

ISSN 1818-4820

ИММУНОЛОГИЯ
ГЕМОПОЭЗА

HAEMATOPOÏESIS
IMMUNOLOGY



2/
2008

Онкогематология:
Минимальная резидуальная болезнь

Oncohaematology:
Minimal residual disease



Обсуждение статьи по минимальной резидуальной болезни при ОЛЛ у детей. Бремен, в период конференции ESCCA, сентябрь 2008 года. Справа налево: George Janossy (London, UK, главный редактор журнала «Иммунология гемопоэза»), кандидат медицинских наук Ирина Н. Серебрякова (Москва, детский гемоцитолог, ведущий научный сотрудник группы гемоцитологии клинико-диагностической лаборатории РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН), Н. Н. Тупицын (Москва, главный редактор журнала «Иммунология гемопоэза»)

Discussion of MRD ALL in children. Bremen, ESCCA conference, September 2008. From right to left: George Janossy (London, UK, editor-in-chief of “Haematopoiesis Immunology”), Irina N. Serebryakova MD, PhD (children haemocytologist, Leading Research Scientist, Haemocytology Group of Clinical Diagnostic Laboratory, State N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow), N. N. Tupitsyn (Moscow, editor-in-chief of “Haematopoiesis Immunology”)

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

ISSN 1818-4820

УДК 616.—006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году

2/2008, Том 5Учредитель: ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН
(лаборатория иммунологии гемопоэза)**ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРЫ**

Н.Н.ТУПИЦЫН, G. JANNOSY (UK)

Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
 Е.Г. Турнянская (Москва)
 Е.В. Артамонова (Москва)
 Ж. Брошь (Франция)
 Дж. Виженес (Франция)
 Л.Ю. Гривцова (Москва)
 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 (Казakhstan)
 И.Н. Серебрякова (Москва)
 Г.С. Тумян (Москва)
 С.А. Тюляндин (Москва)
 А.В. Филатов (Москва)
 М.А. Френкель (Москва)
 С.А. Шинкарев (Липецк)
 Е.Н. Шолохова (Москва)
 А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
 Тел./факс +7(495) 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
 Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии ООО «Диджитал»
 Тираж 1000 экз. 3,5 физ. печ. л.
 При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна
 Макет: Б.Б. Крюков

HÆMATOPOÏESIS IMMUNOLOGY

ISSN 1818-4820

UDK 616.—006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006

2/2008, Vol. 5

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

EDITORS-IN-CHIEF

N.N.TUPITSYN, G. JANNOSY (UK)

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)
 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. Pupa (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 (Lipetzki)
 E.N. Sholokhova (Moscow)
 A.A. Iarilin (Moscow)

Adress of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478. Tel/fax +7(495) 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 in Limited company "Digital"
 Prinrun 1000 copies 3,5 printed sheets
 No reproduction is permitted without reference to Journal Hæmatopoïesis immunology
 Layout: B.B. Krykov

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА 4

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 6

*Л. Ю. Гривцова, А. В. Попа, Н. А. Купрышина, И. Н. Серебрякова,
М. Г. Божьева, Н. Н. Тупицин*
**ОЦЕНКА МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ
ИЗ В-ЛИНЕЙНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ У ДЕТЕЙ
МЕТОДОМ ТРЕХЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ 8**

Е. Е. Зуева, Е. Б. Русанова, А. В. Куртова
**ДИАГНОСТИКА МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ
И МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ 34**

Н. А. Купрышина, Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Тупицин
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ
ПО СТАНДАРТИЗОВАННОМУ
ЕВРОПЕЙСКО-АМЕРИКАНСКОМУ ПРОТОКОЛУ 2007 г.
Общие положения и иллюстрация на конкретном примере 60**

**ПРОГРАММА 5-Й РОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
"ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА", МОСКВА 5–6 ИЮНЯ 2008 г. 76**

*Организация 5-й Российской конференции с международным участием
"Иммунология гемопоэза" и публикация данного номера журнала
"Иммунология гемопоэза" поддержаны
Российским фондом Фундаментальных исследований, грант № 08-04-06041г.*

CONTENTS

FROM THE RUSSIAN EDITOR	5
-------------------------------	---

ABBREVIATIONS	7
---------------------	---

*L. Yu. Grivtsova, A. V. Popa, I. N. Serebryakova, M. G. Bozhieva,
N. N. Tupitsyn*

DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHILDREN WITH B-CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH SIMPLIFIED PROTOCOLS	9
---	----------

E. E. Zueva, E. B. Rusanova, A. V. Kurtova

THE DIAGNOSIS AND MONITORING OF RESPONSE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA	35
---	-----------

N. A. Kupryshina, L. Yu. Grivtsova, N. N. Tupitsyn

MINIMAL DISEASES MONITORING IN PATIENTS WITH B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA ACCORDING TO 2007 STANDARDIZED EUROPEAN-AMERICAN PROTOCOL. General notes and illustration as a care report	61
--	-----------

PROGRAM OF 5th RUSSIAN CONFERENCE WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION "HÆMATOPOÏESIS IMMUNOLOGY", MOSCOW JUNE 5–6, 2008	77
---	-----------

*Publication of this Journal is sponsored by Russian basic Research foundation,
grant № 08-04-06041z.*

ОТ РЕДАКТОРА

6 июня 2008 года состоялась 5-я Российская конференция с международным участием «Иммунология гемопоэза», программа которой размещена в конце журнала, а с докладами можно ознакомиться на сайте www.imhaemo.ru. Председателем конференции уже во второй раз являлся ведущий онкоиммунолог и признанный лидер и эксперт ВОЗ в области иммунологии СПИДа профессор George Janossy (London, UK). По окончании конференции на заседании редколлегии профессор G Janossy предложил посвятить очередной номер журнала проблеме минимальной резидуальной болезни в онкогематологии по материалам трех докладов, посвященных острому лимфобластному лейкозу у детей, множественной миеломе и хроническому лимфолейкозу.

Учитывая актуальность проблемы, появление в 2006–2007 гг. новых цитометрических протоколов стандартизации минимальной резидуальной болезни, а также роль этих исследований в выборе лечебной тактики, мы посвятили этой теме данный номер журнала.

Особую благодарность выражаю профессору G. Janossy за тщательное редактирование статей Л.Ю. Гривцовой и соавт. и Е.Е. Зуевой и соавт. Все замечания и исправления внесены в английский и русский тексты статей.

Представленные материалы будут полезны как для онкогематологов, так и для иммунологов, изучающих гемобластозы.

Главный редактор журнала «Иммунология гемопоэза/Haematopoiesis Immunology» профессор Н.Н. Тупицын

FROM THE RUSSIAN EDITOR

The 5th Russian Hæmatopoïesis Immunology conference with international participation was held on the 6th of June, 2008. You may find the conference programme at the end of this issue and the presented reports at www.imhaemo.ru. Professor George Janossy (London, UK), a prominent cancer immunologist, recognized leader and WHO expert in AIDS immunology, was in the chair of the conference for the second time.

At the meeting of the editorial board after the conference Professor G. Janossy proposed to devote the next issue of the journal to the problem of minimal residual disease in haematology malignancies and discuss it on the basis of three reports on acute childhood lymphoblastic leukaemia, multiple myeloma and chronic lymphoblastic leukaemia.

Taking into account the importance of this problem, the advent of new cytometric protocols for minimal residual disease standardization in 2006–2007 and the role of these tests in making clinical decisions we have focused on minimal residual disease in this issue of our journal. I should like to thank particularly Professor G. Janossy for his very careful editing of L.Yu. Grivtsova et al.' and E.E. Zueva et al.'s presentations. All his remarks have been taken into consideration and all recommended corrections have been made both in the English and Russian versions.

Hope that the presented reports will be useful both for oncohaematologists and immunologists specializing in haematology malignancies.

Professor N. N. Tupitsyn
Editor-in-Chief
Hæmatopoïesis Immunology
Russia

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ — антиген

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

β -ХЛЛ — В-клеточный хронический лимфолейкоз

ИГ — иммуноглобулин

ИФА — иммуноферментный анализ

ИФТ — иммунофенотипирование

ЛДГ — лактатдегидрогеназа

МК — моноклональный компонент

МКА — моноклональные антитела

ММ — множественная миелома

МНК — мононуклеарные клетки

МОБ — минимальная остаточная болезнь

МРБ — минимальная резидуальная болезнь

РБ — резидуальная болезнь

РИФ — реакция иммунофлуоресценции

ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз

ПК — плазматические клетки

ПЦ — проточная цитометрия

ПЦР — полимеразная цепная реакция

СОЭ — скорость оседания эритроцитов

СРБ — С-реактивный белок

ABBREVIATIONS

Ag, antigen

ALL, acute lymphoblastic leukemia

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

B-CLL, B-cell lymphocytic leukemia

BSA, bovine serum albumin

CD (cluster of differentiation) — кластер лейкоцитарных дифференцировочных антигенов

CRP, C-reactive protein

EIA, enzyme immunoassay

ESR, erythrocyte sedimentation rate

FC, flow cytometry

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

IG, immunoglobulin

IFR, immunofluorescence reaction

IPT, immunophenotyping

LDH, lactate dehydrogenase

MC, monoclonal component

Mab, monoclonal antibodies

MNC, mononuclear cells

MRD, minimal residual disease

RD, residual disease

PBS, phosphate buffered saline

PC, plasma cells

PCR, polymerase chain reaction

**ОЦЕНКА МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ
ИЗ В-ЛИНЕЙНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ У ДЕТЕЙ
МЕТОДОМ ТРЕХЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Л.Ю. Гривцова¹, А.В. Попа³, Н.А. Купрышина¹, И.Н. Серебрякова²,
М.Г. Божьева³, Н.Н. Тупицын¹*

¹лаборатория иммунологии гемопоэза ЦКЛО НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

²группа гемоцитологии клинко-диагностической лаборатории ЦКЛО НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

³отделение химиотерапии гемобластозов НИИ ДОГ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в клинической практике для оценки минимальной резидуальной болезни при ОЛЛ успешно используются два цитометрических подхода. Первый – это многопараметровая проточная цитометрия с использованием комбинаций моноклональных антител для выявления aberrантного иммунофенотипа бластов. Второй цитометрический метод, используемый в случае детекции МРБ при В-линейном ОЛЛ, основан на принципе элиминации В-клеточных предшественников (CD19⁺CD10⁺, CD19⁺CD34⁺ МНК–клетки) в ответ на введение кортикостероидов. Пропорция В–клеток с указанным фенотипом, выявленная среди клеток костного мозга в течение второй недели индукционной терапии отражает клиренс лейкоэмических клеток и дает возможность оценить полноту первичного ответа. Данный подход, реализуемый с использованием незначительного количества МКА (трехцветная проточная цитометрия) был применен в нашей лаборатории.

Пороговым в данном случае является 0,01% CD19⁺CD10⁺ и/или CD19⁺CD34⁺ мононуклеарных клеток в костном мозге на 15–19-й дни (в зависимости от протокола) лечения больных ОЛЛ из В-линейных предшественников. С использованием данного метода нами показано, что на 15-й день индукции ремиссии у большинства больных (82,4%) в случаях, когда морфологически процент бластных клеток в костном мозге не превышал 5,0 %, проточная цитометрия подтвердила наличие резидуальной болезни. У остальных больных, где морфологически выявлено не более 5,0 % бластных клеток в костном мозге на 15-й день химиотерапии индукции, цитометрически остаточных бластов не выявлено (менее 0,01 % среди МНК костного мозга).

Использование данного метода с высокой достоверностью позволяет выявить группу пациентов с высоким риском развития рецидива, требующих более интенсивного лечения, и, что не менее важно, пациентов, у которых интенсивность последующей химиотерапии может быть редуцирована.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дети, острый лимфобластный лейкоз, минимальная резидуальная болезнь, проточная цитометрия, CD19⁺CD10⁺–; CD19⁺CD34⁺–мононуклеарные клетки костного мозга.

**DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE
IN CHILDREN WITH B-CELL PRECURSOR
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA
WITH SIMPLIFIED PROTOCOLS**

L.Yu. Grivtsova¹, A.V. Popa³, I.N. Serebryakova², M.G. Bozhieva³, N.N. Tupitsyn¹

*¹Haematopoiesis Immunology Laboratory, Central Clinical Laboratory
Department, Clinical Oncology Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS*

*²Hemocytology Group, Clinical Diagnosis Laboratory, Central Clinical Laboratory
Department, Clinical Oncology Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS*

*³Haematology Malignancy Chemotherapy Department, Childhood Cancer
Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS*

Abstract

In the recent past two trends of flow cytometric methods have been successfully used for the clinically relevant detection of minimal residual leukemia: (I) the complex multiparameter analysis that utilizes combinations of flow tests for detecting aberrant phenotypes and (II) the use of simple and inexpensive assays during high-dose therapy for the common form of acute lymphoblastic leukemia of B-lineage origin. This second version that can be utilized with a small reagent panel has recently been introduced in our laboratory.

Measurement of portion of B-cell precursors (CD19⁺) expressing CD10 and CD34 antigens in bone marrow mononuclears on days 15 and 33 of induction chemotherapy shows the clearance of B-cell precursors in response to corticosteroid therapy. If leukemia remains, it is possible to identify this residual cells as >0.01% of CD19⁺CD10⁺ and/or CD19⁺CD34⁺ bone marrow mononuclear cells during the period of days 15–19 of initiating treatment. We compared this technique with morphological study to demonstrate that flow cytometry could find some definitive residual disease in most (82.4%) of patients in whom the bone marrow morphology was either negative or remained inconclusive (≤5% of blast cells). In other patients on day 15 with good morphological response (≤5% of blast cells) flow cytometry confirmed the clearance of leukaemic blasts.

This technique identifies patients who have a high risk of relapse requiring more intensive treatment. Furthermore in children with no residual disease the doses of further chemotherapy might be reduced.

Key words: children, acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, CD19+CD10+, CD19+CD34+ bone marrow mononuclear cells.

ВВЕДЕНИЕ

Ответ на лечение у детей, страдающих острыми лимфобластными лейкозами, зависит от множества факторов, как то: клинико-биологические свойства заболевания, дозы химиопрепаратов и их взаимодействия, а также от индивидуальной способности каждого пациента метаболизировать антилейкемические препараты [1]. Всё это находит отражение в лейкоемической циторедукции, определяемой как уровень клиренса лейкозных клеток в ходе 1-й фазы индукционной химиотерапии или, иначе говоря, уровень циркулирующих лимфобластов после первой недели лечения. При этом наличие более 5% бластных клеток в костномозговом пунктате, выявленное морфологически, по окончании индукционной химиотерапии ассоциируется с возрастанием риска рецидива заболевания [2; 3], и такие пациенты нуждаются в более интенсивном лечении, вплоть до высокодозной консолидации с последующей ауто- или алло-ТКМ.

Успешное лечение острого лимфобластного лейкоза во многом обусловлено стратификацией детей, больных ОЛЛ, в соответствии с принадлежностью к той или иной группе риска.

Стандартное определение группы риска проводится в зависимости от возраста ребенка, инициального уровня лейкоцитов в периферической крови, иммунофенотипа лейкозных клеток, данных цитогенетического и молекулярно-генетических исследований, а также эффективности ответа на кортикостероиды на 8-й день терапии по данным пункции костного мозга и морфологического исследования пунктата костного мозга на 15-й и 33-й дни индукции ремиссии.

Наиболее надежным критерием группы риска остается уровень лейкоемической циторедукции, именно он является ключевым для современных химиотерапевтических протоколов, включая протоколы BFM.

Для выявления так называемой резидуальной болезни, то есть остаточных лейкоемических бластов, при ОЛЛ используются морфологические методы определения процента бластных клеток в периферической крови на 7-й и в костном мозге на 15-й дни химиотерапии [4–6]. К сожалению, морфологические методы не всегда позволяют выявлять группу пациентов с очень хорошим ответом или, напротив, с плохим ответом на химиотерапию, так как порог чувствительности этих методов составляет приблизительно 10^2 . Кроме того, морфологически трудно отличить лейкоемические бласты от регенерирующих костномозговых предшественников, что особенно актуально при проведении исследования на 33-й день и в более поздние сроки.

Большинство прогностически значимых данных в отношении РБ получено с использованием метода полимеразной цепной реакции [7–9]. Однако ПЦР-диагностика – метод, который не может быть использован повсеместно, и альтернативой в данном случае, являются иммунологические методы, как легко воспроизводимые, хорошо стандартизованные и менее дорогостоящие [10–12].

Introduction

The response to the treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) depends upon many factors including the clinical and biological features of the diseases and the chemotherapy dose and interactions, and individual capacity of patients to metabolize antileukemic agents [1]. All these factors are reflected in leukemic cytoreduction defined as degree of leukemia cell clearance during induction chemotherapy phase 1. In other words, the levels of circulating lymphoblasts after the first weeks of treatment are indicative of the therapeutic effects. The presence of 5% of blasts in bone marrow biopsies by morphological study after induction chemotherapy completion is known to be associated with increased risk of relapse [2; 3]. Such patients require more intensive therapy leading to high-dose consolidation regimens including autologous or allogeneic bone marrow transplants (BMT). Consequently, successful treatment of children with ALL depends, to a high degree, upon the stratification of patients into different groups in which the leukemia clearance is one of the most important factors.

The conventional risk stratification factors include the patient age, initial leukocyte level in peripheral blood, leukemia cell phenotype, cytogenetic and molecular genetic findings as well as the early response therapy on day 8 backed up by the bone marrow morphology on days 15 and 33 of remission induction.

Detection of residual disease (RD) or residual leukemic blasts in ALL is routinely based on quantification of blasts in peripheral blood on day 7 and in bone marrow on day 15 of chemotherapy by morphological techniques [4–6]. Unfortunately, however, the morphological tests often fail to identify patients with very good or with very poor response to chemotherapy because their relative lack of sensitivity at the detection threshold about 10^2 . Besides, it is difficult to differentiate leukemic blasts from regenerating bone marrow precursors, a factor which is emerging into importance around day 33 and later time points of assessments.

Polymerase chain reaction (PCR) provides prognostically significant findings with respect to RD [7–9] but PCR diagnosis is not available for routinely use. It has also been documented that immunological techniques are a good alternative as these tests are easily reproducible, well standardized and in their simplified mode cost less [10–12].

В основе большинства иммунологических протоколов выявления РБ, осуществляемых с использованием многоцветной проточной цитометрии, лежит понятие аберрантного иммунофенотипа, что позволяет разграничить лейкоэмические бласты и нормальные костномозговые предшественники.

Аберрантный иммунофенотип лейкозной клетки описан достаточно давно, еще в 1980-х гг. [13; 14] и только сравнительно недавно этот принцип стал использоваться для диагностики и мониторинга РБ при гемобластозах [10–12; 15].

