bone marrow of the recipient in the form of minimal residual disease. The aim: investigate the mechanism of the effect of allogeneic bone marrow MSCs on the ability of tumor cells to spontaneous and induced apoptosis.

Methods. Leukemic cells from bone marrow samples of patients (age 6 months — 17 years) with newly diagnosed acute leukemia (AL): B-ALL-41, T-ALL-12, AML-18. MSC (from 43 healthy donors) were cultured in DMEM with 20% FCS. Clonogenic study of granulocyte-macrophage bone marrow progenitors (from 15 healthy donors) were performed in semisolid agar medium. The sensitivity of blast cells to cytotoxic drugs was studied by the MTT-assay. To determine the levels of spontaneous and induced apoptosis in leukemia cells we use Apoptosis Detection Kit II (BD). Cytokines produced by MSCs was determined by flow Cytofluorometer using reagents BD Cytometric Bead Array.

Results. MSCs stimulate colony formation of granulocyte-macrophage precursors, surpassing the effectiveness of phytohemagglutinin-leukocyte conditioned medium as a source of colony stimulating factors. Efficiency of cloning was 27.9 ± 1.5 and 22.9 ± 2.4 , respectively. When leukemic cells were cultured on MSC for 4 days the proportion of viable cells was higher at 47.2% in ALL, and 63.1% in AML compared with controls. Incubation of leukemic cells with MSCs resulted in a decrease of sensitivity to cytarabine in 2 times in B-ALL, in 1,5 times in AML and 6 times in T-ALL. Under the influence of MSCs sensitivity of leukemic cells to daunorubicin decreased in all groups. MSC increased the sensitivity of blast cells from ALL patients to MP, but did not influence the sensitivity of AML blast cells to MP. MSCs inhibit apoptosis of leukemic cells induced by cytarabine. The study of MSCs cultures with SMA showed that MSCs produce a wide range of cytokines (IL-2, 4, 6, 10; FGF, VEGF), which may mediate the effect of MSCs on the viability of hematopoietic progenitors and leukemic cells.

Conclusion. On the basis of the research is clear that the important aspect is the safety of MSCs in terms of their influence on the sensitivity of leukemic cells to chemotherapy in patients with hematologic malignancies.

С.А. Тюляндин

РОЛЬ КОСТНОГО МОЗГА

В ГЕМАТОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва

Основной причиной смертности от злокачественных опухолей являются метастазы. На самых ранних стадиях своего возникновения клетки злокачественной опухоли получают доступ к кровеносному руслу и шанс попадания в кровоток с последующим распространением по органам и тканям. Обнаружение опухолевых клеток в костном мозге или циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови являются убедительным свидетельством системности опухолевого процесса. Костный мозг будучи «резервацией» опухолевых клеток в организме помимо этого играет важную роль в реализации метастатического процесса в других органах и тканях. Мезенхимальные клетки костного мозга, попадая в зону роста метастаза, дают начало перицитам и эндотелиальным клеткам, тем самым участвую в формировании кровеносных сосудов. Одновременно мезенхимальные клетки костного мозга превращаются в фибробласты стромы, которые являются важнейшими стимуляторами пролиферации опухолевых клеток. Другим важным механизмом опухолевой прогрессии является подавление противоопухолевого иммунитета. Костный мозг — завод по производству Т и В лимфоцитов, дендритических клеток, макрофагов, которые задействованы в осуществлении клеточного и гуморального противоопухолевого иммунитета. Сбои в работе этого защитного механизма не могут произойти без участия костного мозга.

Поэтому изучение функционирования костного мозга у больных злокачественных опухолями должно пролить свет на механизмы реализации метастатического каскада. Помимо решения фундаментальных проблем уже сегодня изучение диссеминированных клеток в костном мозге и циркулирующих клеток в периферической крови позволяет получить важную клиническую информации. Динамика числа опухолевых клеток может быть биомаркером эффективности противоопухолевой терапии. Определение фенотипа и генотипа циркулирующих клеток способно дать информацию о перспективных мишенях противоопухолевого воздействия и механизмах резистентности к лекарственным препаратам.

*Z. Hevessy¹, E. Szánthó¹, B. Kárai¹, G. Ivády¹, I. Szegedi²,
C. Kiss², J. Bedekovics³, M. Petrás⁴, G. Ujj⁵, A. Újfalusi¹, J. Kappelmayer¹*