Как таковой аберрантный иммунофенотип при остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников может проявляться как в гиперэкспрессии отдельных молекул (CD10, CD34, CD58), так и, напротив, в снижении экспрессии на бластах таких антигенов как CD44, CD45RA, CD11a. Частота подобных aberrаций не всегда является высокой и варьирует от 2,0 до 70,0 % [16; 17].

Все сказанное выше требует подбора оптимальных комбинаций антител для каждого конкретного случая РБ и необходимости сравнения с первичным иммунофенотипом.

Кроме того, следует учитывать два таких важных, как бы взаимоисключающих друг друга, момента – гипоклеточность костного мозга на 15-й день лечения ОЛЛ и необходимость набора достаточного количества клеток для анализа из каждой пробы (от 100 000 до 500 000) для того, чтобы выявить единичные лейкоэмические клетки, составляющие менее 0,1% среди мононуклеаров.

Таким образом, назревает необходимость максимально сократить количество проб (часто всего до 1 пробирки) или использовать многоцветный проточно-цитометрический анализ.

Так группа BFM-I использует четырехцветную ПЦ при детекции МРБ. Основная диагностическая панель при остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников выглядит в данном случае следующим образом (FITC/PE/PE-су7/APC):

1. Syto16/CD10/CD45/CD19
2. CD20/CD10/CD34/CD19
3. CD10/CD34/CD45/CD19
4. CD10/CD11a/CD45/CD19

Таким образом, аберрантный иммунофенотип выявляется на основании уровней экспрессии и коэкспрессии антигенов CD10, CD34, CD45, CD58. В ряде случаев учитываются клетки с экспрессией CD66с (KOR-SA3544), а также экспрессия антигена CD20, появление которого на незрелых В-линейных предшественниках является асинхронным.

Одновременная оценка не только CD34 и CD10, но и CD20 на В-линейных CD19⁺ клетках-предшественниках дает дополнительное преимущество в оценке МРБ при ОЛЛ из В-линейных предшественников. По нашим данным частота выявления антигена CD20 на пре-пре-В лимфобластах составляет 15,3%.

Most immunological protocols for RD detection involve multicolor flow cytometry (FC) based on the concept of finding the aberrant phenotype(s) which allow the differentiation of leukemic blasts from the normal bone marrow precursors. These assays for aberrant leukemic cell phenotype were described as early as in the eighties [13; 14], and their utilization in the RD diagnosis and monitoring of patients with hematology malignancies now represent an accepted technology [10–12; 15].

Such aberrant phenotypes in B-cell precursor ALL may present themselves both as overexpression of individual molecules (CD10, CD34, CD58) or a reduced expression of antigens such as CD44, CD45RA, CD11a on the leukemic blast cells. The occurrence rate of the individual aberrations varies from 2–70.0% [16; 17].

Therefore there is a need to select optimal antigen combinations in individual patients and to re-investigate these combinations while the patient is on therapy. Using multiple tests can be problematic when the bone marrow is hypocellular on day 15 of ALL treatment.

For instance, the BFM-I group detects MRD with a principal diagnostic panel for B-cell precursor ALL using four-color immunofluorescence (FITC/PE/PE-cy7/APC) as follows:

- (I) Syto16/CD10/CD45/CD19;
- (II) CD20/CD10/CD34/CD19;
- (III) CD10/CD34/CD45/CD19;
- (IV) CD10/CD11a/CD45/CD19.

The aberrant phenotypes are therefore identified by CD10, CD34, CD45, CD58 expression and their coexpression levels. In some cases CD66c⁺ (KOR-SA3544) cells are counted together with CD20 expression as a sign of asynchronous immature B-cell development.

The simultaneous identification of CD34, CD10 and CD20 on CD19⁺ B-cell precursors also provides additional benefits in the MRD diagnosis of B-cell precursor ALL. By our findings, frequency of unusually high CD20 expression on pre-pre-B lymphoblasts is seen in around 15% of patients.

Использование многоцветной проточной ПЦ в целом позволяет оценивать и уровень циторедукции на 15-й день индукционной химиотерапии, и полноту ремиссии на 33-й и 72-й дни химиотерапии, и выявлять до 95 % случаев РБ при ОЛЛ из В-линейных предшественников у детей.

На основании данных группы BFM-AIEOP четко определены критерии детекции РБ при ОЛЛ методом 4-цветной проточной цитофлуориметрии. Стандартный риск — это присутствие в костном мозге на 15-й день клеток с соответствующим иммунофенотипом менее 0,1% среди нуклеарных клеток, средний риск — выявление от 0,1 до 1,0% бластных клеток с исходным иммунофенотипом и группа высокого риска — пациенты, в костном мозге которых на 15-й день индукции выявляется 1,0% и более опухолевых бластов [18].

Настоящим прорывом в области цитофлуориметрической детекции минимальной резидуальной болезни у детей с ОЛЛ явилась статья Coustan-Smith et al. [19], где внимание было обращено на то, что CD19⁺–костномозговые клетки предшественники, экспрессирующие CD10 или CD34, являются высокочувствительными к кортикостероидам. То есть, использован совершенно иной подход, основанный на факте элиминации В-линейных предшественников из костного мозга, а не поиск аберрантного иммунофенотипа. Новый подход к детекции МРБ, основанный на концепции клиренса В-линейных предшественников был применен и апробирован в госпитале St. Jude (Мемфис, США) и распространен в медицинских центрах Бразилии, Гватемалы и Гондураса.

Факт элиминации В-клеток в ходе первой недели химиотерапии индукции был подтвержден на иных, нежели лейкозы, болезнях. Кроме того, у больных с Т-линейными острыми лимфобластными лейкозами и с опухолями мозга через 2 недели индукционной терапии CD19⁺–клетки, экспрессирующие CD10 и/или CD34, отсутствовали вовсе, либо их количество не превышало 0,01% процента среди мононуклеарных клеток [19].

Предложенный метод детекции резидуальных бластов с использованием трехцветной ПЦ прост, легко воспроизводим, не требует больших панелей антител и многократного гейтирования при анализе. В основе метода — выявление фракции мононуклеарных клеток, на основании параметров светорассеяния, в пределах которых выбирается гейт CD19⁺ клеток. Далее именно в области CD19⁺–мононуклеарных клеток определяется пропорция CD34⁺ и/или CD10⁺ клеток. Определение резидуальной болезни в данном случае не является дорогостоящей процедурой, что тоже немаловажный факт.

Этот метод и предложенный новый пороговый уровень (более 0,01% мононуклеарных CD19⁺CD10⁺ и/или CD34⁺ клеток) позволили унифицировать детекцию МРБ при ОЛЛ из В-линейных предшественников через две недели проведения индукционной химиотерапии. На основании данного протокола среди больных с подтвержденной МРБ (>0,01% CD19⁺CD34⁺ или CD19⁺CD10⁺ мононуклеарных клеток) выделяют три группы пациентов.

All these tests of multicolor FC also allow the quantification of cyto-reduction on days 15, 33 and 72 of induction chemotherapy, leading to the identification of up to 95% of RD cases in childhood B-cell precursor ALL. Thus the findings of the BFM-AIEOP study defines the RD in ALL by 4-color FC as patients in the standard risk group (presence of $<0.1\%$ aberrant cells among nucleated cells in bone marrow), medium risk group (the presence of $0.1\text{--}1.0\%$ aberrant blasts) and the high risk group (presence of $>1.0\%$ aberrant blasts on day 15; ref. 18).

These assays however can be the subject of further simplification due to the observation that the normal B-lineage precursor cell in the bone marrow are exquisitely steroid sensitive and are absent in the marrow of patients following induction therapy during the period of 15–19 days of treatment [19]. These authors have found that $CD19^+$ bone marrow precursors with CD10 or CD34 expression are amongst the cells responding to corticosteroids. A novel approach based on the concept of clearance of B-cell precursors from bone marrow has been introduced both in the St. Jude institution in Memphis and in an outreach to the countries such as Brazil, Guatemala and Honduras.

This observation was also confirmed in diseases other than B-lineage leukemia. It was also shown [19] that in patients with T-cell ALL or brain tumors $CD19^+$ cells with CD10 and/or CD34 expression were either absent completely or not more than 0.01% of MNC while this individuals received intensive corticosteroid therapy.

The proposed residual blast detection technique using 3-color FC is easily reproducible, does not require large antibody panels and multiple gating. The technique is based on detection of MNC fraction by light scatter parameters within which a gate of $CD19^+$ cells is identified. Further, proportion of $CD34^+$ and/or $CD10^+$ cells is measured in the $CD19^+$ MNC region.

This technique with a threshold of $> 0.01\%$ of $CD19^+CD10^+$ and/or $CD34^+$ MNC resulted in a unified test for treated B-cell precursor ALL cases after 2 weeks of induction chemotherapy. Among the patients with MRD 3 patient groups are identified. In a group 1 patients have $0.01\text{--}0.1\%$ $CD19^+$ cells expressing CD10 or CD34 in bone marrow MNC. In group 2 patients show $0.1\text{--}1.0\%$ residual cells and patients with $> 1.0\%$ $CD19^+$ MNC expressing CD10 and/or CD34 belong to group 3.

Первая группа: больные, среди мононуклеарных клеток костного мозга которых выявлялось 0,01% до 0,1% CD19⁺ клеток с экспрессией CD10 или CD34.

Вторая группа: 0,1%–1,0% подобных клеток.

Третья группа: пациенты, в костном мозге которых присутствует 1,0% и более CD19⁺ мононуклеарных клеток, экспрессирующих CD10 и/или CD34.

С 2007 года данный протокол по оценке МРБ у детей с острыми лимфобластными лейкозами применен в отделении химиотерапии гемобластозов (руководитель д.м.н. А.В. Попа) НИИ ДОГ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и осуществляется в лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и группе гемоцитологии клинко-диагностической лаборатории НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено 21 ребёнку (10 мальчиков и 11 девочек) с впервые установленным диагнозом острого лимфобластного лейкоза. В группу были включены дети, проходившие лечение в НИИ ДОГ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2007–2008 гг. по протоколу ALL-IC BFM 2006.

У всех детей диагностирован «общий» (common) пре-пре-В иммуноподвариант ОЛЛ.

Средний возраст по группе составил 6 лет с разбросом от 2 до 16 лет.

Оценку первичного иммунофенотипа бластных клеток проводили в день 0 химиотерапии по стандартному протоколу, принятому в лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН [20] с использованием трехцветной проточной цитометрии.

При этом диагностическая панель включала как линейно-нерестриктированные антигены (HLA-DR, CD38, CD34, CD10), так и маркеры основных линий дифференцировки – Т-линейные (CD7, CD3, CD5, CD4, CD8), В-линейные – CD19, CD20, CD22), миелоидные – CD13, CD33, моноцитарный антиген CD64, маркер NK-клеток – CD56, маркер эритроидного ростка – гликофорин А и мегакариоцитарного ростка CD61. Дополнительно на цитопрепаратах оценивалась экспрессия иммуноглобулинов (суIgM), при необходимости оценивали цитоплазматическую экспрессию CD22 и ядерную – терминальной дезокси-рибонуклеотидил-трансферазы (TdT).

Во всех случаях (табл. 1) бластные клетки имели фенотип В-линейных предшественников с мономорфной экспрессией антигена CD10 и в большинстве случаев (17 из 20) с выраженной пропорцией бластных клеток, экспрессирующих антиген CD34 на разном уровне (от слабой до ярко выраженной, мономорфной экспрессии). У 3 пациентов бластные клетки не экспрессировали стволовых клеток антиген CD34 (менее 10,0% АГ⁺ бластов). Пример иммунофенотипа бластных клеток приведен на рис. 1.

Детекцию остаточных лейкоэмических бластов в костном мозге выполняли на 15-й и 33-й дни индукционной химиотерапии.

Since 2007 in our Hematology Malignancy Chemotherapy Department, Childhood Cancer Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS this protocol of MRD diagnosis in children with ALL has been used. The test is currently running in the Hæmatopoïesis Immunology Laboratory in comparison with the morphological analysis performed at the Hemocytology Group, Clinical Diagnosis Laboratory, Central Clinical Laboratory Department, Clinical Oncology Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS.

Materials and methods

A total of 21 children (10 boys and 11 girls) with a mean age of 6 (range 2–16 years) newly diagnosed ALL enrolled in this study were treated by ALL-IC BFM 2006 protocol at the Childhood Cancer Research Institute, N.N. Blokhin RCRC RAMS during 2007 through 2008.

All patients had common pre-pre-B ALL immunosubtype.

The initial immunophenotyping was done at baseline by the standard protocol of 3-colour FC adopted at the Hæmatopoïesis Immunology Laboratory, CORI, N.N. Blokhin RCRC RAMS [20]. This diagnostic panel included the non-lineage restricted antigens (HLA-DR, CD38, CD34, CD10) and the markers of lineage differentiation for T-cells (CD7, CD3, CD5, CD4, CD8), B-cells (CD19, CD20, CD22) as well the markers for myeloid (CD13, CD33), monocytic (CD64) and the NK-cell lineage (CD56). The erythroid (glycophorin A) and megakaryocyte markers (CD61) were also used. In addition, in some cases the Ig expression (cyIgM), the cytoplasmatic display of CD22 and nuclear expression of terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT) were also evaluated.

In all of our cases the leukaemic blasts have expressed CD10, albeit to a different degree (Table 1). In 17 one of 21 cases a large portion of blasts showed various degrees of CD34 expression (from weak to uniformly high expression). In three patients the blasts have not expressed detectable stem-cell antigen CD34 (< 10.0% of CD34⁺ blasts). Fig. 1 demonstrates an example of blast immunophenotype.

Detection of residual leukemic blasts in bone marrow was done on days 15 and 33 of induction chemotherapy.

Таблица 1 / Table 1

Сводные данные о больных / Patient characteristics

Данные пациента / Patient person			Характеристика лейкоза / Leukosis characteristics				
			Иммуно- подвариант / Immunosubtype	% бластных клеток / Blast percentage	Иммунофенотип (%% АГ+ бластных клеток) / Immunophenotype (% of Ag+ blasts)		
№	Возраст (лет) / Age	Пол / Gender			CD19	CD10	CD34
1	3	М/М	Пре-пре-В / common	92,8	74,5	69,9	67,2
2	4	М/М	Пре-пре-В / common	90,4	91,6	90,5	93,6
3	9	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	87,4	51,8	59,2	61,4
4	15	М/М	Пре-пре-В / common	96,2	97,5	95,3	1,7
5	13	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	94,2	95,3	94,2	94,3
6	4	М/М	Пре-пре-В / common	98,4	94,5	94,5	92,9
7	9	М/М	Пре-пре-В / common	77,2	74,9	86,0	8,3
8	5	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	93,2	96,2	97,8	96,5
9	11	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	93,2	54,8	41,0	5,1
10	4	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	97,6	79,5	46,2	79,6
11	7	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	48,6	95,8	95,4	57,8
12	2	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	79,6	77,5	25,4	62,0
13	3	М/М	Пре-пре-В / common	98,2	79,9	76,3	70,4
14	2	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	67,8	25,1	53,1	8,0
15	7	М/М	Пре-пре-В / common	89,8	98,1	97,8	90,1
16	6	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	84,6	95,8	91,9	51,2
17	3	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	96,0	85,8	86,2	87,6
18	5	М/М	Пре-пре-В / common	96,4	86,4	89,4	81,8
19	6	М/М	Пре-пре-В / common	90,0	96,4	94,4	91,0
20	16	Ж/Ф	Пре-пре-В / common	72,4	97,5	97,4	42,8
21	2	М/М	Пре-пре-В / common	93,4	96,2	98,3	76,2

Таблица 2 / Table 2

Сопоставление иммунологических и морфологических показателей костного мозга детей с ОЛЛ на 15-й и 33-й дни химиотерапии индукции / Comparison of bone marrow specimens harvested for residual disease detection on days 15 and 33 of induction chemotherapy

Показатель / Characteristic	15-й день / Day		33-й день / Day		Уровень значимости различий / P value
	Среднее / Mean	К-во / n	Среднее/ Mean	К-во / n	
Клеточность / Cellularity $\times 10^3$ /мкл / mcl	19,8 4,23 2,5–60,0	15	17,4 2,9 $\times 10^3$ /мкл 2,0–45,0	15	0,957
Лимфоидные элементы / Lymphoid elements %%	55,8 4,85 14,0–88,0	21	40,4 3,56 15,2–69,5	19	0,029
Бласты / Blasts %%	5,9 2,9 0,0–60,8	21	1,26 0,35 0,0–5,8	19	0,11
В-клетки / B-cells (CD19 ⁺) %% из мононуклеаров / of mononuclears	19,06 3,35 2,85–64,1	21	8,81 2,29 0,7–42,3	19	0,001
CD19 ⁺ CD10 ⁺ % мононуклеаров / of mononuclears	5,59 3,11 0,0–58,9	21	1,96 1,91 0,0–36,4	19	0,11
CD19 ⁺ CD34 ⁺ %% мононуклеаров / of mononuclears	3,7 2,6 0,0–52,2	21	0,83 0,8 0,0–15,3	19	0,15

При этом костный мозг в количестве 0,5–1 мл забирался в пробирки Vacutainer (BD, USA) с сухим ЭДТА. Из присланного материала готовили мазки для подсчета миелограммы. Подсчет контрольной миелограммы производили двумя морфологами (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма.

В остальном материале осуществляли подсчет клеточности образца и проводили прямую реакцию иммунофлуоресценции с использованием прямых конъюгатов моноклональных антител и тройной флуоресцентной метки. Результаты реакции оценивали на приборе FACScan (BD, USA) в соответствии с методом, предложенным E. Coustan-Smith et al. (Blood, 2006).

Для постановки РИФ из костномозговых аспиратов выделяли фракцию мононуклеарных клеток на градиенте плотности фиколл-верографин. В ряде случаев проводили лизис эритроцитов и мононуклеары гейтировали при проведении ПЦ. Клетки инкубировали с моноклональными антителами, напрямую конъюгированными с флуорохромами. В представленной реакции нами использованы следующие комбинации моноклональных антител (МКА) и флуорохромов: МКА к CD19 конъюгированы с флуорохромом пиридининхлорофилл – PerCP или PE-cy5 (выявляется на канале FL3 при проточной цитометрии), МКА к CD10 конъюгированы с флуорохромом фикоэритрин – PE (метка выявляется FL-2 детектором при проточной цитометрии) и МКА к антигену CD34 с флуорохромной меткой флуоресцеинизотиоционат (FITC, FL-1 детектор при проточной цитометрии). Диагностическая панель РБ при этом состояла из 2-х пробирок:

(I)CD19PerCP/IgG1PE/IgG1FITC

(II)CD19PerCP/CD10PE/CD34FITC

После 20 минут инкубации клетки отмывали дважды по 5 минут центрифугированием при 1000 g в PBS с добавлением 0,5% сывороточного альбумина. После отмывки реакцию оценивали на проточном цитометре.