NON-HAEMOPOIETIC TUMOR CELL DETECTION BY FLOW CYTOMETRY

¹*Dept. Laboratory Medicine,*

²*Dept. Pediatric Hematology-Oncology,*

³*Dept. Pathology, University of Debrecen, Debrecen,*

⁴*Children's Hospital, Miskolc,*

⁵*County Hospital, Szolnok, Hungary*

We aimed to evaluate the role of multicolor flow cytometry in the detection of bone marrow involvement in patients with solid tumors and in pediatric neuroblastoma cases. We investigated 55 bone marrow aspirates, 6 cerebrospinal fluid samples and 1 bronchoalveolar lavage fluid with multicolor flow cytometry (MFC) and correlated the results to morphology/immunohistochemistry (IHC) results of bone marrow biopsies where it was performed. Thirty-two samples of 30 patients with a clinical suspicion of solid tumor or transfusion-dependent anemia investigated by MFC revealed 8 cases of solid tumor with CD45-/EpCam+ carcinoma cells (n = 7) or CD45-/CD99+ Ewing sarcoma cells (n = 1) and 2 cases of histiocytosis with CD45-/CD1a+ cells. In 17 cases results were concordant (10 positive and 7 negative) while in 1 case MFC was negative while pathological histiocytes could be detected by IHC in the bone marrow biopsy specimen. Thirty samples of 14 children with suspected neuroblastoma or during its follow-up was analysed in a four-color setting (CD45/CD117/CD81/CD56) by MFC and 22 samples were investigated by IHC. In 13 cases results were concordant (8 positive and 5 negative) while in 8 cases discordant result were obtained (6 MFC+/IHC- and 2 MFC-/IHC+). In conclusion the two methods gave concordant results in 77% of cases and most of the discordant results were found in those neuroblastoma follow-up samples where pathological cell ratio was below 1% in a hypocellular bone marrow environment. Here MFC proved more valuable in minimal residual disease detection.

A. Ujfalusi, B. Bessenyei, Z. Hevessy,

B. Kárai, E. Szánthó, G. Ivády, J. Kappelmayer

**DETECTION OF GENETIC ABNORMALITIES ON
ENRICHED PLASMA CELLS
FROM BONE MARROW**

BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

Department of Laboratory Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Multiple myeloma (MM) is a hematopoietic neoplasm characterized by monoclonal plasma cells (PC) accumulated in the bone marrow. A variety of chromosomal abnormalities contribute to pathogenesis and affect risk stratification and treatment of MM. Cytogenetic aberrations are not frequently detected by karyotyping due to low proliferative rate of PC. Interphase FISH overcomes this limitation but it has been suggested that it should be performed on specifically identified PC. In this study our aim was to evaluate the utility of plasma cell enrichment combined with FISH for the detection of prognostically significant cytogenetic abnormalities in patients with MM. Plasma cells were enriched in bone marrow aspirates by using CD138 immunomagnetic bead selection in eighteen cases with low level of monoclonal PC. The PC selection was followed by FISH. The MM FISH panel included the following probes to detect high-risk genetic abnormalities: t(4;14), t(14;16), -13/del(13q), del(17p)(*TP53*). Plasma cell content in non enriched specimens ranged from 0.9% to 38% compared with 35% to 71% in enriched samples according to flow cytometric analysis in five cases. The most frequent chromosome aberrations were monosomy 13/del(13q) (n = 8) followed by del(16q) (n = 6), > 2 ATM signal (n = 6), > 2 *TP53* signal (n = 5), del(14q32) (n = 4), > 3 IGH (14q32) signal (n = 2). Specific translocations, t(4;14) and t(14;16), were detected in one-one case. The percentage of PC harboring genetic aberrations detected by FISH was higher than monoclonal PC content detected by flow cytometry in enriched samples. Based on our results plasma cell enrichment of bone marrow samples with low percentages of monoclonal PC increases FISH sensitivity for detecting high-risk cytogenetic abnormalities and can be of value to improve risk stratification and management of MM patients.

V.B. Родионов¹, Н.Н. Тупицын², О.А. Богомолова¹

ГЕМОПОЭЗ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, г.Ульяновск

²ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина" РАМН, г. Москва

Состояние костного мозга (КМ) является важным показателем степени гематогенной диссеминации опухолевого процесса. КМ играет важную роль в процессах иммунологической памяти и его исследование является ценным для диагностики иммунных изменений при опухолевой патологии.

Существует достаточно много публикаций по вопросу реакции кроветворной системы на присутствие макрометастазов в КМ. А.И. Воробьев (1985) выделяет следующие типы изменения кроветворения: в результате раздражения опухолевыми клетками КМ может быть реактивным, с увеличением клеточности всех ростков кроветворения, или бедным (гипопластичным или апластичным) вследствие замещения костномозгового пространства метастатическими клетками. При проведении нами анализа периферической крови больных раком молочной железы (РМЖ) с макрометастазами и микрометастазами в КМ ($n = 15$ и 19 соответственно) было выявлено, что больных первой группы отличает от пациенток второй группы статистически достоверное снижение уровня гемоглобина, тромбоцитов, а также увеличение СОЭ ($p < 0,05$). Кроме того обнаружено, что метастазы в КМ сопровождаются специфическим симптомокомплексом, включающим в себя: немотивированную резкую слабость, мигрирующие боли по костям скелета, повышение температуры тела до $37,5\text{--}38^\circ\text{C}$. В литературе имеются лишь единичные сообщения об анализе костномозговой реакции на отдельные опухолевые клетки. В работе О.В. Крохиной и соавт. (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, 2003) было сделано предположение, что к наиболее ранним проявлениям реакции КМ на присутствие отдельных опухолевых клеток у больных РМЖ можно отнести следующие изменения кроветворения по данным миелограмм: гипоклеточность костного мозга, скопления плазматических клеток, обнаружение крупных клеток с гиперхромным ядром и множественными нуклеолами, повышение лейко-эритробластического отношения, повышенные средние значения количества моноцитов и лимфоцитов. Мы также провели анализ кроветворения 50 больных РМЖ, находящихся на лечении в ГУЗ Областном клиническом онкологическом диспансере (г. Ульяновск) с ноября 2011г. Средний возраст пациенток составил $56,7 \pm 10,5$ года. На момент постановки первичного диагноза локальные формы заболевания были диагностированы у 48% больных, местно-распространенный процесс — у 42%, метастатический рак — у 5%. Исследование КМ выполняли до начала лечения. При цитологическом и гистологическом исследованиях метастазы в КМ выявлены у 1 (2%) и 2 (4%) из 50 пациенток соответственно. У обеих пациенток метастазы в КМ подтверждены методом проточной цитометрии. Кроме того, у 5 (10%) из 50 пациенток в миелограммах обнаружены «единичные недифференцированные клетки неясного происхождения, возможно, негемопоэтической природы». Эти клетки были расценены как подозрительные на метастатические. У 2 из 5 больных микрометастазы в КМ подтверждены методом проточной цитометрии. Кроме того, у 9 (18%) из 50 больных в трепанобиоптатах КМ обнаружены единичные плазматические клетки или микроочаговое их скопление. Метод проточной цитометрии в сочетании с иммуномагнитным обогащением опухолевых клеток с применением моноклональных анти-