Для выявления минимального количества остаточных лейкоэмических бластов в каждой пробе набирали не менее 100 000 мононуклеаров. В гейте мононуклеарных клеток, выделенных на основании характеристик прямого и бокового светорассеяния (FSC/SSC) (рис. 2a), оценивали экспрессию антигена CD19, далее в пределах гейта CD19⁺ мононуклеарных клеток (рис. 2b) оценивали пропорцию CD10⁺ и CD34⁺ клеток (рис. 2c).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как и ожидалось, в большинстве случаев при морфологическом исследовании, выполненном у 21 ребенка (табл. 2) с ОЛЛ из В-линейных предшественников, на 15-й день индукционной химиотерапии костный мозг был гипоклеточным, в среднем $19,8 \pm 4,2 \times 10^3/\text{мкл}$ (от 2,5 до $60,0 \times 10^3/\text{мкл}$) вследствие интенсивной химиотерапии.

При этом средний процент бластных клеток костного мозга составил 5,9% (от 0,0 до 60,8%). В большинстве образцов среди клеток костного мозга преобладали лимфоидные элементы, и их средний процент на 15-й день лечения составил $55,8 \pm 4,8\%$ (от 14,0 до 88,0%).

To perform the tests 0.5–1 ml of bone marrow was collected to Vacutainer (BD, USA) tubes with dry EDTA. Smears for myelogram were prepared. The morphological study was performed on Pappenheim stained samples by two experienced pathologists based on 250 cells each. The remaining material was used in the assays for bone marrow cellularity and the immunofluorescence (IF) staining with directly conjugated antibodies used in triple labeling combinations as described below. The samples were evaluated on a FACScan (BD, USA) flow cytometer using a procedure described by Coustan-Smith et al. [19].

The mononuclear fractions of the bone marrow samples were separated on ficoll–verografin density gradient and the red blood cells were lysed. Following the incubation with directly labeled monoclonal antibodies (Mab). The following Mab and fluorochrome combinations were used: Mab to CD19 conjugated with pyridine chlorophyll PerCP or PE-cy5 was detected in FL-3 channel. Reagents to CD10 conjugated with phycoerythrin (PE) and to CD34 conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) were detected in the FL-2 and FL-1 channels, respectively. The RD panel included two tubes: (i) CD19PerCP/IgG1PE/IgG1FITC and (ii) CD19PerCP/CD10PE/CD34FITC.

After incubation for 20 min the cells were washed twice for 5 min in phosphate buffered saline (PBS) with 0.5% of serum albumin. At least 100 000 MNC were counted on the flow cytometer to detect minimal amount of residual leukemic blasts in each sample. CD19 expression was measured in the MNC gate identified by forward and side light scatter (FSC/SSC) (Fig. 2a), then portions of CD10⁺ and CD34⁺ cells (Fig. 2c) were evaluated within the CD19⁺ MNC gate (Fig. 2b).

Results

As expected, the morphological assessments performed on day 15 using the bone marrow samples of 21 children with ALL (tab. 2) demonstrated bone marrow hypocellularity ($19.8 \pm 4.2 \times 10^3/\text{mcl}$; range 2.5 to $60.0 \times 10^3/\text{mcl}$) due to the intensive chemotherapy. The average blast proportion was 5.9% (median 1.5%, range 0.0 to 60.8%) and the dominant cell types among bone marrow cells were the cells of lymphoid appearance ($55.8 \pm 4.8\%$; range 14.0 to 88.0%).

К лимфоидным элементам относили как зрелые лимфоциты, так и мелкие клетки со сглаженной структурой хроматина и высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

У четырех больных (19,0%) из всей анализируемой группы к 15-у дню индукционной химиотерапии адекватного ответа на лечение получено не было – в костном мозге морфологически выявлялось более 5,0% бластных клеток (табл. 3). По данным проточной цитометрии во всех этих случаях выявлялся выраженный процент лейкоэмических бластов (CD19⁺ мононуклеарных клеток с экспрессией CD10 и CD34). У 17 больных из нашей группы по данным морфологического исследования была достигнута морфологическая ремиссия (<5,0% бластов в костном мозге).

Как показало наше исследование, проточная цитометрия в совокупности с морфологической оценкой, выполненная на 15-й день индукционной химиотерапии, оказалась более чувствительной с точки зрения детекции минимальной резидуальной болезни, чем только данные морфологии. Так на основании данных экспрессии антигена CD19 показано, что $19,1 \pm 3,4\%$ мононуклеарных клеток костного мозга составляли В-клетки. И в большинстве случаев лишь незначительный процент CD19⁺ В-клеток демонстрировал экспрессию антигенов CD10 и/или CD34 (рис. 3 с, d), что расценивалось как факт МРБ. Важно отметить, что только у 3 (14,3%) из 21 больного по данным проточной цитометрии РБ не выявлено – < 0,01% CD19⁺CD10⁺ и/или CD19⁺CD34⁺ (рис. 3 а, b). При этом у одного из этих трех больных морфологически бласты не выявлены, а у 2 других процент бластных клеток составил 0,2% и 1,5%. Процент лимфоидных элементов костного мозга в данных случаях был значительным (44,8%; 69,2% и 65,0%).

У остальных 18 больных данные проточной цитометрии подтвердили наличие МРБ. Так на 15-й день исследования минимальные признаки РБ (0,01–0,1% CD19⁺ мононуклеарных клеток с экспрессией CD10 или CD34) выявлены нами у 4 больных, у 6 больных выявлены средние уровни МРБ (0,1–1,0% CD19⁺CD10⁺ или CD19⁺CD34⁺ МНК костного мозга). И у 8 больных среди мононуклеаров костного мозга выявлялось более 1,0% CD19⁺CD10⁺ или CD19⁺CD34⁺ клеток (высокий уровень МРБ). Уровни МРБ при этом не зависели от клеточности образцов и от пропорции лимфоидных клеток в образце. Так, например, из 6 пациентов со средними уровнями МРБ (0,1–1,0%) у 5 костный мозг был гипоклеточным (от $2,5$ до $16,0 \times 10^3$ кл/мкл), и в одном случае костный мозг был нормоклеточным ($60,0 \times 10^3$ кл/мкл; табл. 4).

Таким образом, несмотря на то, что к 15-му дню индукционной химиотерапии у 80,9% (17/21) больных с ОЛЛ из В-линейных предшественников была достигнута морфологическая ремиссия (< 5,0% бластных клеток в костном мозге), проточная цитометрия, как более чувствительный метод, выявила отсутствие МРБ только в 14,3% (3/21) случаев (< 0,01% CD19⁺ мононуклеарных клеток костного мозга с экспрессией CD10 и CD34).

These lymphoid-looking elements included both cells with the morphology of mature lymphocytes and small cells with smooth chromatin structure and high nucleus–cytoplasm ratio.

When observed by expert morphological assessment on day 15 four (19.0%) of our patients clearly demonstrated inadequate response to chemotherapy (tab. 3) with >5.0% of blasts in bone marrow. In these 4 cases FC confirmed the presence of ALL blasts. At the same time on day 15, 17 patients achieved apparent morphological remission with <5% of blasts in bone marrow.

As expected, the FC analysis performed on day 15 was more sensitive to detect leukaemia than the morphology alone. By using CD19 B cell marker it could be shown that about $19.1 \pm 3.4\%$ of cells within bone marrow MNC were B-lymphoid. Clearly, only some of these CD19⁺ B cells expressed the CD10 and/or CD34 markers (Fig. 3); these were regarded as signs of MRD. Importantly, only three of 21 patients had no evidence of RD by flow cytometry with <0.01% of CD19⁺,CD10⁺ and/or CD19⁺,CD34⁺ MNC (Fig. 3). One of these 3 patients presented with no blasts and the other two had 0.2 and 1.5% of blasts by morphology; their overall portions of lymphoid elements were high (44.8, 69.2 and 65.0%).

Among all the 18 patients who had MRD according to flow cytometry, 4 had minimal RD levels (0.01 to 0.1% of CD19⁺CD10⁺ and/or CD19⁺CD34⁺ bone marrow MNC); six had medium (0.1 to 1.0%) and 8 had high MRD levels (>1.0%). These values of MRD were apparently unrelated to the low or moderate bone marrow cellularity or to the size of the total lymphoid compartments seen in these samples. For example, among the 6 patients with medium (0.1–1%) MRD 5 had very low bone marrow cellularity (2.5 to $16.0 \times 10^3/\text{mcl}$) and the remaining patient presented with normal cellularity ($60.0 \times 10^3/\text{mcl}$; tab. 4).

Thus, by day 15 of chemotherapy 80.9% (17/21) of patients with B-cell precursor ALL achieved morphological response (<5.0% percentage of blasts) but with the more sensitive FC only 14.3% (3/21) of patients were free of MRD (<0.01% of bone marrow MNC).

Таблица 3 / Table 3

Проточно-цитометрическое определение резидуальной болезни при ОЛЛ у детей с отсутствием морфологической ремиссии (более 5,0% бластов в костном мозге) на 15-й день индукционной терапии / Flow cytometric detection of residual disease in children with ALL and no morphological response on day 15 (more than 5.0% of blasts in bone marrow)

№	% бластных клеток / Blasts (морфология) / (morphology)	%% CD19 ⁺ CD10 ⁺ Мононуклеарных клеток / of mononuclears	%% CD19 ⁺ CD34 ⁺ Мононуклеарных клеток / of mononuclears
3	60,8	58,9	52,2
7	8,2	2,85	1,15
8	17,5	28,7	20,4
19	16,0	20,8	0,01

Таблица 4 / Table 4

Характеристика образцов КМ больных со средними уровнями РБ по данным проточной цитометрии. 15-й день химиотерапии, морфологическая ремиссия / Characteristics of bone marrow specimens from patients with medium evidence of residual disease revealed by flow cytometry. Day 15 of chemotherapy, morphological remission.

№	Клеточность / Cellularity 10 ³ /мкл / mcl	Лимфоидные элементы / Lymphoid elements %	Бласты % / Blasts	Мононуклеары, / mononuclears %		
				CD19 ⁺	CD19 ⁺ CD10 ⁺	CD19 ⁺ CD34 ⁺
4	Низкая*	57,6	0,6	15,1	0,39	0,33
10	2,5	65,5	0,0	8,57	0,01	0,57
16	16,0	82,6	0,0	11,9	0,54	0,0
13	60,0	58,2	0,0	34,9	0,04	0,14
2	5,0	62,0	3,2	16,5	0,12	0,05
21	Очень низкая*	22,5	4,5	15,5	0,43	0,05

*Подсчет клеточности не проводили, в описании миелограмм костный мозг гипоклеточный (беден, очень беден клеточными элементами) / Cellularity was not counted

Таблица 5 / Table 5

Морфоиммунологическая оценка полноты ответа у детей с ОЛЛ, пре-пре-В иммуноподвариант, на 33-й день индукционной химиотерапии /
Morphoimmunological evaluation of response in children with ALL, pre-pre-B immunosubtype, on day 33 of induction chemotherapy

№	Клеточность / Cellularity 10 ³ /мкл / mcl	Лимфоидные элементы / Lymphoid elements %	Бласты % / Blasts	Мононуклеары, / mononuclears %	
				CD19 ⁺ CD34 ⁺	CD19 ⁺ CD10 ⁺
1	45,0	51,0	3,6	0,04	0,0
2	25,0	45,8	1,4	0,09	0,03
3	30,5	62,6	5,8	36,4	15,3
4	Норм. / Normal cellularity *	33,2	0	0,07	0,0
5	Низкая / Hypocellular *	37,4	0,9	0,36	0,22
6	17,0	29,8	0,0	0,01	0,0
7	2,0	64,5	1,5	0,04	0,0
8	12,5	15,2	2,2	0,09	0,12
9	Низкая / Poor *	36,0	0	0,02	0,02
10	19,0	23,8	1,2	0,01	0,02
11	9,5	29,4	0,8	0,06	0
12	12,0	19,2	2,6	0,02	0,05
13	30,0	34,4	0,2	0,0	0,01
14	Очень низкая / Very poor *	42,0	0	0,0	0,0
15	16,6	29,4	0,4	0,01	0,0
16	3,0	56,0	2,6	0,01	0
17	10,0	69,5	0	0	0
18	12,5	19,2	0,4	0	0
19	16,0	49,2	1,5	0,03	0,02

■ – отсутствие РБ по данным проточной цитометрии. № 3 индукционная терапия неэффективна. / Patients without MRD

* Подсчет клеточности не проводили, в описании миелограмм костный мозг гипоклеточный (беден, очень беден клеточными элементами); ** нормоклеточный костный мозг // Cellularity was not counted.

На 33-й день химиотерапии индукции нами оценены образцы костномозговых пунктатов 19 из 21 описанных ранее пациентов (табл. 5). Практически во всех случаях образцы костного мозга были бедны клеточными элементами (в среднем $17,4 \pm 2,9 \times 10^3/\text{мкл}$). При этом процент бластных клеток в костном мозге варьировал от 0,0 до 5,8% (средний показатель $1,26 \pm 0,35\%$), средний процент лимфоцитов по группе составил $40,4\% \pm 3,56$ (15,2–69,5). Средний процент В-клеток в среднем по группе составил $8,81\% \pm 2,29$ с разбросом от 0,7 до 42,3 среди моноклеарных клеток.

Морфологическая ремиссия (менее 5,0% бластных клеток в костном мозге) констатирована у большинства больных (18 из 19–94,7%).

У одной пациентки процент бластных клеток костного мозга морфологически составил 5,8%, цитометрически также выявлена значительная пропорция $\text{CD}19^+$ моноклеарных клеток, экспрессирующих и $\text{CD}10$ и $\text{CD}34$.

Интересно отметить, что процент случаев с отсутствием признаков минимальной резидуальной болезни по данным проточной цитометрии на 33-й день был значительно выше, чем количество таких случаев, выявленное на 15-й день химиотерапии индукции. Так, по данным ПЦ, из всей группы пациентов к 33 дню исследования у 7 признаков МРБ не выявлено ($\leq 0,01\%$ $\text{CD}19^+\text{CD}10^+$ и/или $\text{CD}19^+\text{CD}34^+$ клеток среди МНК костного мозга). Средний процент бластных клеток в этой группе больных составил 0,5% (медиана 0,2%, от 0,0 до 2,6%), содержание В-клеток среди моноклеаров варьировало от 2,4 до 24,0% (среднее 11,02%, медиана 11,4%).

У остальных 11 из 18 больных с морфологически подтвержденной ремиссией на основании данных ПЦ выявлены признаки минимальной резидуальной болезни. При этом у 9 из них с минимальным количеством бластов в костном мозге (не более 3,6%) пропорция $\text{CD}19^+$ клеток с экспрессией $\text{CD}10$ и/или $\text{CD}34$ не превышала 0,1% среди моноклеаров костного мозга. В 3 случаях выявлено 0,22%; 0,36% и 0,9% $\text{CD}19^+\text{CD}10^+$ и/или $\text{CD}19^+\text{CD}34^+$ бластов.

Далее мы сопоставили морфологические и иммунологические данные, полученные на 15-й и 33-й дни химиотерапии индукции (табл. 2).

Так не выявлено статистической разницы в проценте бластных клеток при анализе образцов на 15-й и 33-й дни ($p=0,11$). Средние уровни лимфоидных элементов костного мозга на 15-й день составляли $55,8 \pm 4,8\%$, а на 33-й день были достоверно более низкими ($40,4 \pm 3,5\%$, $p=0,029$). Достоверно более высоким оказался и процент $\text{CD}19^+$ МНК клеток на 15-й день исследования в сравнении с 33-м днем ($19,06 \pm 3,35\%$ и $8,81 \pm 2,29\%$ соответственно, $p=0,001$).

Как уже было сказано выше, пропорция образцов с иммунологически установленной РБ (более 0,01% $\text{CD}19^+$ моноклеарных клеток с экспрессией $\text{CD}10$ и/или $\text{CD}34$) на 15-й день была несколько выше (18 из 21–85,7%), чем на 33-й день химиотерапии индукции (12 из 19–66,7%).

The similar investigations were also performed on day 33 of chemotherapy using the bone marrow specimens from 19 of the 21 patients previously analysed (tab. 5). The cellularity was still low (mean $17.4 \pm 2.9 \times 10^3/\text{mcl}$, range 2.0 to $45.0 \times 10^3/\text{mcl}$) and the blast content varied from 0.0 to 5.8% (mean $1.26 \pm 0.35\%$) with mean lymphocyte proportion of $40.4 \pm 3.56\%$ (15.2 to 69.5%).

Morphological remission (<5% of blasts) in bone marrow) was diagnosed in all but one patients (18/19, 94.7%). The single patient with 5.8% of blasts also had a considerable proportion of CD19⁺ MNC expressing CD10 and CD34.

Interestingly, the proportions of patients with undetectable MRD increased by day 33 when compared to the observations made on day 15. Using FC, 7 of the 19 cases had $\leq 0.01\%$ of CD19⁺CD10⁺ and/or CD19⁺CD34⁺ cells among bone marrow MNC (tab. 7). The mean blast counts in this group were 0.5% (median 0.2%, range 0.0 to 2.6%) and the percentage of B-cells among MNC varied within 2.4 to 24.0% (mean 11.02%, median 11.4%).

Among the remaining 11 patients with >0.01% MRD nine had only 0.01–0.1% leukaemic cells and 3 cases showed 0.22%, 0.36% and 0.9% CD19⁺CD10⁺ and/or CD19⁺CD34⁺ blasts.

Some further comparisons of morphological and immunological characteristics of patient's bone marrow at days 15 and 33 were also made (tab. 2). There was no statistically significant difference in the blast contents on days 15 vs. 33 ($p = 0.11$). The mean proportions of lymphoid cells on day 15 was $55.8 \pm 4.8\%$ and significantly less on day 33 ($40.4 \pm 3.5\%$, $p = 0.029$). The proportion of B-lymphoid cells expressing CD19 was greater on day 15 ($19.1 \pm 3.4\%$), than on day 33 of chemotherapy ($8.8 \pm 2.3\%$; $p = 0.001$). As shown above, the number of specimens with MRD was found higher on day 15 (18/21, 85.7%) than on day 33 (12/19, 66.7%) of induction chemotherapy.

Обсуждение

Успешное современное лечение острых лимфобластных лейкозов у детей во многом зависит от возможности прогнозирования и ранней диагностики развития рецидива. Одним из наиболее информативных показателей является определение минимальной резидуальной болезни на клеточном уровне с использованием морфологических методов и проточной цитометрии [21]. Острый лимфобластный лейкоз из В-линейных предшественников – наиболее часто встречающийся у детей вариант ОЛЛ; до 90% случаев составляет пре-пре-В («common») иммуноподвариант. Частота выявления экспрессии стволовыхклеточного антигена CD34 на пре-пре-В-лимфобластах очень высока.