тел к ЕpCAM (CD326) позволил диагностировать микрометастазы в КМ у 11 (22,0%) из 50 больных. При проведении анализа миелограмм выявлено, что в группе больных с микрометастазами снижение клеточности костного мозга отмечалось чаще (36,4%), чем у пациенток без микрометастазов (25,6%; $p > 0,05$). Содержание лимфоцитов в костном мозге у больных с микрометастазами было достоверно выше, чем в отсутствие его опухолевого поражения ($63,6\% \pm 0,5$ и $30,8\% \pm 0,47\%$ соответственно; $p = 0,048$). Не исключено, однако, что увеличение количества лимфоцитов было относительным. Дальнейший анализ миелограмм, возможно, позволит выявить косвенные признаки присутствия опухолевых клеток в костном мозге у больных РМЖ.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Рисунок к статье Б. Брандо

АНАЛИЗ НОРМАЛЬНОГО КОСТНОГО МОЗГА МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Picture by Bruno Brando

MULTICOLORFLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF NORMAL BONE MARROW

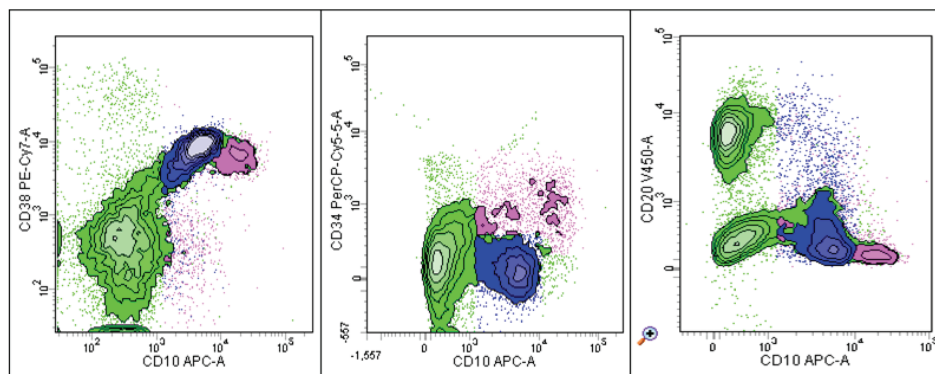


Рис. 1. Этапы созревания клеток КМ в норме по данным анализа методом 8-цветной ПЦ (каппа-FITC/ лямбда-PE/ CD34-PerCP-Cy5.5/ CD38-PE.Cy7 / CD10-APC / CD19-APC-Cy7 [якорный параметр гейтирования] / CD20-V450 / CD45-V500.

Фиолетовый: лимфобласты; синий: гематононы; зеленый: зрелые В-клетки.

Fig. 1. The normal B cell maturation steps are depicted, as demonstrable by 8-color FCM analysis of BM (Kappa-FITC / Lambda-PE / CD34-PerCP-Cy5.5 / CD38-PE.Cy7 / CD10-APC / CD19-APC-Cy7 [anchor gating parameter] / CD20-V450 / CD45-V500.

Purple: Lymphoblasts; Blue: Hematogones; Green: Mature B cells.

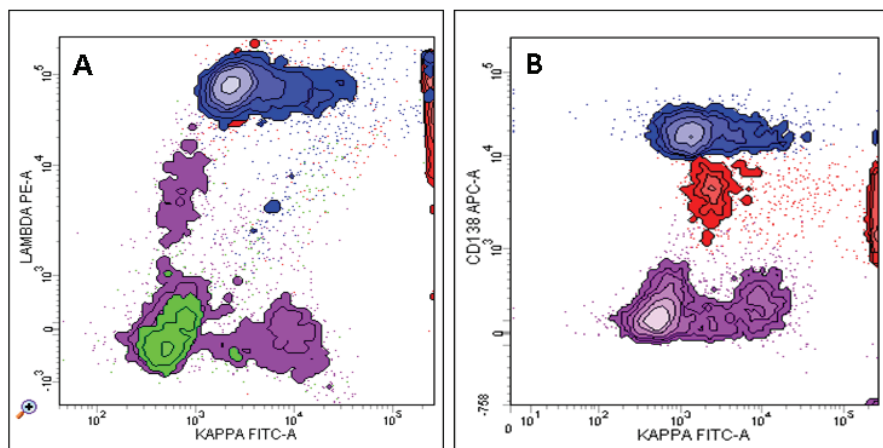


Рис. 2. Нормальные клетки В-клетки, нормальные и аномальные плазмоциты по данным анализа КМ методом 8-цветной ПЦ (каппа-FITC/ лямбда-PE/ CD34-PerCP-Cy5.5 / CD38-PE-Cy7 / CD10-APC / CD19-APC-Cy7 / CD20-V450 / CD45-V500).