В последние годы было вновь подтверждено, что скорость первичного ответа лейкозных бластов на программное лечение – это основной, наиболее надежный прогностический фактор [3–10; 22; 23]. Так, в нашем исследовании, из всей группы больных (21 ребенок) с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников, 7 больных продемонстрировали хороший ответ ($\leq 0,01\%$ МРБ на 33-й день химиотерапии индукции), включая 3 больных с очень хорошим ранним ответом ($< 0,01\%$ МРБ к 15 дню индукционной химиотерапии).

В последние 10 лет наибольшее внимание уделяется многопараметровому проточнocyтoметpическoму анализу как более простому и информативному методу детекции минимальной резидуальной болезни. Используется 6–8 маркеров, одновременно определяемых на мембране злокачественных клеток для более точной идентификации лейкозных бластов. В большинстве цитометрических протоколов за основу принят aberrантный иммунофенотип лейкозной клетки [24].

Так, с использованием 4 цветной проточной цитометрии показано, что частота рецидивов в группе пациентов с МРБ (даже при отсутствии бластов по данным морфологии) была значительно выше ($p=0,001$) по сравнению с МРБ-негативными случаями [16; 24].

Международные группы по изучению МРБ, такие как BFM-AIEOP на основании данных ПЦ, выделяют три группы риска [18]. Группа стандартного риска — это присутствие среди ядросодержащих клеток костного мозга на 15-й день $< 0,1\%$ клеток с исходным иммунофенотипом ОЛЛ, группа среднего риска — выявление от 0,1 до 1,0% и группа высокого риска: пациенты, в костном мозге которых на 15-й день индукции выявляется 1,0 и более процентов лейкозных бластов [18].

Наиболее простым и доступным среди методов ПЦ диагностики МРБ для большинства лабораторий является метод, разработанный E. Coustan-Smith et al. (2006). Авторами предложено оценивать пропорцию незрелых В-клеточных предшественников в костном мозге на 19-й день химиотерапии индукции на основе установленного факта элиминации из костного мозга нормальных В-клеточных предшественников (включая клетки с фенотипом $CD19^+CD10^+$ и $CD19^+CD34^+$) в ответ на введение кортикостероидов. Определение МРБ в данный период позволяет выявить группу больных с хорошим ранним ответом и соответственно более низким риском развития рецидива [25; 26].

Discussion

In childhood ALL a careful cellular analysis by morphology and FC significantly contributes to the patients' successful management [21]. In this group B-cell precursor ALL is the most common type with 90% of cases having the immunological features of the common CD10⁺ pre-pre-B cell leukaemia. In these cases most blasts also express the CD34 stem antigen. Recently it has been re-emphasized that the speed of the initial leukaemic blast responses to chemotherapy is one of the most reliable prognostic factors [3–10; 25; 26]. Indeed, in our study we have also shown that within our patient group of 21 cases 7 children were fast responders (<0.01% MRD at day 33) including 3 children who were very fast responders (<0.01% MRD at day 15).

Over the recent decade, multi-parametric FC was in the focus as an informative test. In these FC tests 6–8 markers are simultaneously detected on the blast cell membranes in order to identify leukaemic blasts accurately on the basis of aberrant combinations of immunological phenotype. The selection of antibodies used is most frequently depends upon the blast cells' phenotypic features at diagnosis [22]. These studies invariably show that the rate of relapses in patients with MRD (even with no blasts by morphology) is significantly higher than in MRD-negative cases [16, 22]. International collaborative studies such as the BFM–AIEOP [18] have identified three risk groups according to MRD detection by these FC methods. Standard risk is defined as the presence of <0.1% of nucleated cells with ALL initial immuno-phenotype in bone marrow; medium risk is the presence of 0.1 to 0.99% and increased risk is the presence of >1.0% leukaemic blasts on day 15 [18].

A further recent development has been introduced by Coustan-Smith et al. (2006) as currently the simplest, highly reproducible and most accessible FC diagnostic technique. These authors propose to quantify B-cell immature precursors in bone marrow after 19 days of induction chemotherapy based on the fact that the normal B-cell precursors (including the cells with the CD19⁺, CD10⁺, CD34⁺ phenotype) are cleared from the bone marrow of patients who receive large doses of corticosteroids. During the period of 15–22 days post-induction therapy the MRD detection can be substantially simplified as we have also documented in our paper. An additional advantage of this approach is that with the relatively simple FC analysis of sequential bone marrow samples it is possible to precisely define the speed of remission induction, a powerful prognostic factor. Patients with a good response show a low risk of relapse confirmed by three-color FC data [25, 26].

Данные, полученные с использованием трехцветного цитофлуориметрического протокола по выявлению пропорции $CD19^+CD10^+CD34^+$ мононуклеарных клеток, четко коррелировали с результатами многоцветной цитометрической детекции РБ и с данными ПЦР. У больных с наличием более 0,01% $CD19^+$ МНК в костном мозге, экспрессирующих $CD10$ и/или $CD34$, констатировано наличие резидуальной болезни, а кумулятивная частота рецидивов (10-летняя прослеженность) в этой группе составила 29%, что достоверно выше ($p=0.003$), чем в группе сравнения. Причем достоверно значимыми прогностическими признаками оказались всего два из целого ряда оцененных – МРБ по данным проточной цитометрии и выявление транслокации 9;22. Выявление резидуальных бластов среди МНК является более точным, чем их определение в пределах фракции нуклеарных клеток костного мозга. Необходимо ещё раз отметить, что подобный протокол может быть использован преимущественно, на 15–22-й дни индукционной химиотерапии и только у пациентов, получающих кортикостероиды. В нашем исследовании второй точкой был 33-й день индукционной ХТ, период, когда некоторое количество нормальных В-клеток начинает восстанавливаться, и минимальная фракция $CD19^+CD10^+$ и $CD19^+CD34^+$ клеток может представлять собой нормальные регенерирующие В-клеточные предшественники. Таким образом, говоря о МРБ на 33-й день химиотерапии индукции, мы употребляем этот термин с осторожностью.

Наиболее важным с нашей точки зрения представляется вопрос о возможности редукции интенсивности химиотерапии у детей с острыми лимфобластными лейкозами из В-линейных предшественников, поскольку серьезной проблемой является так называемая «перелеченность», значительно ухудшающая качество жизни больных (серьезные инфекции, кардиологические осложнения и высокий риск развития вторичных опухолей). Значит, выявление группы пациентов, которым может быть проведена менее интенсивная терапия, является очень важным фактом с точки зрения прогресса в лечении детских ОЛЛ и, что особенно важно, с точки зрения качества дальнейшей жизни ребёнка.

По данным D. Samraпа приблизительно 45% пациентов, у которых к окончанию 3 нед. (19-й день) индукционной химиотерапии среди мононуклеарных клеток КМ выявлялось не более 0,01% $CD19^+$ МНК с экспрессией $CD10$ или $CD34$, имели хороший первичный ответ на лечение независимо от других факторов прогноза.

В нашем исследовании пропорция таких больных была значительно ниже: только у 3 больных из 21 МРБ по данным проточной цитометрии не выявлена. Вместе с тем, к 33-му дню индукционной ХТ мы не выявили признаков МРБ уже у 7. Эти пациенты, при отсутствии других неблагоприятных факторов прогноза, являются возможными кандидатами на снижение интенсивности режимов (в частности, на редукцию доз антрациклинов).

Таким образом, мы можем говорить, что иммунологические критерии детекции МРБ в процессе химиотерапии ОЛЛ из В-линейных предшественников как отражение ответа на лечение более чувствительны, нежели использование только морфологических методик. Использование простого цитометрического протокола (E. Coustan-Smith et al., 2006) дает возможность идентифицировать МРБ на уровне одной клетки на 10 000 мононуклеаров КМ. При этом наличие или отсутствие МРБ и уровни бластных клеток по данным проточной цитометрии в ходе 2 первых недель индукционной химиотерапии позволяют более точно стратифицировать больных на группы риска, а, следовательно, более адекватно индивидуализировать проводимую ПХТ. Кроме того, трехцветная проточная цитометрия может быть использована для детекции МРБ на ранних стадиях химиотерапии и осуществлена даже в условиях рутинной цитометрической диагностики. Однако мониторинг МРБ в более поздние сроки и в более сложных диагностических ситуациях требует использования многоцветной проточной цитометрии и комплексного анализа для разграничения нормальных регенерирующих предшественников и лейкоэмических бластов, характеризующихся асинхронностью экспрессии мембранных АГ и aberrантным иммунофенотипом.

Furthermore, the simpler method of CD19⁺CD10⁺CD34⁺ MNC detection was shown to correlate strongly with results of MRD detection by multi-color flow cytometry as well as the molecular genetic PCR data. Moreover, patients with >0.01% of MNC expressing CD19⁺,CD10⁺ and/or CD19⁺,CD34⁺ in the bone marrow, i.e. the individuals with detectable MRD had a cumulative frequency of relapse of 29% during the 10 years of follow-up, a value that is significantly higher ($p = 0.003$) than seen in the group without MRD. In these studies only two parameters, the MRD by FC and the translocation 9;22, were found to be the important significant prognostic factors.

In our study it was documented that the evaluation of residual blasts within MNC with the simple MRD-method has been more accurate than evaluation of residual blasts among all nucleated cells or any other routine morphological features investigated in bone marrow. It is important to emphasize that the utility of the simple MRD detection method has been firmly established for the 15–22 days post-induction period in patients whose therapeutic regimens include corticosteroids [19]. In our study the later time-point for investigation was day 33 post-induction, a period when some minimal normal B cell regeneration may start and a small proportion of CD19⁺CD10⁺ and CD19⁺CD34⁺ cells might already be regenerating normal B-cell precursors. Consequently, when speaking of MRD on induction therapy at day 33 we use this term (MRD) with caution.

One of the intriguing questions is the possibility of reducing the intensity of induction chemotherapy in some children with B-lineage precursor ALL as the “over-treatment” may represent problems leading to a poorer quality of life in that group of patients. Signs of increased immunodeficiency leading to more infections, signs of toxicity resulting in abandoning the therapy as well as cardiac and neurological developmental problems together with a higher rate of secondary tumors are all implicated in therapies of increasing power. Selecting candidate patients for less heavy chemotherapy is therefore of some importance. About 45% of patients with $\leq 0.01\%$ of CD19⁺CD10⁺ and/or CD19⁺CD34⁺ MNC by day 19 of induction chemotherapy appear to be good early responders [19]. In our study at day 15 the proportion of such patients was relatively low only 3 of 21 patients. Nevertheless, by day 33 post-induction the number of these patients with the favorable absence of MRD has increased to 7 children. These patients may be candidates for less heavy chemotherapy regimens, in particular with reduced anthracyclines, provided that other factors indicating poor prognosis are also absent. Therefore we conclude that the flow cytometric detection of MRD in childhood B-lineage precursor ALL is a readily convenient technology that is more accurate and informative than the morphological methods. The simplified novel approach contributes to the precious identification of different risk groups of patients during induction chemotherapy. The simplified method is particularly valuable to use during the early stages of induction therapy when it can be regularly applied even in routine flow-cytometric laboratories. Nevertheless at later stages of therapy-monitoring in the difficult cases the “full version” of FC technology with multi-parameter analysis might also be required to assist the diagnosis of successive events – in order to distinguish the regenerating B-cell precursors from the asynchronously aberrant phenotypic features seen in leukaemia.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pui C.H., Campana D., Evans W.E. Childhood acute lymphoblastic leukemia: current status and future perspective // *Lancet Oncol.* — 2001. — Vol. 2. — P. 597–600.
2. Pui C.H., Sanlund J.T., Pei D. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy study XIIB at St. Jude Children's Research Hospital // *Blood.* — 2004. — Vol. 104. — P. 26906.
3. Pui C.H., Mouhmoud H.H., Rivera G.K. et al. Early intensification of intrathecal chemotherapy virtually eliminates central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 411–5.
4. Miller D.R., Coccia P.F., Bleyer W.E. et al. Early response to induction therapy as a predictor disease-free survival and late recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childrens cancer Study Group // *J. Clin. Oncol.* — 1989. — Vol. 7. — P. 1807–17.
5. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Breneman J.C. et al. Cyto-reduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia: the importance of early marrow response: report from the Childrens cancer Study Group (see comments) // *J. Clin. Oncol.* — 1996. — Vol. 14 — P. 389–98.
6. Sandlund J.T., Harrison P.L., Rivera G. et al. Persistence of lymphoblasts in bone marrow on day 15 and days 22 to 25 of remission induction predicts a dismal treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 2002. — Vol. 100. — P. 43–7.
7. Cave H., van der Werffeten Bosch J., Suciu S. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. (for the EORTC) // *N. Engl. J. of Medicine.* — 1998. — Vol. 339. — P. 591–8.
8. Brisco M.J., Condon J., Huges E. et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease and the end of induction // *Lancet.* — 1994. — Vol. 343. — P. 196–200.
9. Steenberg E.J., Verhagen O.J., van Leeuwen E.F. et al. Prolonged persistence of PCR-detectable minimal residual disease after diagnosis of first relapse predicts poor outcome in childhood B-precursors acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia.* — 1995. — Vol. 9. — P. 1726–34.
10. Coustan-Smith E., Behrn F.G., Sanches J. et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia // *Lancet.* — 1998. — Vol. 351 — P. 550–4.
11. Cuidad J., San Migel J.F. Lopez-Berges M.C. et al. Prognostic value of immunophenotyping detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia // *J. of Clin. Oncology.* — 1998. — Vol. 16 — P. 3774–81.
12. Wells D.A., Sale G.E., Shulman H.M. et al. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy and bone marrow transplantation // *Am.J. of Clin. Pathology.* — 1998. — Vol. 110 — P. 84–94.
13. Janossy G., Bollum F.J., Bradstock K.F., and Ashley J. Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations // *Blood.* — 1980. — Vol. 56. — P. 430–41.
14. Greaves M.F. Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia // *Cancer Research.* — 1981. — Vol. 41. — P. 4752–66.

15. *Gresinger F., Piro-Noak M., Kaib N. et al.* Leukemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: detection in remission marrow predicts outcome // *Br. J. Haematol.* — 1999. — Vol. 105. — P. 241–55.
16. *Dworzak M.N., Fritsch G., Panzer-Grumayer E.R. et al.* Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: method and significance // *Leukemia and Lymphoma.* — 2000. — Vol. 38(4). — P. 295–308.
17. *Veltroni M., De Zen L., Sanzari M.* Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia // *Haematologica.* — 2003. — Vol. 88. — P. 1245–52.
18. *M. N. Dworzak, G. Froschl, D. Printz et al.* Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 2002. — Vol. 99. — P. 1952–8.
19. *Couston-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P.* A simplified flow cytometry assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome // *Blood.* — 2006. — Vol. 108(1). — P. 97–102.
20. *Тупицын Н.Н., Кадагидзе З.Г., Шатинина Н.Н., Шолохова Е.Н. и соавт.* Иммунодиагностика гемобластозов человека // *Пособие для врачей.* — 2003. — МЗ РФ; ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — Стр.14–24. / *Tupitsyn N.N., Kadagidze Z.G., Shatinina N.N., Sholokhova E.N. et al.* Immunodiagnosis of human haemoblastoses // *Guidelines for physicians.* — 2003. — State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Science (in Russian). — P. 14–24.
21. *Pui CH, Campana D., Ewans WE, Silverman L.B., Sallan S.E.* New diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment // *Curr. Opin. Hematol.* — 2003. — Vol.10. — P. 290–6.
22. *Schrapppe M., Anco M., Harbott J. et al.* Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome // *Blood.* — 1998. — Vol. 94. — P. 1209–17.
23. *Dordelman M., Reiter A., Borkhardt A. et al.* Prednisolone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 1999. — Vol. 94. — P. 1209–17.
24. *Borowitz M.J., Pullen D.J., Winick N. et al.* Comparison of Diagnostic and Relapse Flow Cytometry Phenotypes in Childhood acute lymphoblastic leukemia: Implication for residual disease detection: a report from the childrens oncology group // *Clinical Cytometry.* — 2005. — Vol. 68B. — P. 18–24.
25. *Panzer-Grumayer E.R., Schneider M., Panzer S., Fasching K., Gadner H.* Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 2000. — Vol. 95. — P. 790–4.
26. *Couston-Smith E., Sancho J., Behm F.G. et al.* Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 2002. — Vol. 100 — P. 52–8.

**ДИАГНОСТИКА МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ
И МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ**

Е.Е. Зуева, Е.Б. Русанова, А.В. Куртова

Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики, Центр лабораторной диагностики СПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Множественная миелома является самым распространенным видом моноклональных гаммапатий, для диагностики и мониторинга которой применяют различные методические подходы, а главным гарантом правильного диагноза является соответствие получаемых данных друг другу. Рассмотрены возможности современных методов иммунофиксации и проточной цитометрии для диагностики и мониторинга ММ. Отрицательные результаты иммунофиксации и выявление менее 10% трансформированных плазматических клеток среди всех плазматических с помощью проточной цитометрии являются положительными прогностическими показателями для больных множественной миеломой. Стратегии терапии должны быть направлены на достижение отрицательных результатов иммунофиксации и достижение порогового уровня менее 10% относительного количества миеломных клеток. Описан иммунофенотипический профиль миеломных (трансформированных плазматических) клеток и способ их идентификации в костном мозге при оценке эффективности терапии и для диагностики минимальной остаточной болезни.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: множественная миелома, иммунофенотипирование, иммунофиксация, мониторинг, минимальная остаточная болезнь.

Множественная миелома представляет собой заболевание системы крови, биологической основой которого является накопление трансформированных плазматических клеток и продуцируемого ими патологического белка. Основные клинические симптомы множественной миеломы (ММ) – костные боли, усталость, обусловленная анемией, рецидивирующие инфекции и нарушение функции почек.

Множественная миелома является самым распространенным видом моноклональных гаммапатий, заболеваемость которой неуклонно растет: в 1965 году на долю ММ приходилось до 0,03% всех злокачественных опухолей, а в 2006 — уже 1–2%, в том числе 2% всех смертельных исходов при онкологических заболеваниях [9]. По данным европейской гематологической ассоциации к настоящему времени ММ составляет 10% гемобластозов [21]. В Санкт-Петербурге ежегодно регистрируют около 100 новых случаев заболевания ММ [1]. На территории РФ смертность от ММ составляет более 10 000 человек в год [1].

THE DIAGNOSIS AND MONITORING OF RESPONSE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA (MM)

Ye.E. Zueva¹, E.B. Rusanova, A.V. Kurtova

Laboratory of Clinical Immunology and Molecular Diagnosis, Center for Laboratory Diagnosis, I.P. Pavlov St-Petersburg State Medical University, St-Petersburg, Russia

Abstract

Multiple myeloma (MM) is the most common monoclonal gammopathy with a variety of tests used in the diagnosis and monitoring of response to therapy. There is a need for a consistency of findings for the diagnosis to be correct. This paper considers capacities of immunofixation and flow cytometry in the diagnosis and response monitoring in patients with MM. Negative immunofixation test and <10% of transformed plasma cells among all plasma cells by flow cytometry are favorable prognostic factors in MM. Treatment strategies should be aimed to achieve negative immunofixation result and a threshold of <10% of myeloma cell relative content. The paper also describes immunophenotype profile of myelomatous (transformed plasma) cells and a method for their identification in bone marrow to assess response to therapy and identify minimal residual disease.