Зеленый: гематогаоны, фиолетовый: нормальные В-клетки.

A. Нормальные плазмоциты (красный и синий) экспрессируют поликлональные цитоплазматические цепи каппа и лямбда.

B. Нормальные плазмоциты (красный) в виде примеси к клональным лямбда+ плазмоцитам (синий) и нормальным В-клеткам (фиолетовый).

Fig. 2. Normal B cells, normal and abnormal Plasmacells by 8-color FCM analysis of BM (Kappa-FITC / Lambda-PE / CD34-PerCP-Cy5.5 / CD38-PE-Cy7 / CD10-APC / CD19-APC-Cy7 / CD20-V450 / CD45-V500).

Green: Hematogones; Purple: Normal B Cells.

A: Normal Plasmacells (Red or Blue) express polyclonal cytoplasmic Kappa or Lambda chains.

B: Normal Plasmacells (Red) are admixed to clonal Lambda+ Plasmacells (Blue) and normal B cells (purple).

Рисунок к статье М.И. Давыдова

МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ МИНИМАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ РАКОМ

Picture by

ASSESSMENT OF MINIMAL BONE MARROW INVOLVEMENT BY FLOW CYTOMETRY IN CANCER PATIENTS

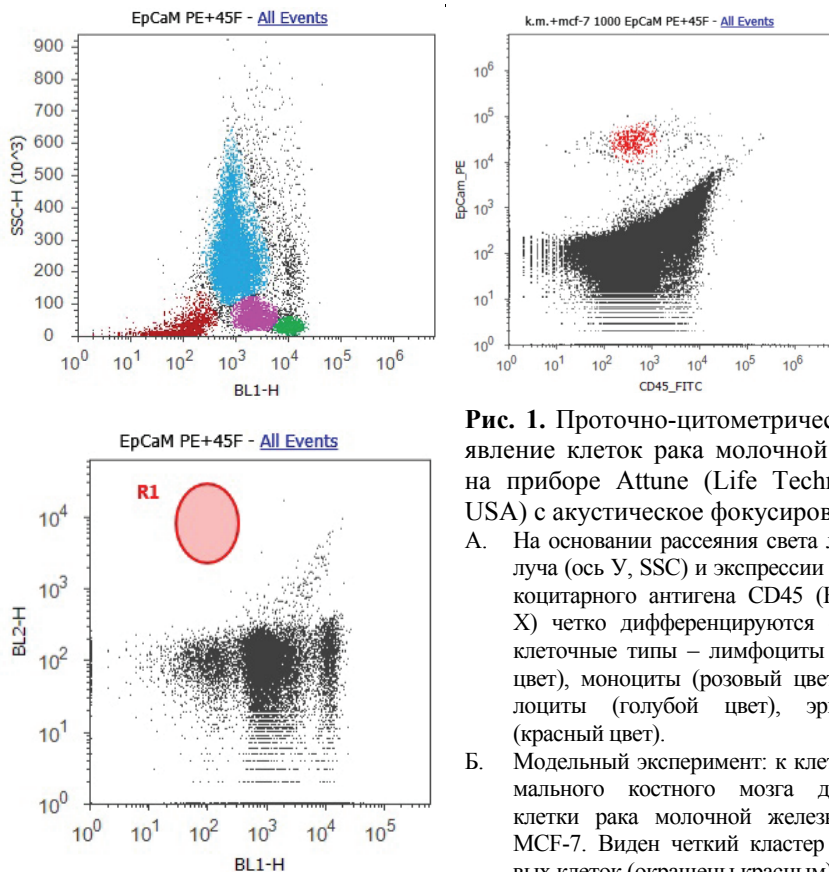


Рис. 1. Проточно-цитометрическое выявление клеток рака молочной железы на приборе Attune (Life Technologies, USA) с акустическое фокусировкой.

- А. На основании рассеяния света лазерного луча (ось Y, SSC) и экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45 (FITC, ось X) четко дифференцируются основные клеточные типы – лимфоциты (зеленый цвет), моноциты (розовый цвет), гранулоциты (голубой цвет), эритроциты (красный цвет).
- Б. Модельный эксперимент: к клеткам нормального костного мозга добавлены клетки рака молочной железы, линии MCF-7. Виден четкий кластер опухолевых клеток (окрашены красным).
- В. отсутствие клеток в гейте R1 с фенотипом CD236+CD45–(эпителиальных, метастатических клеток) в нормальном костном мозге (по оси X – экспрессия CD45, по оси Y – экспрессия CD326).

Fig. 1. Flow cytometric detection of breast cancer cells using an *Attune* (Life Technologies, USA) cytometer with acoustic focusing.

- A. Main cell types such as lymphocytes (green), monocytes (pink), granulocytes (blue), erythrocytes (red) are well differentiated in the coordinates of laser beam scattering (Y axis, SSC) and expression of common leukocyte antigen CD45 (FITC, X axis).
- B. Model experiment. Breast cancer cells (MCF-7 lineage) were added to normal bone marrow cells. A clear-cut tumor cell cluster (red) is seen.
- C. No cells in gate R1 with CD236+CD45– phenotype (epithelial metastatic cells) in normal bone marrow (CD45 expression, X axis; CD236 expression, Y axis).

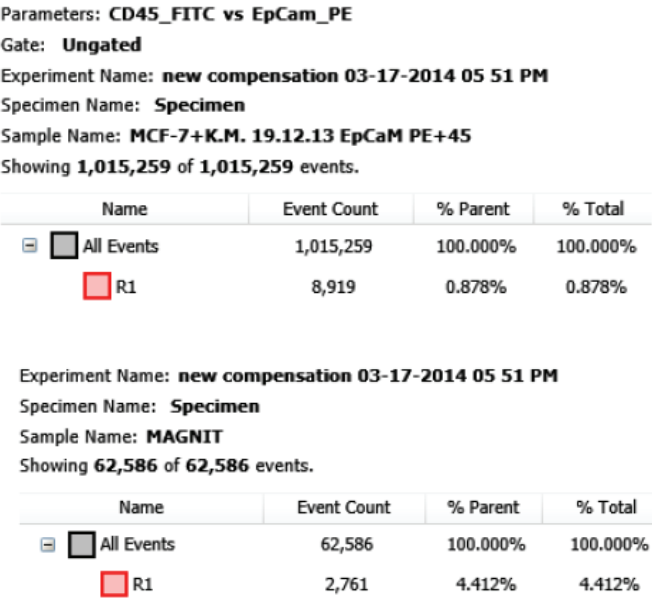


Рис. 2. Сравнительная оценка количества эпителиальных клеток линии MCF-7 в нормальном костном мозге, выявляемых двумя методами. К 10 млн миелокариоцитов нормального костного мозга добавлены 9 000 клеток линии рака молочной железы MCF-7.

- A. Клетки окрашены антителами CD45-FITC/CD326-PE (см. «Материалы и методы») и собраны на приборе Attune (Life Technologies, USA).
- B. клетки подвергнуты иммуномагнитному обогащению, затем окрашены антителами CD45-FITC/CD326-PE (см. «Материалы и методы»). После прямой окраски выявлено 8919 эпителиальных клеток, после иммуномагнитного обогащения – 2761 клетка, что свидетельствует о потере значительной части эпителиальных клеток в процессе фракционирования.

Fig. 2. Comparison of MCF-7 epithelial cell numbers in normal bone marrow as assessed by two techniques. 9000 MCF-7 breast cancer cells are added to 10 million normal bone marrow myelokaryocytes.

- A. The cells were stained with antibodies CD45-FITC/CD326-PE (see Materials and methods) and harvested on an *Attune* (Life Technologies, USA) cytometer.
- B. The cells underwent immunomagnetic enrichment and CD45-FITC/CD326-PE staining to follow (see Materials and methods). 8919 epithelial cells were detected after the direct staining versus 2,761 cells after the immunomagnetic enrichment which was evidence of a loss of a considerable portion of epithelial cells during fractionation.

FSBI "RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER"

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY Lab.

MYELOGRAM

N case hist.	13/...	Date	20.08.13.
NAME	B-VA.	Department:	№5
Diagnosis	Breast Cancer		
Cellularity	218 000/mcl (41,6-195)	Megacaryocytes:	enough
Number of cells	500	100	
Blasts	0,8 (0,2-0,6)		
	Granulocytic Row		
Promyelocytes	1,0 (1,0-4,1)		
	neutrophils	eosinophils	basophils
Myelocytes	9,8 (7,0-12,2)	0 (0-1,0)	0
Metamyelocytes	11 (8,0-15,0)	0 (0-1,2)	0
Bands	23,8 (12,8-23,7)	0,2 (0,1-1,2)	0
Segments	16,6 (13,1-24,1)	0,6 (0,4-2,4)	0 (0-0,4)
Sum of granulocytes		63,0 (57,1-66,5)	
Index of neutrophyl maturation		0,5 (0,5-0,9)	
	Monocytic Row		
Monoblasts	0		
Promonocytes	0		
Monocytes	2,2 (0,7-3,1)		
	Lymphoid Row		
Lymphoid cells	0	Plasmablasts	0
Prolymphocytes	0	Proplasmacytes	0
Lymphocytes	3,4 (4,3-13,7)	Plasmacytes	1,6 (0,1-1,8)
	Erythroid Row		
Pronormoblasts		0 (0,2-1,1)	
Normoblasts Basophylic		2,2 (1,4-4,6)	
Normoblasts Polychromatophylic		17,2 (8,9-16,9)	
Normoblasts oxyphylic		9,6 (0,8-5,6)	
Sum of erythroid cells		29,0 (14,5-26,5)	
Index of erythroid cell maturation		0,9 (0,7-0,9)	
Leuco-erythroid ratio		2,2 (2,1-4,5)	
	Description		
Bone marrow is hyper cellular. Enough megacaryocytes.			
Myelogram is normal.			
Metastatic cells are not found (6 smears investigated).			
Signatures of Physicians			

Рис. 3. Пример нормальной миелограммы у больной раком молочной железы. Морфологический подсчет клеточных элементов проводится в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» РАМН у всех больных раком молочной железы, направляемых на определение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге (контроль отсутствия разбавления периферической кровью).

Fig. 3. An example of normal myelogram of a breast cancer patient. Morphological count of cell elements is done at the Hemopoiesis Immunology Laboratory, N.N. Blokhin RCRC, RAMS, in all breast cancer patients referred to measurement of disseminated tumor cells in bone marrow (dilution control).