Key words: multiple myeloma, immunophenotyping, immunofixation, monitoring, minimal residual disease.

Multiple myeloma (MM) is a blood system disorder caused by the accumulation of transformed plasma cells (PC) of monoclonal origin and the pathological protein produced by these cells. The main clinical symptoms include bone pain, fatigue due to anemia, recurrent infections and renal impairment. MM is the most common monoclonal gammopathy with a continuously rising prevalence: MM accounted for 0.03% of all malignancies in 1965 to reach a 1–2% prevalence accounting for 2% of all cancer death in 2006 [9]. According to the European Hematology Association report, MM currently represents 10% of all hematological malignancies [21]. In St-Petersburg annually about 100 cases of MM are diagnosed and in the Russian Federation >10 000 deaths are reported every year due to MM [1].

The laboratory diagnosis in MM is based on a classical diagnostic triad. This includes (I) the presence of monoclonal protein in serum and/or urine, (II) the presence of 10% of PC in the bone marrow, and III the presence of osteolytic lesions in flat bones.

Лабораторная диагностика опирается на классическую диагностическую триаду ММ:

- 1) наличие моноклонального белка в сыворотке крови и/или моче;
- 2) наличие в костном мозге более 10% плазматических клеток;
- 3) наличие остеолитических поражений плоских костей.

Говоря о лабораторной диагностике ММ сегодняшнего дня, необходимо отметить, что в большинстве случаев используются:

- определение концентрации общего белка и белковых фракций;
- определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов основных классов (IgA, IgM и IgG).

Иммунодиагностика ММ, как и других онкогематологических заболеваний, включает выявление опухоль-ассоциированных молекул:

- 1) на поверхностной мембране клетки;
- 2) внутри клетки;
- 3) в биологических жидкостях.

Способы выявления диагностически значимых молекул включают:

- 1) Иммунофенотипирование, реализованное методами:
 - а) иммуноцитохимии, результаты которой могут быть учтены с помощью световой, люминесцентной и/или электронной микроскопии;
 - б) иммуногистохимии;
 - в) многоцветной проточной цитометрии.
- 2) Выявление растворимых молекул с помощью различных вариантов ИФА, иммунофиксации, нефелометрии и т.д.

Клиническая лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний в современной клинике должна соответствовать нескольким критериям, объединенными аббревиатурой SMART:

- получаемые результаты должны быть специфичны для конкретного заболевания (S — *specific*);
- представлены в количественном выражении в стандартных для каждого показателя единицах измерения (M — *measurable*);
- достижимы, т.е. получены врачом, курирующим конкретного больного (A — *attainable*);
- сопоставимы с данными аналогичных исследований и параметрами внутрилабораторного и внешнего контроля качества (R — *relevant*) и, конечно,
- результаты должны быть получены за строго определенный период времени (T — *time-bounded*) (рис. 1).

Сегодня диагностика онкогематологических заболеваний объединяет клинические и инструментальные, морфологические, иммунофенотипические и молекулярные данные, т.е. при различных способах получения фактов главным гарантом правильного диагноза является соответствие этих данных друг другу.

Currently the MM laboratory diagnosis mostly involves:

- the measurements of total protein and protein fractions together with;
- the measurement of the main classes of serum immunoglobulins (Ig) such as IgA, IgM and IgG.

Like in other hematological malignancies, the immunodiagnosis in MM also includes the detection of tumor-associated molecules:

- on cell surface membranes,
- inside the cells and in biological fluids.

A variety of techniques are used to detect the diagnostically significant molecules. These include the cellular analysis referred to as immunophenotyping (IPT) that involves (I) immunocytochemistry by means of light, luminescent and/or electronic microscopy; (II) immunohistochemistry; as well as (III) multicolor flow cytometry. The other area is the detection of soluble molecules by enzyme immunoassay (EIA), immunofixation, nephelometry and by other analytic techniques.

The clinical diagnosis of haematological malignancies should meet several criteria that are referred to as SMART, i.e. the findings should be (s) **S**pecific for the disease, (m) **M**easurable, i.e. presented in a quantitative manner in standard measuring units, (a) **A**ttainable by the treating physician, and (r) **R**elevant, i.e. consistent with similar tests and meet internal and external quality standards, and, finally (t) **T**ime-bound, i.e. obtained within a strictly limited period of time (fig. 1).

In order to achieve this, the diagnosis in hematological malignancies is based on a combination of clinical, instrumental, morphological, IPT and molecular tests. Clearly, the correct diagnosis may be guaranteed only by the consistency of all these findings.

Так, при подозрении на множественную миелому специфичным (S) признаком является продукция моноклонального белка трансформированными плазматическими клетками, количество (М) которого может быть определено (А) с соблюдением требований внутрилабораторного и внешнего контроля качества (R) в течение суток (Т). Верификация диагноза включает количественное определение β -2-микроглобулина, соотношения κ - и λ -легких цепей в сыворотке и/или моче, выявление миеломных клеток в составе костного мозга методом проточной цитометрии и, в некоторых случаях, сбалансированных генетических транслокаций. Концепция SMART лабораторной диагностики позволяет адекватно оценить состояние больного и прийти к развернутой формулировке диагноза.

Диагностика ММ включает несколько взаимодополняющих направлений, которые были обсуждены и предложены к применению в виде практических рекомендаций международной группой по диагностике ММ (2003) и дополнены в 2005 г. (табл. 1) [21; 19].

Субстратом миеломы являются трансформированные плазматические клетки, подавляющие нормальный гемопоэз и продуцирующие патологический (моноклональный) белок. Нормальные плазматические клетки, представляющие собой конечную стадию дифференцировки В-лимфоцитов, обеспечивают продукцию нормальных (неизотипических) иммуноглобулинов различных классов. Миеломные клетки появляются в результате моноклональной пролиферации трансформированных опухолевых плазматических клеток и, как следствие, способны к продукции только одного, моноклонального белка. ММ входит в группу болезней, сопровождающихся моноклональной секрецией (табл. 2) [5].

Высокая распространенность моноклональных гаммапатий, и множественной миеломы в частности, среди людей средней и старшей возрастных групп и появление новых видов лекарственной терапии, механизм действия которых направлен на подавление активности протеасом, а также распространение новых аналогов талидомида, приводит к востребованности качественно более высокого уровня диагностики и мониторинга ММ, в особенности верификация ремиссии заболевания [4; 7].

На сегодняшний день существуют несколько традиционных методов выявления МК в различных биологических материалах. Методом скрининга выявления моноклональных иммуноглобулинов в концентрации, превышающей 0,5 г/л, является классический электрофорез сыворотки – общепризнанный метод динамического наблюдения накопления МК (рис. 2).

На сегодняшний день по рекомендации международной группы по миеломе основным методом идентификации МК при диагностике и мониторинге больных ММ является иммунофиксация [8]. Иммунофиксация позволяет выявлять МК в такой низкой концентрации как 0,1 г/л, так как основана на комбинации электрофоретического разделения белков с детектированием их с помощью специфических антител к индивидуальным белкам.

For instance, when the diagnosis of MM is suspected, the identification of the monoclonal protein by the transformed PC the specific (s) factor whose content can be measured (m). Such a measurement is attainable in the routine laboratories (a) where it meets the internal and external standards (r) while such a test can be performed and evaluated within 24 hours (t). Then, the certification of the diagnosis, and an additional assessment of the expected disease severity and prognosis, involves measurement of beta-2-microglobulin, / light chain ratio in serum and/or urine as well as the detection of myelomatous cells in bone marrow by flow cytometry and sometimes of genetic translocations. Thus the SMART concept of laboratory diagnosis ensures adequate assessment of the condition of patients including a comprehensive formulation of the diagnosis. These complementary tests of MM diagnosis have been discussed and formulated as guidelines by the International Group for the Diagnosis of MM (2003) and supplemented in 2005 (tabl. 1) [21; 19] and in this paper we summarize the relevant points for the national diagnostic service in our country.

In MM the transformed PC produce pathological (monoclonal) protein and also inhibit normal hemopoiesis, especially the differentiation of the normal B-lymphocyte lineages. As a final result of normal B-lymphocyte differentiation, the generated polyclonal normal PC produce heterogeneous (non-isotypic) Ig belonging to various classes. This process is inhibited, to a variable degree, by the malignant myelomatous cells – a monoclonal proliferation of transformed neoplastic PC, that produce only a single monoclonal protein. There is a group of disorders characterized by monoclonal secretion and MM is the most prominent pathological entity in this group (tabl. 2) [5].

The high occurrence of monoclonal gammopathies, in particular MM, among patients of middle and advanced age together with the arrival of novel therapies require a fresh look and higher standards in MM diagnosis and monitoring. These assays now need to verify disease remission achieved by the new therapies. These are based on inhibition of proteasome activity and wider use of new thalidomide analogues [4; 7].

There are currently several conventional methods of monoclonal component (MC) detection in various biological materials. Classical serum electrophoresis is still a common monitoring technique for MC accumulation and also a screening test in cases when the monoclonal Ig concentrations are > 0.5 g/l (fig. 2).

According to the International Myeloma Group's guidance, immunofixation is a somewhat more sensitive principal method to identify MC in the MM diagnosis and monitoring [18]. Immunofixation involves a combination of the first step of protein electrophoretic separation followed by the identification of individual proteins by specific antibodies allowing the detection of MC at as low as a 0.1 g/l concentration.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. Исследование проведено в период с сентября 2006 г. по июнь 2008 г. Включены данные по 260 больным с предварительным диагнозом ММ, с медианой возраста 60 года (30–82), которые наблюдались в клиниках Санкт-Петербурга и Ленинградской области – РосНИИГиТ, СПбГМУ им.акад.И.П.Павлова, городская больница №15, городская больница №17, городская больница №31, Ленинградская областная клиническая больница, Дорожная клиническая больница. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Специальные виды исследования – иммунофиксация, определение концентрации основных классов иммуноглобулинов, иммунофенотипирование клеток костного мозга выполнены на базе лаборатории клинической иммунологии и молекулярной диагностики ЦЛД СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Комплексное обследование пациентов включало определение белковых фракций сыворотки, иммуноглобулины IgA, IgM, IgG и проведение иммунофиксации сыворотки крови. Определение белковых фракций было осуществлено на базе лаборатории клинической биохимии Центра Лабораторной Диагностики СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Количественное определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG были определены методом турбидиметрии с использованием наборов компании Витал Диагностикс, Санкт-Петербург и на аппарате Immage с использованием наборов производства Beckman Coulter (BC). Электрофорез белковых фракций сыворотки крови проведен в электрофоретической камере (Corma) при напряжении 100 вольт в течение 30 минут при комнатной температуре (18–22 °C) с использованием агарозных гелей и буферного раствора pH = 8,6 производства BC. Для получения протеинограммы и в качестве контроля состоятельности электрофореза использован фиксирующий белок — Specific Protein of Electrophoresis (SPE). Иммунопреципитация разделенных белков проведена специфическими антисыворотками (BC) к тяжелым (α , γ и μ) и легким (κ и λ) цепям иммуноглобулинов для выявления и определения состава моноклонального компонента. Отмывка всех непреципитировавших белков осуществлена с использованием 0,9% раствора хлорида натрия в течение 5 минут при комнатной температуре. Окрашивание преципитатов проведено 0,1% раствором бромфенолового синего в течение 3 минут. Денситометрия электрофореграмм выполнена на денситометре Paragon Appraise (BC).

Аспираты костного мозга были получены у пациентов с ММ до начала терапии. Для ИФТ был использован цельный костный мозг. Клетки (не менее 2×10^6) были инкубированы при +4 °C в течение 30 минут в темноте с моноклональными антителами CD45-FITC, CD14-PE, IgG1-FITC, IgG2-PE, CD38-FITC, CD138-PE, CD19-PerCP (все - Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA, (BD)) в различных сочетаниях, например: CD45-FITC/CD14-PE; IgG1/IgG2; CD38-FITC/CD138-PE/CD19-PerCP; CD38-FITC/CD38-PE/CD117PerCP.

Materials and methods

Patients. During September 2006 to July 2008 we performed a study of 260 patients with a preliminary diagnosis of MM in a patient group with a median age of 60 (30–82) years. These patients were managed at St-Petersburg and Leningrad regional clinics (Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, I.P. Pavlov State Medical University (SPbSMU), Municipal Hospital No.15, Municipal Hospital No.17, Municipal Hospital No.31, Leningrad Regional Clinical Hospital, and Road Clinical Hospital. Informed consent to participate in the study was obtained from all the patients.

Special tests such as immunofixation, concentration measurement of main Ig classes, bone marrow cell IPT were made at the Laboratory of Clinical Immunology and Molecular Diagnostics, Center for Laboratory Diagnostics, I.P. Pavlov SPbSMU. Patient assessment included identification of serum protein fractions, IgA, IgM and IgG measurement and serum immunofixation. Protein fraction identification was performed at the Laboratory of Clinical Biochemistry, Center for Laboratory Diagnostics, I.P. Pavlov SPbSMU. Measurement of serum IgA, IgM and IgG was performed by turbidimetry using Vital Diagnostics (St-Petersburg) test kits and an Immage instrument with Beckman Coulter (BC) kits. Serum protein fraction electrophoresis was performed in an electrophoretic chamber (Cormay) at 100 V for 30 min at room temperature (18–22 °C) using agarose gel and buffer solution pH 8.6 supplied by BC. Specific protein of electrophoresis (SPE) was used to produce proteinograms and to check electrophoresis relevance. Immunoprecipitation of separated proteins was made using specific antisera (BC) to heavy (α , γ , μ) and light (κ , λ) Ig chains to detect and identify MC content. All non-precipitated proteins were washed with 0.9% sodium chloride solution for 5 min at room temperature. Precipitate staining was done with 0.1% bromphenol blue solution for 3 min. Electrophoregram densitometry was made on a Paragon Appraise (BC) densitometer.

Bone marrow aspiration specimens were harvested from MM patients before treatment. Whole bone marrow was used for the IPT analysis. The cells (at least 2×10^6) were incubated at +4 °C for 30 min with monoclonal antibodies CD45-FITC, CD14-PE, CD38-FITC, CD138-PE, CD19-PerCP and CD117-PerCP (all Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA (BD) in the combination staining of Tube 1 (2 colors: CD45-FITC/CD14-PE) and Tube 2 (3 colors: CD38-FITC/CD138-PE/CD19-PerCP), Tube 3 (3 colors: CD38-FITC/CD138-PE/CD117-PerCP). In addition, Tube 4 (2 colors: IgG1-FITC/IgG2-PE) was used for isotype controls in order to set up the negative control values to evaluate the histograms obtained.

Подготовка проб была осуществлена по методике окрашивание-лизис-отмывка. Для лизирования эритроцитов был использован рабочий раствор FACSlyse (BD). Отмывка центрифугированием (5 минут при $300 \times g$) была проведена дважды с использованием реагента FACSFlow (BD). Анализ антигенной экспрессии был проведен на проточном цитометре PartecPAS с использованием программного обеспечения FloMax (Partec, Denmark) и на поточном цитометре FC500 (BC). Флюоресценция была учтена при 512–547 нм, 571–591 нм и более 610 нм для FITC, PE и PerCP каналов флюоресценции на первом (log FL1) и втором (log FL2) и третьем (log FL3) фотоумножителях. Компенсация наложения флюоресценции была осуществлена средствами программного обеспечения. Для каждого сочетания маркеров проанализировано не менее 50 000 событий. Общий объем исследования суммирован в табл.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования сыворотки

По результатам иммунофиксации было выделено два возможных варианта ответа – отрицательный и положительный. Отрицательный результат подразумевает отсутствие моноклональной полосы и наличие только диффузного окрашивания гелевой пластины. Положительный результат, т.е. выявление патологического моноклонального белка, может быть представлен:

- а) моноклональной продукцией — выявление одной полосы моноклонального белка;
- б) олигоклональной продукцией, которая характеризуется наличием более одной полосы моноклонального белка (рис. 3).

Определение концентрации основных классов иммуноглобулинов сыворотки является скрининговым исследованием, а иммунофиксация белков сыворотки и/или мочи – уточняющим методом верификации продукции моноклонального белка (иммуноглобулина и/или легкой цепи).

Исходя из этого, все пациенты были разделены на три группы в зависимости от концентрации сывороточных иммуноглобулинов:

Первую группу составили пациенты, концентрация одного из иммуноглобулинов (класса IgA, IgM или IgG) которых превышала верхнюю границу биологического референтного интервала для каждого иммуноглобулина соответственно (IgA 0,82–4,53 г/л, IgM – 0,46–3,04 г/л, IgG – 7,51–15,6 г/л), $n=122$;

Вторая группа включила пациентов, у которых концентрация иммуноглобулинов сыворотки находились в пределах нормы, $n=65$;

Третью группу составили пациенты со сниженной концентрацией всех трех исследуемых иммуноглобулинов, $n=73$ (табл. 4).

Specimen preparation was made by the 'staining-lysis-washing' technique. FACSlyse (BD) working solution was used for erythrocyte lysis. The stained cells were washed twice (5 min at $300 \times g$) using FACSFlow (BD). During these studies the antigen expression was measured by flow cytometry. Two instruments were used and these performed similarly during the investigations. These were the PartecPAS flow cytometer with FloMax software (Partec, Denmark) and a FC500 flow cytometer (BC). On both instruments fluorescence was counted at the respective 512–547 nm, 571–591 nm and >610 nm wavelengths for the FITC (green), PE (orange) and PerCP (red) fluorescence channels at the first (log), second (log) and third (log) multipliers. Compensation for fluorescence overlapping was made by means of the software. At least 50 000 events were analyzed for every marker combination (tabl. 3).

Results

Serum study. Immunofixation can provide two, negative or positive, outcomes. A test is considered negative if there are no detectable monoclonal bands and only diffuse staining of gel plate can be seen. A positive test, i.e. the presence of pathological monoclonal protein, is reported in the cases of (I) observing; (II) monoclonal production (one monoclonal protein band), or; oligoclonal production (with more than one monoclonal protein bands) (fig. 3).

Concentration measurement of main serum Ig classes is a screening test, while serum and/or urine protein immunofixation is a verification test for production of monoclonal protein (Ig and/or light chain). Based on these criteria the patients studied were divided into three groups depending on serum Ig concentration:

- (I) Group 1 included patients with one of Ig (IgA, IgM or IgG) present at a concentration greater than the upper limit of biological reference range for every individual Ig (IgA $0.8\tilde{2}4.53$ g/l; IgM $0.4\tilde{6}3.04$ g/l; IgG $7.5\tilde{1}15.6$ g/l), $n=122$;
- (II) Group 2 consisted of patients with serum Ig concentrations within normal limits, $n=65$;
- (III) Group 3 combined patients with decreased concentrations of all three Ig in question, $n=73$ (tabl. 4).

Среди 122 случаев исследования сыворотки больных с повышенным уровнем иммуноглобулина как минимум одного класса, в 109 случаях (89%) результаты иммунофиксации оценены как положительные. Среди 65 образцов сыворотки больных с нормальным уровнем иммуноглобулинов основных классов результаты иммунофиксации оказались положительными в 48 случаях (73,8%). Среди 73 образцов сыворотки больных со сниженным уровнем иммуноглобулинов основных классов в 39 случаях были получены положительные результаты иммунофиксации (53,4%) (рис. 4).

Во всех группах положительный результат иммунофиксации соответствовал выявлению моноклональной продукции МК. Исключение составили три пациента первой группы, у которых была выявлена олигоклональная продукция патологического белка.

В целом по результатам иммунофиксации выявлено восемь иммунологических вариантов моноклонального компонента. Самым распространенным типом оказался МК иммунологического варианта IgG/κ легкая цепь – 48% (рис. 5).

По рекомендациям международной группы по мониторингу ММ метод иммунофиксации принят как обязательный для верификации ремиссии и отсутствия МОБ [4]. Информативность иммунофиксации при мониторинге ММ была использована и в рамках настоящего исследования. В качестве примера мы приведем результаты двух последовательных исследований сыворотки крови пациентки, которой был установлен клинический и иммунологический диагноз множественная миелома, в связи с чем она получала химиотерапию по стандартной схеме. Для уточнения эффективности проведенной химиотерапии было выполнено повторное исследование (рис. 6).

Результаты иммунофенотипирования клеток костного мозга

Иммунофенотипирование трансформированных плазматических клеток при множественной миеломе и других видах моноклональных гаммапатий является новым направлением в диагностике парапротеинемий [7; 18; 21]. К основным показаниям для проведения целенаправленного выявления и оценки иммунофенотипического профиля плазматических клеток относятся:

- дифференциальный диагноз множественной миеломы, моноклональных гаммапатий неясного значения и реактивных состояний;
- выявление маркеров, значимых при определении прогноза течения ММ и ответа на химиотерапию;
- выявление МОБ у больных ММ после терапии.

Естественно, что для каждого направления иммунофенотипирования методом проточной цитометрии предполагается использование различных подходов для получения диагностически значимых результатов (табл. 5) [18].

Immunofixation test was positive in 109 (89%) of 122 cases with increased concentration of at least one Ig, in 48 (73.8%) of 65 serum samples with normal Ig concentrations and in 39 (53.4%) of 73 cases with decreased Ig concentrations (fig. 4).

In all cases positive immunofixation test corresponded to the monoclonal production by MC, except three cases from Group 1 who presented with oligoclonal production of pathological protein.

As a whole, we identified by immunofixation 8 immunological types of the monoclonal component. IgG/ light chain was the most common MC immunological type (48%) (fig. 5).

According to the International Group for MM monitoring guidelines, immunofixation is a mandatory test to verify the remission status and the virtual absence of minimal residual disease (MRD) in patients who are on therapy [4]. In our study the informative value of immunofixation in MM monitoring was fully utilized. As an example about this role of the method we show the results of two consequent tests performed on serum samples taken from the same patient.

This patient had the clinical and immunological diagnosis of MM as shown in the first test. After having received standard chemotherapy, the second test verified the patient's response to chemotherapy (fig. 6).

При анализе образцов костного мозга пациентов ММ на этапе верификации диагноза, т.е. до начала терапии было выявлено, что трансформированные плазматические клетки в большинстве случаев могут быть идентифицированы на гистограмме морфологических характеристик клеток (прямого и углового светорассеяния FSC/SSC) по особым характеристикам светорассеяния, отличающим их от основных субпопуляций ядродержащих клеток костного мозга (рис. 7).

Уровень экспрессии CD45 на поверхности плазматических клеток соответствует гранулоцитам и может быть расценен как CD45^{dim} (рис. 8).

Основным этапом ИФТ костного мозга больных ММ является анализ экспрессии CD38, CD138 и CD19 (рис. 9).

В первую очередь была проведена оценка гистограммы CD138/SSC, так как именно CD138 (синдекан-1) является принципиальным маркером ПК. Тем не менее, только выявление одновременной экспрессии CD38 и CD138 позволяет надежно отделить ПК от В-клеточных предшественников и от других лейкоцитов. Для последующего анализа было создано логическое ограничение (гейт), объединяющее CD138⁺ клетки с определенными характеристиками светорассеяния. Позитивная экспрессия CD38 служит подтверждением принадлежности исследуемой популяции к плазматическим клеткам. Выявление популяции клеток с измененными характеристиками светорассеяния и суммарным фенотипом CD45^{dim}CD38⁺CD138⁺ позволяет верифицировать присутствие трансформированных ПК в исследуемом образце.

Интерпретация данных экспрессии CD19 при верификации миеломных клеток нередко вызывает некоторые затруднения. Несмотря на то, что отсутствие экспрессии CD19 принято считать стандартом для выявления трансформированных ПК, необходимо учитывать, что экспрессия CD19 при ММ может сохраняться примерно в 15% случаев. Более того, к настоящему времени показана экспрессия CD19 у значительной части больных ММ в Северо-Западном регионе РФ [4].

Заключительным этапом анализа данных иммунофенотипирования было количественное определение содержания трансформированных клеток среди мононуклеаров. Полученные данные могут быть в дальнейшем использованы для оценки эффективности проводимого лечения, так как при исследовании МОБ экспрессию указанных маркеров оценивают для событий, определенных по гейту мононуклеаров [4].

При анализе трансформированных клеток следует учитывать возможность выявления неоднородного уровня экспрессии исследуемых маркеров. Гетерогенность экспрессии может характеризовать только один из маркеров, тогда как по остальным будет выявлена гомогенная экспрессия (рис. 10). Интерпретация полученных данных в таких случаях представляет значительную трудность, однако, при определении позитивности окрашивания следует опираться на результаты негативного контроля.

Bone Marrow Cell Immunophenotyping

Analysis of bone marrow from MM patients at the stage of diagnosis verification, i.e. before therapy start, demonstrated that transformed PC can in most cases be identified in cell morphology histograms (forward and side light scatter — FSC/SSC) by characteristic features of light scatter differentiating these cells from main subpopulations of nucleated bone marrow cells (fig. 7).

CD45 expression level tested in Tube 1 on the surface of PC-s corresponded to granulocytes (CD45^{dim} shown in fig. 8). The analysis of CD38, CD138 and CD19 antigens (Tube 2) represented the crucial informative assay for the MM analysis in the bone marrow by IPT (fig. 9).

We first analyzed the histograms of the CD138 staining in combination with the morphological feature of the side scatter (CD138/SSC) because it is CD138 (syndecane-1) is the PC principal marker and the positive CD38 expression is a confirmation of the study population belonging to PC. However, only the simultaneous detection of CD38 and CD138 can reliably differentiate PC from B-cells, immature B-cell precursors and other leukocytes.

A logical limitation (gate) was introduced in further analysis to combine CD138⁺ cells with certain light scatter characteristics. Identification of a cell population with altered light scatter characteristics and a combined phenotype CD38⁺CD138⁺ and negative or dimly positive CD45 expression is a verification of the presence of transformed PC in the specimen.

It is sometimes difficult to interpret CD19 expression data when performing MC verification tests. Although the absence of CD19 expression is considered a standard test for identification of transformed PC, it should be taken into consideration that CD19 expression may be preserved in 15% of MM cases. The CD19 expression was indeed detected in a considerable portion of MM patients from North-Western Regions of the RF [4].

The final stage of IPT data analysis consisted of measurement of transformed cell portion among the mononuclear cells. Such findings may be further used to assess response to treatment because expression of the mentioned markers in MRD assessment is evaluated for events identified by the mononuclear gate [4]. It should be taken into account in analysis of transformed cells that the markers in question may have heterogeneous levels of expression. It may also happen that only a single marker has heterogeneous expression while expression of the others is homogeneous (Fig. 10). Interpretation of findings in such cases can be difficult: the decision needs to be based on a careful comparison of the positive staining with the negative controls seen in Tube 4 of the isotype controls.

При анализе образцов костного мозга пациентов ММ на этапе верификации диагноза, т.е. до начала терапии было выявлено, что трансформированные плазматические клетки в большинстве случаев могут быть идентифицированы на гистограмме морфологических характеристик клеток (прямого и углового светорассеяния FSC/SSC) по особым характеристикам светорассеяния, отличающим их от основных субпопуляций ядродержащих клеток костного мозга (рис. 7).

Уровень экспрессии CD45 на поверхности плазматических клеток соответствует гранулоцитам и может быть расценен как CD45^{dim} (рис. 8).

Основным этапом ИФТ костного мозга больных ММ является анализ экспрессии CD38, CD138 и CD19 (рис. 9).

В первую очередь была проведена оценка гистограммы CD138/SSC, так как именно CD138 (синдекан-1) является принципиальным маркером ПК. Тем не менее, только выявление одновременной экспрессии CD38 и CD138 позволяет надежно отделить ПК от В-клеточных предшественников и от других лейкоцитов. Для последующего анализа было создано логическое ограничение (гейт), объединяющее CD138⁺ клетки с определенными характеристиками светорассеяния. Позитивная экспрессия CD38 служит подтверждением принадлежности исследуемой популяции к плазматическим клеткам. Выявление популяции клеток с измененными характеристиками светорассеяния и суммарным фенотипом CD45⁻CD38⁺CD138⁺ позволяет верифицировать присутствие трансформированных ПК в исследуемом образце.

Интерпретация данных экспрессии CD19 при верификации миеломных клеток нередко вызывает некоторые затруднения. Несмотря на то, что отсутствие экспрессии CD19 принято считать стандартом для выявления трансформированных ПК, необходимо учитывать, что экспрессия CD19 при ММ может сохраняться примерно в 15% случаев. Более того, к настоящему времени показана экспрессия CD19 у значительной части больных ММ в Северо-Западном регионе РФ [4].

Заключительным этапом анализа данных иммунофенотипирования было количественное определение содержания трансформированных клеток среди мононуклеаров. Полученные данные могут быть в дальнейшем использованы для оценки эффективности проводимого лечения, так как при исследовании МОБ экспрессию указанных маркеров оценивают для событий, определенных по гейту мононуклеаров [4].

При анализе трансформированных клеток следует учитывать возможность выявления неоднородного уровня экспрессии исследуемых маркеров. Гетерогенность экспрессии может характеризовать только один из маркеров, тогда как по остальным будет выявлена гомогенная экспрессия (рис. 10). Интерпретация полученных данных в таких случаях представляет значительную трудность, однако, при определении позитивности окрашивания следует опираться на результаты негативного контроля.

Analysis of bone marrow from MM patients at the stage of diagnosis verification, i.e. before therapy start, demonstrated that transformed PC can in most cases be identified in cell morphology histograms (forward and side light scatter — FSC/SSC) by characteristic features of light scatter differentiating these cells from main subpopulations of nucleated bone marrow cells (fig. 7).

CD45 expression level tested in Tube 1 on the surface of PC-s corresponded to granulocytes (CD45^{dim} shown in fig. 8). The analysis of CD38, CD138 and CD19 antigens (Tube 2) represented the crucial informative assay for the MM analysis in the bone marrow by IPT (fig. 9).

We first analyzed the histograms of the CD138 staining in combination with the morphological feature of the side scatter (CD138/SSC) because it is CD138 (syndecane-1) is the PC principal marker and the positive CD38 expression is a confirmation of the study population belonging to PC. However, only the simultaneous detection of CD38 and CD138 can reliably differentiate PC from B-cells, immature B-cell precursors and other leukocytes.

A logical limitation (gate) was introduced in further analysis to combine CD138⁺ cells with certain light scatter characteristics. Identification of a cell population with altered light scatter characteristics and a combined phenotype CD38⁺CD138⁺ and negative or dimly positive CD45 expression is a verification of the presence of transformed PC in the specimen.

It is sometimes difficult to interpret CD19 expression data when performing MC verification tests. Although the absence of CD19 expression is considered a standard test for identification of transformed PC, it should be taken into consideration that CD19 expression may be preserved in 15% of MM cases. The CD19 expression was indeed detected in a considerable portion of MM patients from North-Western Regions of the RF [4].

The final stage of IPT data analysis consisted of measurement of transformed cell portion among the mononuclear cells. Such findings may be further used to assess response to treatment because expression of the mentioned markers in MRD assessment is evaluated for events identified by the mononuclear gate [4]. It should be taken into account in analysis of transformed cells that the markers in question may have heterogeneous levels of expression. It may also happen that only a single marker has heterogeneous expression while expression of the others is homogeneous (Fig. 10). Interpretation of findings in such cases can be difficult: the decision needs to be based on a careful comparison of the positive staining with the negative controls seen in Tube 4 of the isotype controls.

Описанные в данной работе комбинации моноклональных антител практически всегда могут быть применены для диагностики ММ до проведения терапии, однако, ее использование для диагностики МОБ в некоторых случаях может быть затруднено. Связано это, прежде всего, с тем, что в редких случаях трансформированные клетки при ММ могут слабо экспрессировать CD45, а нормальные ПК быть позитивны по CD19. При значительном количестве опухолевых клеток в костном мозге использование представленной выше стратегии логических ограничений (гейтирования) позволяет верифицировать и оценить иммунофенотип трансформированных клеток, опираясь на возможность комплексной оценки параметров светорассеяния и экспрессии указанных маркеров. При диагностике МОБ после проведения соответствующего лечения учет трансформированных клеток и нормальных ПК проводят среди мононуклеаров, что затрудняет идентификацию малоклеточной популяции плазматических клеток. Для корректного выделения нормальных и трансформированных ПК необходимо анализировать не менее 500 000 событий и применять в составе сочетаний моноклональных антител дополнительно маркер CD56, причем лучше в комбинации с CD45 (например, CD45/CD138/CD56, CD38/CD56/CD138, CD45/CD56/CD19). С помощью составленной панели антител можно не только выявить сами ПК, как показано на левой гистограмме рис. 11, но и, с использованием маркеров CD56 и CD117, разделить сохранные и трансформированные ПК.

Использование данных иммунофиксации и иммунофенотипирования для диагностики ММ и оценки эффективности терапии

Сочетанное использование данных иммунофиксации и иммунофенотипирования для диагностики ММ и оценки эффективности терапии представлено несколькими клиническими примерами.

Больной С-н, 91 года. В связи с подозрением на ММ на исследование направлены периферическая кровь, суточная моча и аспират костного мозга. При анализе белков сыворотки уровень иммуноглобулинов основных классов в пределах биологических референтных интервалов. При анализе белков мочи выявлены свободные легкие цепи в концентрации: κ – 66,15, λ — 0,0042 мкг/мл соответственно (биологический референтный интервал κ -цепи – 0–1,85 мг/дл, λ -цепи — 0–5,0 мг/дл) (рис. 12).

При анализе клеток костного мозга по данным миелограммы выявлено 9% плазматических клеток, 6% моноцитов. При анализе клеточного состава костного мозга методом проточной цитометрии выявлены клетки низкого уровня гранулярности с ярким уровнем экспрессии CD45 ($CD45^{bright}$), т.е. соответствующие характеристикам лимфоцитов. Субпопуляционный состав лимфоцитов представлен Т- и В-клетками ($CD3^{+}CD19^{-} = 54,8\%$; $CD3^{-}CD19^{+} = 19,3\%$). Клетки-предшественники (позитивные по CD34) выявлены в минимальном количестве ($CD45^{+}CD34^{-} = 0,39\%$). Плазматические клетки экспрессировали CD19 и CD117 (рис. 13).

Monoclonal antibody combinations used in our study may be regularly utilized in MM diagnosis before treatment. Nevertheless, the use of the reagent combinations we applied for the diagnosis of MRD may sometimes be problematic. The transformed cells in MM may in rare cases show dim CD45 expression, while normal PC may have positive CD19 status. In cases with a considerable tumor cell burden in bone marrow the use of the gating strategy described above allows the verification of the transformed PC cells by IPT based on the combination of the intensity of antibody staining and light scatter characteristics. Still, the identification of transformed PC-s and the regenerating normal PC in the treated patients during the diagnosis of MRD remains difficult. In this situation it is likely that the range of antibody reagents used may need to be extended. The additional use of the CD56 marker, for example, is one such possibility. When used in combinations with CD45 (e.g. in tests of CD45/CD138/CD56, CD38/CD56/CD138 and CD45/CD56/CD19) this antibody panels appears to allow both identification of PC (see left histogram in Fig.11) and the diagnostic differentiation between the normal (non-malignant) and transformed PC-s.

Immunofixation and immunophenotyping findings in the MM diagnosis and evaluation of response to treatment

Below are examples of combined use of immunofixation and IPT findings in the MM diagnosis and evaluation of response to treatment.

In Patient S., a 91-year old male, the specimens for analysis included peripheral blood, 24-h urine and bone marrow aspiration samples. By serum protein analysis, levels of main Ig classes were within biological reference ranges. Urine protein test detected free light chains at concentrations: κ 66.15, λ 0.0042 mcg/ml, respectively (biological reference ranges 0-1.85 mg/dl for κ chain and 0-5.0 mg/dl for λ chain) (fig. 12). The bone marrow analysis identified 9% of PC and 6% of monocytes. Analysis of bone marrow cellularity by flow cytometry found low granularity cells with CD45^{dim} expression, a feature that corresponds to the characteristics of lymphocytes. Lymphocytes in the bone marrow consisted of T- and B-cell subpopulations (CD3⁺CD19⁻=54.8%, CD3⁻CD19⁺=19.3%) and the CD34-positive precursor cells were present at a minimal level (CD45⁺CD34⁻ 0.39%). PC demonstrated CD19 expression (fig. 13).

Диагноз ММ пациентке Е-вой 60 лет был верифицирован по классическим клинико-лабораторным критериям. Для иммунологического исследования направлена периферическая кровь и костный мозг после шести курсов препарата Велкейд для оценки эффективности терапии. Было показано, что уровень иммуноглобулинов основных классов сыворотке был в пределах биологического референтного интервала, по данным миелограммы плазматические клетки не выявлены. По результатам иммунофиксации моноклональная продукция патологического белка не выявлена. По данным проточной цитометрии в составе костного мозга в минимальном количестве выявлены плазматические клетки, практически полностью представленные сохранными плазматическими клетками (рис. 14). Таким образом, верифицирована клинико-иммунологическая ремиссия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стандарт лабораторного обследования пациентов с подозрением на моноклональную гаммапатию основан на рекомендациях международной группы по миеломе [19]: определение концентрации иммуноглобулинов А; М; G; протеинограмма — белковые фракции, общий белок, количественное определение свободных легких цепей κ - и λ -типа. Тем не менее, именно концентрация иммуноглобулинов является диагностически значимым и более всего информативным тестом. Применение классического электрофореза повсеместно распространено в области диагностики ММ и позволяет выявлять М-пик у большинства пациентов с ММ [1]. Однако, среди пациентов, белковые фракции которых находятся в пределах биологических референтных интервалов или в случае гипогаммаглобулинемии, иммунофиксации может выявлять МК [6].