Рисунки к статье А.А. Ван де Лоосдрехт

А РОЛЬ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

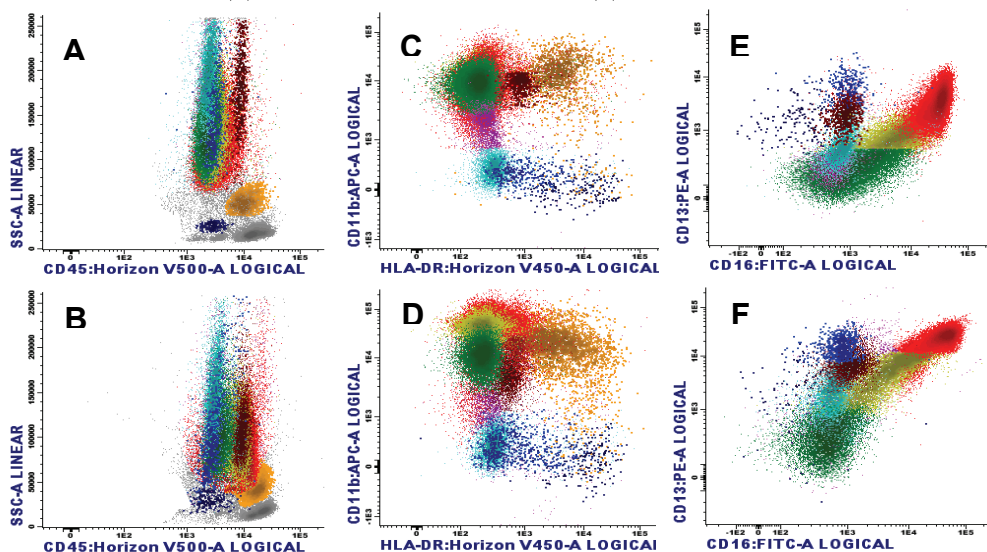


Рис. Иммунофенотипическая структура миеломоноцитарного компартмента в образце КМ больного с МДС по сравнению с нормальным контролем.

Многоцветные графики плотности для нормального костного мозга и костного мозга больного с МДС представлены в верхнем и нижнем рядах, соответственно. На графиках А и В по оси абсцисс показаны CD45 клетки, по оси ординат — характеристики бокового рассеяния (SSC). Показаны клеточные популяции миелоидных клеток-предшественников (CD45^{dim}/SSC^{low to intermediate}, темно-синий цвет), моноциты (CD45^{int}/SSC^{int}, оранжевый), и нейтрофилы (CD45^{dim}/SSC^{int to high}, разные цвета). Гранулярность (представленная как SSC нейтрофилов при МДС на графике В aberrantly понижена по сравнению с нейтрофилами нормального контроля (график А), т.е. наблюдается гипогранулярность; последнее также относится и к эозинофилам (коричневый цвет). На графиках С и D структуры созревания миеломоноцитарных субпопуляций показаны на графиках HLA-DR (ось абсцисс) и CD11b (ось ординат). Дифференцировка миелоидных клеток-предшественников HLA-DR+CD11b⁻ (темно-синий цвет) происходит в направлении по часовой стрелке до HLA-DR+CD11b⁺ нейтрофилов; дифференцировка в направлении HLA-DR+CD11b⁺ моноцитов (оранжевый) происходит против часовой стрелки. В случае МДС на графике D показана гиперэкспрессия CD11b на более зрелых нейтрофилах (красный и светло-зеленый). На графиках Е и F показаны некоторые субпопуляции нейтрофилов в пределах CD16 (ось абсцисс) и CD13 (ось ординат). На графике Е показано нормальное созревание от CD13^{dim}CD16⁻ незрелых нейтрофилов (голубой) через промежуточную фазу CD13^{dim} (зеленый) до зрелых нейтрофилов CD13^{dim}CD16⁺ (красный); эозинофилы представлены коричневым цветом. В случае МДС на графике F профиль созревания имеет аномальную вогнутую, а не выпуклую форму.

**ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Российский фонд
фундаментальных исследований**

***11-ая Международная конференция
«Иммунология гемопоэза»***

**Тема конференции:
«Костный мозг
онкологического больного»**

9-10 июня 2014 г.

***XIth International Conference
«Haematopoiesis Immunology»***

9-10 June, 2014

ПРОГРАММА

Весь день *Регистрация участников*

10.00-10.30 *Открытие конференции*

Приветственное слово чл.- корр. РАМН

профессора ***И.В. Поддубной*** (проректор Российской медицинской Академии последипломного, зав. кафедрой онкологии РМАПО)

Приветственное слово профессора

профессора ***С.А. Тюляндина*** (зам. директора НИИ КО РОНЦ имени Н.Н. Блохина)

Приветственное слово

профессора ***Сулеймана Динчера*** (Президента ассоциации гематологов Турции)

Приветственное слово

профессора ***З.Г. Кадагидзе*** (зав. централизованным клинико-лабораторным отделом РОНЦ имени Н.Н.Блохина)

Приветственное слово

профессора ***Д.Ш. Османова*** (зав. отделением химиотерапии гемобластозов РОНЦ имени Н.Н.)

Приветственное слово

профессора ***Н.Н. Тупицына*** (зав. лабораторией иммунологии гемопоэза РОНЦ имени Н.Н. Блохина)

10.30-12.30

Утренн «Общие вопросы иммунологии гемопоэза»

Председатели профессор ***В.Ю. Сельчук***, профессор ***Н.Н. Тупицын***

10.30-11.00

Профессор ***С.А. Тюляндин***, «*Роль костного мозга в гематогенном метастазировании*»

11.00-11.30

Профессор ***В.А. Хайленко*** «Насколько современные методы стадирования отражают истинную распространенность опухолевого процесса (индекс М, гематогенное метастазирование)»

11.30-12.00 *Кофе-брейк*

12.00-12.30

Пленарная лекция: ***Исследование костного мозга в онкологии***

Лектор: ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза РОНЦ профессор ***М.А. Френкель***

В ходе конференции пройдет конкурс работ молодых ученых

12.30-14.15

Председатели

зам. директора НИИ клинической онкологии РОНЦ, профессор **С.А.Тюляндин**, зам. директора НИИ детской онкологии и гематологии РОНЦ академик, профессор **В.Г. Поляков**, проф. **В.В. Родионов** (Ульяновск), проф. **И.К. Воротников**

12.30-12.50

Академик, профессор **В.Г. Поляков**, ст.н.с. к.м.н. **Т.В. Горбунова**
«Проблема поражения костного мозга в детской онкологии»

12.50-13.05

Л.Ю. Григцова «Иммунологическая оценка гемодилюции костного мозга (тест Локена)»

13.05-13.25

Профессор **К.И. Жордания**, канд.мед.наук И.И.Бокин «Костный мозг у больных раком яичников»

13.25-13.40

Кандидат медицинских наук **Е.В. Реутова** "Микрометастазы немелкоклеточного рака легкого в костном мозге"

13.40-13.55

Т.А. Григорьева, профессор **И.К. Воротников**, профессор **В.Ю. Сельчук** «Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных раком молочной железы»

13.55-14.15

Кандидат медицинских наук **А.М. Попов** (Екатеринбург) «Определение диссеминированных клеток нейробластомы в костном мозге с использованием многоцветной проточной цитометрии»

14.15-15.00 ОБЕД

15.00-16.30

Вечернее заседание

«Эритропоэз у онкологического больного»

Председатель профессор **О.А. Рукавицын**

15.00-15.20

Профессор **С.О. Подвязников**, кандидат медицинских наук **Е.Г. Тимонина** «Особенности эритропоэза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи»

15.20-15.35

Профессор **Н.Н. Тупицын** «Морфо-иммунологическая характеристика дифференцировки клеток эритроидного ряда»

15.35-16.00 СОТЭКС «Эритропоэтины в онкологии»

16.00-16.30 Дискуссия

9.30-11.05

Утреннее заседание «Вопросы гемопоэза, иммунологии и трансплантации костного мозга при раке»

Председатели профессор *С. Динчер*, к.м.н. *К.Н. Мелкова*

9.30-10.00

Профессор *С. Динчер* «Аллогенная трансплантация костного мозга.

Вопросы иммунологии»

10.00-10.20

доктор медицинских наук *И.Ж. Шубина, Ю.А. Борисова, Г.В. Смирнова*, профессор *М.В. Киселевский*, профессор *Е.М. Трещалина* «Изучение диссеминированных опухолевых клеток (СК19+) в костном мозге мышей после анти-эстрогенной терапии»

10.20-10.35

Г.Д. Петрова «Механизмы костномозгового действия и эффективность новых методов мобилизации стволовых гемопоэтических клеток»

10.35-10.50

О.А. Богомолова (Ульяновск) «Гемопоэз у больных раком молочной железы»

10.50-11.05

Кандидат медицинских наук *О.П. Колбацкая* «Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга при острых лейкозах у детей и взрослых»

11.05-11.30 Кофе-брейк

11.30-13.30

Совещание рабочей группы по иммунодиагностике минимальной остаточной болезни в онкогематологии

Председатели:

профессор *Е.А. Османов*, д.м.н. *А.В. Попа*, профессор *С.А. Луговская*,

профессор *Н.Н. Тупицын*

11.30-11.45

Старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук *Н.А. Купрышина* «Основы и нововведения в иммунодиагностике хронического лимфолейкоза»

11.45-12.00

Старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук *Л.Ю. Гривцова* «Основы и нововведения в иммунодиагностике острых лимфобластных лейкозов»

12.00-12.25

Кандидат медицинских наук *А.М. Попов* (Екатеринбург) «Результаты работы группы по иммунодиагностике МРБ в онкогематологии. Предложения по терминологии и набору маркеров»

12.25-12.45

Аспирант отделения химиотерапии гемобластозов НИИ ДООиГ РОНЦ *М.А. Шервашидзе* «Роль костного мозга в оценке МРБ при остром лимфобластном лейкозе у детей»

12.45-13.30 Выступления, предложения участников рабочей группы

13.30-14.30 Совместно с НПО «Петровакс фарм». «Полиоксидоний в онкологии»

14.30-14.50 Завершение работы конференции

Final programme

June 6, 2014

09.00

Welcome addresses from conference organizers

Professor Klaus Pantel, MD, Ph.D, University Medical Centre, Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Catherine Alix-Panabières, Ph.D, University Medical Center, Montpellier, UM1, Montpellier, France

Professor George Janossy, Academician of Hungarian Academy of Sciences, UCL, London, United Kingdom

09.20 Plenary lecture: “Major role of bone marrow in tumor cell dormancy, distant metastasis formation and patient’s death”

Lecturer: Professor Serge A. Tjulandin, MD, Ph.D, DSc., Deputy Director of Cancer Research Center, Moscow, Russia

Moderator: Professor George Janossy, Academician of Hungarian Academy of Sciences, London, United Kingdom

09.50 Immunohistological study of bone marrow in cancer patients

Chairman: Professor András Matolcsy, Head Dept. of Pathology, Budapest, Hungary

09.50 Malignancy in bone marrow: cellular interactions, Professor George Janossy

10.00 Classic immunohistology of trephine biopsies in malignancy: a bridge to the future, Professor Giovanni Pizzolo, Verona, Italy

10.30 Bone marrow involvement in cancer and haematological malignancies, Ekaterina Chigrinova, MD, PhD, Geneva, Switzerland

10.50 Stromal bone marrow microenvironment in cancer development, Mauro Krampera, Verona, Italy

11.20 Coffee break

11.30 Disseminated Tumor cell Biology

Chairman: Professor Serge A. Tjulandin, MD, Ph.D., Russia

11.30 DTC (Disseminated Tumor Cell) research: state-of-the-art & perspectives, Professor Klaus Pantel, MD, Ph.D, Hamburg, Germany

12.00 Challenges in DTC detection and viability assessment, Catherine Alix-Panabières, PhD, Montpellier, France

12.30 Role of Bone marrow in study of MRD in haematopoietic tumors and DTC in cancer, Professor Rawstron A., Ph.D., Consultant .Clinical Scientist, Leeds, United Kingdom

13.00 Interactions of Macrophages and Cancer Stem Cells, Vera Donn timerberg, PhD, Pittsburgh, USA

13.30 Lunch break

14.30 Normal and metastatic bone marrow

Chairmen: Professor Klaus Pantel, MD, Ph.D, Hamburg, Germany and Catherine Alix-Panabières, Ph.D, Montpellier, France

14.30 Cancer Stem Cells: Cell Type or Cell State? Professor Albert Donnenberg, , PhD, Pittsburgh, USA

15.00 Multicolor Flow Cytometric Analysis of Normal Bone Marrow, Professor Bruno Brando, MD, Milano, Italy

15.30 Coffee break

16.00 Selected oral presentations

Moderator: Professor Suleyman Dincer, President of Turkish Haematology association, Turkey

16.00 Antigen expression heterogenicity used for mrd monitoring in b-lymphoblastic leukemia, Valeriya Konashenkova, Ukraine

16.07 The monitoring minimal residual disease and maintenance therapy after autologous stem cells transplantation

in patients with multiple myeloma, Oleg Rukavitsyn, Russia

16.14 Stromal activation of bone marrow in infiltrative, lymphoid neoplasias, Judit Bedekovics, Hungary

16.21 Detection of Disseminated Tumor Cells (DTC) in Patients with NSCLC and Esophageal Cancer, Mikhail Kiselevskiy, Russia

16.28 CD138+ and CD138- multiple myeloma cells demonstrate different membrane expression of interleukin-6 receptor (CD126) and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3), Maria Kostjukova, Russia

16.35 Detection of disseminated neuroblastoma cells in bone marrow using multi-color flow cytometry, Alexander Popov, Russia

16.42 Detection of bone marrow DTC in breast cancer using Flow cytometry, Oksana Bogomolova, Russia

16.49 Cellular and humoral elements of the bone marrow microenvironment of breast cancer patients, Nadiia Semesiuk, Ukraine

16.56 New possibilities of disseminated breast cancer cell detection in bone marrow by acoustic flow cytometry (Attune), Olga Beznos, Russia

17.03 Pattern of bone marrow metastasis in solid tumours-A retrospective analysis at a Regional Cancer Centre In Kashmir, India, Shiekh Aejaz Aziz, India

17.10 End of the conferences

19.00 Evening in Budapest Operetta

June 7, 2014

09.00 Bone marrow immunology

Chairman: Professor Zaira G. Kadagidze, MD, Ph.D, DSc, Russia

09.00 Bone marrow myeloid-derived myeloid suppressor cells, Susanna

Mandruzzato, PhD, Padova, Italy

09.30 Bone marrow plasma cells and its subsets. Methodological aspects of study,

Bruno Paiva, MD, PhD, Salamanca, Spain

10.00 Peculiarities of bone marrow lymphocyte subpopulations in children with sarcomas,

Professor Nicolai N. Tupitsyn, MD, PhD, Russia

10.20 Non-haemopoietic tumour cell detection by flow cytometry. Case presentations, Zsuzsanna Hevessy, Associate Professor, Dept. Laboratory Medicine, University of Debrecen, Hungary

10.40 FISH (fluorescence in-situ hybridisation) on enriched bone marrow plasma cells, Anikó Újfalusi, Assistant Professor, Dept. Laboratory Medicine, University of Debrecen, Hungary

11.00 Discussion

11.30 Coffee break

12.00 Haematologists and oncologists - Special lecture

Chairmen: Professor János Kappelmayer, MD, PhD, Debrecen, Hungary

12.00 Normal bone marrow hemopoiesis and its regulation

Lecturer: Professor Elena B. Vladimirsky, Israel

12.30 Concluding remarks, Professor Janos Kappelmayer, MD, PhD, Debrecen, Hungary

12.45 Firm representatives: New technologies of bone marrow study

13.30 Lunch break

14.30 Round Table: High technology methods of BM DTC detection: practical recommendations

16.00 End of the congress

ОРГАНИЗАТОР КОНФЕРЕНЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский онкологический научный
центр имени Н. Н. Блохина»
Российской академии медицинских наук

При финансовой поддержке поддержке РФФИ,
грант №14-04-06015 г.



СПОНСОРЫ



XIth International Conference
«HÆMATOPOÏESIS
IMMUNOLOGY»
photos





