В работе R. Lakshminarayanan et al. пациенты с первично верифицированной ММ были разделены на три группы в зависимости от уровня гаммаглобулинов: больные со сниженным уровнем фракции гаммаглобулинов (гипогаммаглобулинемия), больные с сохранным уровнем белков фракции гаммаглобулинов и больные с повышенным уровнем белков фракции гаммаглобулинов (гипергаммаглобулинемия) [13]. У 10% обследованных авторами больных ММ была выявлена гипогаммаглобулинемия, столько же приходится на долю пациентов с нормальной протеинограммой белков. Нельзя не согласиться с мнением авторов, согласно которому пациенты с нормальной протеинограммой представляют очень сложную для диагностики и мониторинга группу: у пациентов с увеличенным уровнем β -1-глобулина, а особенно β -2-глобулина может быть моноклональный белок, маскирующийся за этими полосами. При гипогаммаглобулинемии и при нормальных результатах протеинограммы больных ММ рекомендовано проведение иммунофиксации [6]. Н. Steingrimsdottir et al. сопоставили методы классического электрофореза и иммунофиксации для диагностики 65 образцов сыворотки с ММ и 10 образцов с диагнозом макроглобулинемии Вальденстрема [23]. МК был найден в 28% и 46% образцов, используя классический электрофорез и иммунофиксацию соответственно [7]. МК типа IgA был выявлен в 33,4% случаев, IgG — в 57% и IgM — в 8,5% [7], что сопоставимо с нашими данными.

Patient E., a 60-year old female, had the MM diagnosis verified by classical clinical and laboratory criteria. Immunological tests were performed on peripheral blood and bone marrow specimens to assess response after 6 cycles of inhibitor of proteasome activity' therapy. Levels of main Ig classes were within biological reference range, there were no PC-s by myelogram. Immunofixation found no monoclonal pathological protein production. Flow cytometry discovered minimal levels of PC (mainly as intact cells) in bone marrow (fig. 14). Absence of monoclonal component and percentage of malignant PC low than 10% from the total amount of PC can be considered as a verified immunological remission.

Discussion

Standard laboratory study in suspects for monoclonal gammopathy is based on International Myeloma Group guidelines [19]: measurement of IgA, IgM, IgG; proteinogram including protein fractions, total protein, measurement of κ and λ light chains. However, Ig concentration is a test of the most diagnostic and informative value. Classical electrophoresis is a common test in MM diagnosis and identifies the M-peak in most MM cases [1]. However, immunofixation can identify MC in patients with protein fractions within biological reference ranges or in patients with hypogammaglobulinemia [6].

In the study of R. Lakshminarayanan et al. patients with the primary diagnosis of MM were divided into three groups with respect to gammaglobulin levels: decreased (hypogammaglobulinemia), normal and increased (hypergammaglobulinemia) gammaglobulin fractions [13]. 10% of MM patients had hypogammaglobulinemia, the same fraction of patients had normal proteinograms. We agree with the authors that patients with normal proteinogram are a very problematic group as to the diagnosis and monitoring: patients with increased beta-1-globulin, and more so with increased beta-2-globulin may have monoclonal protein masking under the respective bands. Immunofixation is recommended in MM cases with hypogammaglobulinemia and normal proteinogram [6]. Hlif Steingrimsdottir et al. compared findings of classical electrophoresis and immunofixation in the diagnosis of 65 sera from MM patients and 10 sera from cases with Waldenstrom macroglobulinemia [23]. MC was found in 28 and 46% of specimens respectively by classical electrophoresis and immunofixation [7]. MC IgA was identified in 33.4%, IgG in 57% and IgM in 8.5% of cases [7], which is similar to our findings.

Внедрение новых высокотехнологичных исследований в рутинную практику лаборатории во многом меняет наше отношение к основным положениям собственно диагностики ММ и минимальной остаточной болезни (МОБ). Именно поэтому нами рассмотрены возможности иммунофиксации и проточной цитометрии [10] для диагностики и мониторинга ММ. Критерий полной ремиссии при ММ – исчезновение парапротеина в сыворотке и моче и менее 5% плазматических клеток в костном мозге. Однако чувствительность электрофореза и морфологического исследования костного мозга, в большинстве случаев достаточная при диагностике заболевания, оказывается слишком низкой для оценки эффективности ХТ и диагностики МОБ (табл. 6) [6; 11; 15; 22; 24 с изм.].

Согласно данным Blade et al. [5] and Lahuerta et al. [9], ретроспективно оценившим пациентов, которые по результатам электрофореза были расценены, как достигшие полной ремиссии, а по результатам иммунофиксации – как достигшие частичной ремиссии, обладали такими же характеристиками выживаемости, как и больные с частичной ремиссией. Авторы приходят к выводу о том, что отрицательные результаты иммунофиксации являются независимым фактором положительного прогноза. Таким образом, формируется новая трехступенчатая классификация ответа при ведении больных множественной миеломой: полный ответ, при котором результаты электрофореза и иммунофиксации отрицательные; любой вариант неполного ответа и отсутствие ответа [8].

Ремиссия множественной миеломы подтверждается методами классического электрофореза, концентрацией иммуноглобулинов и иммунофиксацией. Отрицательные результаты иммунофиксации являются положительным прогностическим показателем прогноза для больных множественной миеломой. Как вывод, можно сказать, что стратегии терапии должны быть направлены на достижение отрицательных результатов иммунофиксации. В настоящей работе метод иммунофиксации определен как необходимый для диагностики и мониторинга ММ, в то время как классический электрофорез, не подтверждающий клональность МК, достойно занимает позицию необходимого скринингового этапа при диагностике ММ. Образцы, в которых выявлен повышенный уровень иммуноглобулинов, а поликлональность не показана при электрофорезе, рекомендованы к проведению иммунофиксации. Выявление парапротеина в сыворотке или моче должно быть продолжено определением его типа. Иммунофиксация является методом выбора типирования парапротеина, так как является быстрым и простым для интерпретации методом. В заключении необходимо подвести первые итоги применения метода иммунофиксации в рамках данного проекта на территории нашей страны: метод иммунофиксации позволяет выявлять МК в концентрации менее 0,1 г/л и при различных концентрациях сывороточных иммуноглобулинов. Полученные в ходе проекта данные свидетельствуют о недостаточной информативности концентрации сывороточных иммуноглобулинов и электрофореза, которые могут «не раскрыть» субстрат заболевания при диагностике ММ и, особенно, при верификации минимальной остаточной болезни после проведения терапии.

Implementation of high-technology tests in routine clinical practice changes our attitude to principal components of MM and MRD diagnosis. That is why we investigated potentials of immunofixation and flow cytometry [10] in MM diagnosis and monitoring. As known, complete response in MM is defined as disappearance of paraprotein from serum and urine and <5% of PC in bone marrow. However, sensitivity of electrophoresis and bone marrow morphological study (generally sufficient for the diagnosis) may be too low to assess response to chemotherapy and to assess MRD (Table 6) [6; 11; 15; 22; 24].

Blade et al. [5] and Lahuerta et al. [9] performed a retrospective study of patients with complete response by electrophoresis and partial response by immunofixation to find that survival in this group was the same as in cases with partial response. The authors concluded that negative immunofixation test was an independent factor of positive prognosis. Thus, a new response classification in MM may be composed to monitor patient condition including complete response with negative electrophoresis and immunofixation tests, any type of incomplete response and no response [8].

MM response is confirmed by classical electrophoresis, Ig concentration and immunofixation. Negative immunofixation tests are a favorable prognostic factor in MM. It may be concluded that therapy strategy should aim at achieving negative immunofixation result. In our study immunofixation was assessed as a necessary test for MM diagnosis and monitoring of MM course, while classical electrophoresis that fails to confirm MC clonality may be used as a necessary test in MM diagnosis. The samples with high immunoglobulins levels and unproved polyclonality by electrophoresis are recommended for immunofixation. Serum and urine paraprotein detection should be followed by identification of the paraprotein type. Immunofixation is a method of choice for paraprotein typing because it is rapid and easy to interpret. In conclusion it is important to resume the first results of using the immunofixation method in our country in the network of our project. The immunofixation method helps to detect the monoclonal components in the concentration less than 0.1 g/l and at various serum Ig concentrations. The data of our project testifies the lack of informative value of serum Ig concentration and electrophoresis during in the diagnostics of MM. These is especially true during the verification of MRD after treatment.

ИФТ костного мозга при диагностике ММ востребовано в рутинной онкогематологической практике и основано на различиях фенотипа нормальных и трансформированных плазматических клеток (табл. 7).

Суммируя эту информацию, можно сказать, что основными иммунофенотипическими особенностями созревания ПК в норме являются:

- постепенная утрата экспрессии В-ассоциированных маркеров;
- снижение экспрессии CD45;
- усиление экспрессии CD38 и CD138, т.е. иммунофенотип плазматических клеток может быть описан как $CD45^{dim+}$ $CD38^{bright+}$ $CD138^{+}$ $CD19^{-}$ $CD20^{-}$ $CD56^{-}$ $CD117^{-}$ или $CD45^{+}$ $CD38^{+}$ $CD138^{+}$.

Использование мультипараметрической проточной цитометрии позволяет выявить трансформированные клетки, определить их фенотип и относительное содержание среди ядросодержащих клеток низкой и промежуточной гранулярности костного мозга. При ИФТ костного мозга пациентов ММ до начала терапии методом многоцветной проточной цитометрии особое внимание следует обращать на:

- необходимость учета не менее 50 000 (на самом деле, желательно набирать столько событий, чтобы выявляемые плазматические клетки формировали отчетливый кластер с минимально возможным коэффициентом вариации);
- возможность гетерогенной экспрессии исследуемых маркеров;
- необходимость количественного учета относительного содержания трансформированных клеток среди мононуклеаров.

На сегодняшний день информативность отдельных маркеров может быть кратко суммирована следующим образом: см. табл. 8.

По данным большинства авторов наличие экспрессии CD45; CD56; CD117 на трансформированных плазматических клетках ассоциировано с благоприятным прогнозом, а полная потеря экспрессии CD45 и CD56 ассоциирована с быстрой прогрессией заболевания и плохим прогнозом.

Диагностика множественной миеломы не может быть осуществлена на основании только одного методического подхода, исследования только одного биологического материала. Именно поэтому параллельно с исследованием клеток костного мозга методом ИФТ осуществляют исследование сыворотки крови (или мочи) методом иммунофиксации для выявления моноклонального характера продукции белка. Таким образом, реализация возможностей иммунологической лаборатории позволяют получать данные, необходимые для верификации диагноза множественной миеломы и достижения клинико-иммунологической ремиссии в соответствии с современными требованиями клиники.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Правительства Санкт-Петербурга в области науки и техники за 2007 г. и грантом Правительства Санкт-Петербурга для поддержки молодых ученых 2008 г.

Bone marrow IPT in MM diagnosis should be performed in routine haematological malignancy practice and be based on phenotypic differences between normal and transformed PC (tab. 7).

In summary, in order to properly evaluate the aberrant features of the malignant PC populations in MM we need to outline the characteristics of the normal PC-s during their maturation from B lymphocytes. These characteristics include:

- gradual loss of B-associated marker expression (e.g. the loss of CD19);
- the decrease in CD45 expression to very low levels (can be CD45^{dim} or even CD45^{negative});
- a dramatic increase in both CD38 and CD138 expression.

Thus the normal PC-s are clearly identifiable, and in this process additional reagents that are not described in this paper can also contribute to the analysis. Thus the normal PC-s are: CD45^{dim+}CD38^{bright+}CD138⁺CD19⁻CD20⁻CD56⁻CD117⁻ and/or CD45⁻CD38⁺CD138⁺.

Multiparametric flow cytometry is a modern and appropriate tool to identify transformed and normal PC according to their distinct phenotypic signatures; this method is also helpful in definition of relative content of PCs among nucleated cells with low or intermediate granularity in bone marrow. When performing bone marrow IPT by multicolor flow cytometry in MM patients before treatment one should take into consideration:

- necessity to count at least 50 000 events (in fact it is recommended to count as many events as allow PC to form a clear-cut cluster with minimal variability);
- possibility of heterogeneous expression of markers in question;
- necessity of quantitative measurement of relative content of transformed cells among mononuclear cells.

Informative value of individual markers is summarized in tab. 8 (adapted from [18]). Most authors agree that expression of CD45, CD56 and CD117 on transformed PC is associated with favorable prognosis while complete loss of CD45 and CD56 expression is indicative of rapid disease progression and poor prognosis.

The diagnosis of MM cannot be based on a single methodology or a single biological material. That is why study of serum and urine by immunofixation to confirm monoclonal protein production should be made in parallel with bone marrow IPT. So, capacity of immunological laboratory tests ensures findings needed to verify MM diagnosis and clinical and immunological response to treatment in accordance with current guidelines.

Acknowledgments

The study was supported by the grant from St-Petersburg government for science and technology, 2007 and by grant 2008 from St-Petersburg government for science and technology for young researches.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома. — 2004; СПб, Диалект: 448 С.
Bessmelzev S.S., Abdulkadirov K.M. Multiple Myeloma. — 2004, SPb, Dialect, 448 p. In Russian
2. Зуева Е.Е. Онкомаркеры: критерии значимости опухолевых маркеров (диагностическая чувствительность, специфичность, эффективность применения). Лабораторная Диагностика России. 2005–2006. — С. 66–72.
Zueva Ye.E. Oncomarkers how to evaluate in different clinical situations (diagnostics sensitivity, accuracy, possibilities of usage) Laboratory Diagnostics in Russia, 2005–2006, p. 66–72 in Russian.
3. Куртова А.В., Сиваченко Е.Б., Уткина Л.А., Слободник К.Ю., Степанова Н.В., Якубович М.А., Моисеев С.И., Зуева Е.Е. Иммунофенотипирование костного мозга для диагностики множественной миеломы. Практические аспекты // Клиническая и Лабораторная Диагностика. — 2007. В печати.
Kurtova A.V., Sivachenko (Rusanova) E.B., Utkina L.A., Slobodniuk K.Ju., Stepanova N.V., Jakubovich M.A., Moiseev S.I., Zueva Ye.E. Bone marrow immunophenotyping for multiple myeloma diagnostics. Practical point of view. Linical Laboratory Diagnostics, 2007, in Russian, in Press.
4. Русанова Е.Б., Куртова А.В., Степанова Н.В., Мачулайтене Е.Р., Рыжак А.П., Чередниченко Д.В., Зуева Е.Е. Метод иммунофиксации в диагностике и мониторинге множественной миеломы. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, 2008. — Т. 15, №1. — С. 68–72.
Rusanova E.B., Kurtova A.V., Stepanova N.V., Machulajtene E.R., Rijak A.P., Cherednichenko D.V., Zueva Ye.E. The method of immunofixation in Diagnostics and monitoring of multiple myeloma. Uchenije Zapiski Pavlov State medical University, 2008, Vol.15, №1, p. 68–72. In Russian.
5. Blade J., Samson D., Reece D. et al. Myeloma subcommittee of the EBMT. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol. — 1998. — Vol. 102. — P. 1115–23.
6. Chen-Kiang S. Biology of plasma cells. Best Pract Res Clin Haematol. 2005; 18: 493–507.
7. Davies F.E., Rawstron A.C., Morgan G.J. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol. 2002; 15(1): 197–222.
8. DiGiuseppe J. A., Flow Cytometric Immunophenotyping of Plasmacytic Neoplasms. Am J Clin Pathol. — 2007. — Vol. 127. — P. 172–174.
9. Dispenzieri A., Kyle R.A. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. Best Pract Res Clin Haematol. — 2005. — Vol. 18. — P. 553–68.
10. Greipp P.R., Raymond N.M., Kyle R.A., O'Fallon M. Multiple Myeloma: significance of plasmablastic subtype in morhological classification. Blood. — 1985. — Vol. 65. — P. 305–10.
11. Jacobson J.L., Hussen.MA, Barlogie B, Durie BGM, Crowley JJ A new staging system for multiple myeloma patients based on the outhwest Oncology Group (SWOG) experience. British Journal of Haematology. — 2003. — Vol. 122. — P. 441–450.

12. Kumar S., Rajkumar S.V., Kimlinger T., et al. CD45 expression by bone marrow plasma cells in MM: clinical and biological correlation. *Leukemia*. — 2005. — Vol. 19(8). — P. 1466–70.
13. Lakshminarayanan R., Li Y., Janatpour K., Beckett L., Jialal I. Detection by immunofixation of m proteins in hypogammaglobulinemic patients with normal serum protein electrophoresis results. *Am J Clin Pathol*. — 2007. — May, Vol. 127(5). — P. 746–51 17439833.
14. Lin P., Owens R., Tricot G., Wilson C.S. Flow cytometric immunophenotyping analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004; 121(4): 482–8.
15. Mateo G., Corral M., Almeida J., et al. Immunophenotyping analysis of peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma. *Haematologica*. — 2003. — Vol. 88. — P. 1013–21.
16. Osqueteau M. Expression of the CD117 (c-kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol*. 1996. — Vol. 95(3). — P. 489–93.
17. Rajkumar S.V. Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Am J Haematol*. 2001; Vol. 68(4): P. 269–75.
18. Rawstron A.C., A. Orfao, M. Beksac, L. Bezdicova, R. A. Brooimans, H. Bumbea, K. Dalva, G. Fuhler, J. Gratama, D. Hose, L. Kovarova, M. Lioznov, G. Mateo, R. Morilla, A. K. Mylin, P. Omedé, C. Pellat-Deceunynck, M. Perez Andres, M. Petrucci, M. Ruggeri, G. Rymkiewicz, A. Schmitz, M. Schreder, C. Seynaeve, M. Spacek, R. M. de Tute, E. Van Valckenborgh, N. Weston-Bell, R. G. Owen, J. F. San Miguel, P. Sonneveld, H. E. Johnsen on behalf of the European Myeloma Network Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. — *Haematologica*, March. 2008. — Vol. 93. — P. 431–438.
19. San Miguel J.F. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol*. 1995. — Vol. 8(4). — P. 735–59.
20. San Miguel J.F., Almeida J., Mateo G., et al. Immunophenotyping evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcomes. *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 1853–56.
21. San Miguel J.F., Gutierrez N.C., Mateo G., Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006. — Jul. — Vol. 42(11). — P. 1510–9.
22. Sarasquete M.E., Garsia-Sanz R., Gonzalez D., et al. MRD monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative PCR and flow cytometry. *Hematologica*, 2005. — Vol. 90. P. 1365–72.
23. Steingrimsdottir H., V. Haraldsdottir, I. Olafsson, V. Gudnason, H. M. Ogmundsdottir Monoclonal gammopathy: natural history studied with a retrospective approach. *Haematologica*. 2007. — Aug; Vol. 92 (8). — P. 1131–4 17650445.
24. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the international myeloma working group. *Br J Haematol*. 2003. Vol. 121. — P. 749–57.
25. Vincent R.S., Fonseca R., Lacy M.Q., et al. Plasmablastic morphology as an independent predictor of poor survival after autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. — 1999. — Vol. 17. — P. 1551–7.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ
ПО СТАНДАРТИЗОВАННОМУ
ЕВРОПЕЙСКО-АМЕРИКАНСКОМУ ПРОТОКОЛУ 2007 г.**

Общие положения и иллюстрация на конкретном примере

*Н.А. Купрышина, Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын
ГУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

РЕЗЮМЕ

Современные схемы лечения В-клеточного ХЛЛ с использованием алемтузумаба позволяют увеличить число полных ответов на терапию и добиться эрадикации минимальной резидуальной болезни, что сопровождается улучшением показателей выживаемости больных. В процессе проведения современных лечебных протоколов определение минимальной резидуальной болезни является обязательным при оценке эффективности терапии. В 2007 году создан стандартизованный европейско-американский протокол определения минимальной резидуальной болезни при В-ХЛЛ (A. Rawstron et al.) 4-цветным проточно-цитометрическим методом. В статье описываются детали использования протокола на примере больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом, леченных алемтузумабом. Авторы, имеющие большой опыт изучения В-ХЛЛ, делают заключение о целесообразности использования предложенного подхода не только для установления резидуальной болезни, но и для диагностики В-ХЛЛ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: В-ХЛЛ, минимальная резидуальная болезнь, проточная цитометрия, алемтузумаб.

ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие ознаменовалось созданием и широким внедрением в практику лечения В-ХЛЛ новых химио- (флудара) и иммунотерапевтических препаратов на основе моноклональных антител. Их эффективность в монорежимах или в различных сочетаниях подтверждена множеством протоколов клинических испытаний. Установлено, в частности, увеличение частоты полных ответов (полных ремиссий) в соответствии с критериями NCI (National Cancer Institute) при В-ХЛЛ до 50–70% (Bosch F. et al., 2002; H. Schultz et al., 2002; J.C. Byrd et al., 2003; C.M. Wendtner et al., 2004, C. Thieblemont et al., 2004). Полный ответ констатируется при отсутствии у больного общих симптомов, лимфоаденопатии (лимфатические узлы менее 1 см), нормальных размерах печени и селезенки, уровнях гемоглобина > 11 г/дл и тромбоцитов $> 100\,000/\text{мм}^3$. Подтверждением полного ответа является нормализация количества циркулирующих В-лимфоцитов крови при уровнях лейкоцитов не менее $1,5 \times 10^9/\text{л}$. Обязательным для установления полного ответа на терапию В-ХЛЛ в соответствии с критериями NCI является исследование костномозгового пунктата. Он должен быть нормоклеточным с уровнями лимфоцитов менее 30% и отсутствием лимфоидных нодулей (Eihhorst B. et al., 2007).

**MINIMAL DISEASE MONITORING IN PATIENTS WITH B-CELL
CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA ACCORDING TO 2007
STANDARDIZED EUROPEAN-AMERICAN PROTOCOL**

(General notes and illustration as a case report)

N.A. Kupryshina, L.Yu. Gritsova, N.N. Tupitsyn

N.N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

Abstract

Current treatment regimens in B-cell chronic lymphocytic leukemia using alemtuzumab are associated with improved complete response rates and eradication of minimal residual disease, and, as a result, with prolonged survival. Monitoring of minimal residual disease is a compulsory procedure for evaluation of response in current treatment protocols. A standardized European–American protocol for minimal residual disease monitoring by 4-color flow cytometry in B-cell chronic lymphocytic leukemia was developed in 2007 (A. Rawston et al.). This paper describes details of the protocol utilization in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia treated with alemtuzumab. Having a large experience in B-cell chronic lymphocytic leukemia the authors concluded that the above-mentioned protocol was useful not only in minimal residual disease monitoring but also in the diagnosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Key words: B-CLL, minimal residual disease, flow cytometry, alemtuzumab.

Introduction

The last decade was marked by the advent and wide clinical use of novel chemo- (fludara) and immunotherapies on the basis of monoclonal antibodies (Mab) in the treatment of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). These agents demonstrated efficacy both as monotherapy and in combination in many clinical trials. In particular, the therapy was associated with an increase in complete response rates according to National Cancer Institute (NCI) guidelines up to 50–70% (Bosch F. et al., 2002; Schultz H. et al., 2002; Byrd J.C. et al., 2003; Wendtner C.M. et al., 2004; Thieblemont C. et al., 2004). Complete response is defined as the absence of general symptoms, the absence of lymphadenopathy (lymph nodes less than 1 cm), normal size of the liver and spleen, normal hemoglobin (more than 11 g/dl) and platelet levels (more than 100 000/mm³). Complete response is confirmed, if circulating B-lymphocyte count is normal and leukocytes are not less than $1.5 \times 10^9/l$. According to the NCI criteria bone marrow biopsy study is a mandatory procedure to establish complete response in patients with B-CLL. Bone marrow should be normocellular, with lymphocytes less than 30% and no lymphoid nodules (Einhorst B. et al., 2007).

В настоящее время убедительно доказано, что использование морфологических и иммуноморфологических критериев, принятых NCI, не является достаточным для установления полноты ремиссии у больных В-ХЛЛ.

Современные методы проточной цитофлуориметрии и полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанные на характерных особенностях иммунофенотипа клеток В-ХЛЛ и уникальности их иммуноглобулинового рецептора, позволяют выявить 1 лейкозную клетку среди 1000–100 000 лейкоцитов. Высокочувствительными методами установлено, что современная химио- и/или иммунотерапия может приводить к полной элиминации лейкозных клеток у значительной части больных, то есть к эрадикации заболевания. Это позволило сформулировать концепцию минимальной резидуальной (остаточной) болезни (МРБ) при В-ХЛЛ. Наличие десятых или сотых долей процента клеток В-ХЛЛ в крови или костном мозге свидетельствует о наличии у больного МРБ-положительной полной ремиссии. Практически полное отсутствие этих клеток (менее 0,01%) характерно для МРБ-отрицательной полной ремиссии. Достижение МРБ-отрицательного статуса позволяет улучшить выживаемость больных (A. C. Rawstron et al., 2001; D. Provan et al., 1996).

После лечения алемтузумабом устойчивые, продолжительные ремиссии наблюдаются только у больных, у которых достигнут МРБ-отрицательный полный ответ, в то время как у пациентов с МРБ-положительным полным ответом общая продолжительность жизни не отличалась от таковой у больных с частичным ответом (P. Moreton et al., 2005).

Таким образом, наличие или отсутствие МРБ у больных В-ХЛЛ в ходе терапии алемтузумабом является главным показателем эффективности лечения и во многом определяет его продолжительность.

Совершенно очевидно, что важность определения МРБ при В-ХЛЛ диктует необходимость стандартизации методов определения остаточной болезни и повышения их точности. Стандарты разработаны для методов, основанных на ПЦР (J.J. Van Dongen et al., 2003), однако, эти методы являются достаточно сложными и дорогостоящими, что ограничивает их широкое внедрение. В этой связи большое внимание привлекает проточная цитометрия, методы определения МРБ на основе которой долгое время не были стандартизованы, что и обуславливало широкий (в тысячи раз) диапазон чувствительности определения резидуальных клеток В-ХЛЛ (A. C. Rawstron et al., 2001).

Стандартный подход к определению МРБ при В-ХЛЛ методом проточной цитометрии был разработан и опубликован в 2007 году (A.C. Rawstron et al., 2007). В разработке стандартизованного подхода участвовали 22 автора из различных институтов и клиник Европы и США. В результате было выработано консенсусное решение. В качестве стандарта определения МРБ при В-ХЛЛ предложено использовать 4-цветную проточную цитометрию. Метод характеризуется высокой воспроизводимостью и чувствительностью 1 клетка В-ХЛЛ на 10 000 лейкоцитов. В настоящей статье мы приводим алгоритм и детальную методику определения МРБ при В-ХЛЛ в соответствие со стандартизованным подходом A Rawstron et al. (2007).

Today there is strong evidence that the NCI morphological and immunomorphological criteria alone are not sufficient to establish response in B-CLL.

Up-to-date flow cytofluorimetry and polymerase chain reaction (PCR) assays based on immunophenotypic characteristics and unique immunoglobulin receptors on B-CLL cells can recognize a single leukemic cell among 1000 to 100 000 leukocytes. As demonstrated by high-sensitivity assays, modern chemo- and/or immunotherapies may lead to complete clearance of leukemic cells, i.e. disease eradication, in a considerable percentage of patients. This was a basis for the concept of minimal residual disease (MRD) in B-CLL. The presence of several tenths or thousandths of percent of B-CLL cells in blood or bone marrow is evidence of MRD-positive complete response. Practically complete clearance of these cells (less than 0.01%) is characteristic of MRD-negative complete response. MRD-negativity is associated with improved survival (Rawston A.C. et al., 2001; Provan D. et al., 1996). Sustained durable remission after alemtuzumab therapy is observed only in MRD-negative complete responders, while overall survival in patients with MRD-positive complete response is similar to that in partial responders (Moreton P. et al., 2005). The presence or absence of MRD in B-CLL patients on alemtuzumab therapy is therefore the principal marker of treatment efficacy and a determinant factor of treatment duration.

It is absolutely clear, that the importance of MRD monitoring in B-CLL dictates the need to standardize and improve accuracy of residual disease quantification methods. There are standards for PCR-based procedures (Van Dongen J.J. et al., 2003), but these procedures are rather complicated and costly and cannot therefore be widely used. In view of the above-said flow cytometry is worthy of attention. Methods for MRD detection on the basis of flow cytometry were not standardized for a long time, and range of sensitivity for B-CLL residual cells was therefore very broad (several thousand-fold) (Rawstron A.C. et al., 2001).

A standardized approach to MRD quantification in B-CLL by flow cytometry was developed and published in 2007 (Rawstron A.C. et al., 2007). Twenty two authors from various European and US centers participated in this project to develop consensus solution. Four-color flow cytometry was selected as a standard technique for MRD quantification in B-CLL. This technique is characterized by high reproducibility and sensitivity: 1 B-CLL cell per 10,000 leukocytes. This paper describes algorithm and detailed procedure for MRD monitoring in B-CLL in accordance with the standardized approach by Rawstron A.C. et al. (2007).

Наш опыт свидетельствует о том, что стандартизованный протокол и включенные в него комбинации МКА могут быть использованы не только для определения МРБ, но и явиться сердцевиной (core) иммунодиагностической панели В-ХЛЛ, так как позволяют диагностировать заболевание даже при aberrантном иммунофенотипе лейкозных клеток — со слабой экспрессией CD5, отсутствием/слабой/гетерогенной экспрессией CD23, выраженной экспрессией CD20 и т.п.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на материале периферической крови или аспиратов костного мозга 180 больных В-ХЛЛ, проходивших обследование в лаборатории иммунологии гемопоэза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Диагноз В-ХЛЛ установлен всем больным в соответствии с критериями классификации ВОЗ 2001 г. (E.L. Jaffe et al., 2001), исследование МРБ В-ХЛЛ выполнено на фоне терапии, в том числе алемтузумабом, у 11 больных.

Образцы были подготовлены для анализа по стандартной технологии. Клетки костного мозга и крови выделяли методом лизирования эритроцитов с помощью FACSlyse с последующей отмывкой в PBS-BSA.

Исследование проведено методами 3-цветной (большинство больных) или 4-цветной проточной цитометрии. Сбор клеток в случаях трехцветной окраски осуществляли на приборе FACScan, а при использовании четырех флуорохромов — на приборе FACSCanto, оснащенный двумя лазерами. При исследовании МРБ анализировали не менее 500 000 событий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные подтверждают высокую диагностическую ценность МКА, предложенных классификацией ВОЗ, 2001 г для иммунологической диагностики В-ХЛЛ. Хронический лимфолейкоз (или лимфома из малых лимфоцитов) относится к периферическим CD5-позитивным В-клеточным лимфомам, на мембране клеток которых экспрессирован антиген CD23. Уже эти признаки — коэкспрессия CD5 и CD23 на В-клетках — позволяют правильно поставить диагноз В-ХЛЛ более чем у 90% больных. Слабая экспрессия CD5 может иметь место при В-ХЛЛ, однако, отрицательные по CD5 случаи относятся к разряду казуистики. Наличие CD23 на мембране клеток В-ХЛЛ является характерным признаком данного заболевания и позволяет провести дифференциальную диагностику с лимфомой из клеток мантии фолликулов лимфатических узлов. Следует отметить, что экспрессия CD5 и CD23 на В-клетках не является специфической чертой В-ХЛЛ, характерным отличием от нормальных В-лимфоцитов. От 10 до 30% В-клеток крови экспрессируют эти антигены, причем уровни CD5 или CD23-позитивных В-лимфоцитов могут повышаться в процессе активации. В случаях aberrантного по CD5 или CD23 иммунофенотипа клеток В-ХЛЛ полезную информацию для верификации диагноза дает анализ экспрессии ряда дополнительных В-клеточных антигенов на опухолевых клетках. Эти антигены включены в стандартизованную панель диагностики МРБ при В-ХЛЛ (Rawstron A. et al., 2007).

As demonstrated by our experience, the standardized protocol and Mab combinations involved may both be used for MRD detection and become core elements of B-CLL immunodiagnosis panel because they provide detection of the disease even with aberrant leukemic cell immunophenotype, i.e. with low CD5 expression, no/low/heterogenic CD23 expression, marked CD20 expression, etc.

Material and methods

The study was performed on peripheral blood or bone marrow aspiration specimens from 180 B-CLL patients tested at the Hæmatopoïesis Immunology Laboratory, N.N. Blokhin RCRC, RAMS.

The diagnosis of B-CLL was made in all patients in compliance with WHO 2001 classification (Jaffe E.L. et al., 2001), MRD monitoring was carried out on therapy including alemtuzumab-based regimens in 11 cases.

Test specimens were prepared by standard procedures. Bone marrow and blood cells were separated by red cell lysis technique using a FACSLyse with washing in PBS–BSA to follow.

The study was performed by 3- (most cases) or 4-color flow cytometric assay. Cells were harvested with a FACScan for 3-color staining and with a 2-laser FACSCanto for 4-color staining. At least 500 000 events were analyzed to quantify MRD.

Results and discussion

Our data confirm the high diagnostic value of Mab proposed in the WHO 2001 classification system for B-CLL immunological diagnosis. Chronic lymphocytic leukemia (or small lymphocytic lymphoma) belongs to peripheral CD5-positive B-cell lymphomas with CD23 expression on cell membranes. Already these characteristics, i.e. CD5 and CD23 coexpression on B-cells ensure correct diagnosis of B-CLL in more than 90% of cases. Weak CD5 expression may be found in B-CLL but CD5-negative cases are just casuistic. The presence of CD23 on cell membrane in B-CLL is a characteristic feature of the disease and allows its differentiation from mantle-cell lymphoma. It should be noted that CD5 and CD23 expression on B-cells is not specific of B-CLL only or a characteristic distinction from normal B-lymphocytes. From 10 to 30% of blood B-cells express these antigens, with CD5- and CD23-positive B-lymphocyte counts increasing during activation. If B-CLL cells have an aberrant immunophenotype with respect to CD5 and CD23, analysis of expression of additional B-cell antigens on tumor cells may provide useful information to verify the diagnosis. These antigens are included in the standardized panel for MRD monitoring in B-CLL (Rawstron A. et al., 2007).

С 2007 года алемтузумаб включен FDA в перечень препаратов, которые могут использоваться в качестве первой линии лечения В-ХЛЛ (Boyd R. et al., 2008). Именно для данного препарата описаны достаточно высокая частота достижения МРБ-негативных полных ремиссий и связь эрадикации МРБ с улучшением выживаемости больных (Moreton P. et al., 2005). Поэтому на первый план выходит точность оценки МРБ в ходе лечения алемтузумабом, так как это позволяет планировать дальнейшие лечебные мероприятия и дает представление о прогнозе у больных В-ХЛЛ. Основной задачей данной статьи является не анализ частоты МРБ-негативных полных ремиссий при лечении В-ХЛЛ алемтузумабом (для этого требуется накопление большого материала, возможно, участие нескольких клиник), а критерии оценки МРБ в соответствии с последними публикациями (Rawstron A. et al., 2007), рекомендациями на web-сайтах: www.cllmrd.org; <http://www.ericll.org/projects/index.php>, а также собственным опытом диагностики и оценки МРБ при В-ХЛЛ.

При анализе более 50 комбинаций антител в ходе разработки стандартизованного протокола (Rawstron A. et al., 2007) авторами было отобрано 3 пары моноклональных антител – CD20/CD38, CD81/CD22 и CD79b/CD43, которые при проведении анализа в гейте CD19⁺/CD5⁺ лимфоцитов (4-цветная иммунофлуоресценция) характеризуются наибольшей точностью определения МРБ при В-ХЛЛ и минимальным числом ложно положительных результатов. В целом для диагностики МРБ предложено использовать 5 проб, которые представлены в таблице.

Представленные в таблице комбинации антител и использование 4-цветной проточной цитометрии позволяют диагностировать В-ХЛЛ и МРБ при В-ХЛЛ даже в случаях особенностей иммунофенотипа лейкозных клеток. Наиболее часто aberrантный иммунофенотип В-ХЛЛ заключается в слабой экспрессии CD23, реже — CD5, выраженной экспрессии CD20 на мембране злокачественных клеток. Возможна гетерогенность в пределах клона лейкозных клеток, заключающаяся в том, что только часть злокачественных В-лимфоцитов соответствует иммунофенотипу В-ХЛЛ. Во всех этих ситуациях неоценимую роль в подтверждении диагноза В-ХЛЛ и отборе комбинаций моноклональных антител для изучения МРБ играет использование панели МКА, предложенной стандартизованным протоколом A. Rawstron и соавт. (2007).

Проиллюстрируем последовательные этапы определения МРБ на примере больного В-ХЛЛ, получившего лечение алемтузумабом с полным ответом в соответствии с критериями NCI. На момент исследования костный мозг нормоклеточный, 77 тыс. миелокариоцитов в мкл (норма 41,6–195 тыс), лимфоциты — 15,8% (норма 4,3–13,7%).

Детали анализа и последовательность выделения гейтов проиллюстрированы на рис. 1 и 2. Рис. 1 демонстрирует необходимость включения проб № 1 и 2 (см. табл.) для гейтирования В-лимфоцитов, в пределах которых проводится дальнейший анализ.

а. Проба 2. CD19 (ось X) против SSC (ось Y), все клетки (без гейта). Формируется область R1 вокруг популяции В-клеток (CD19⁺ SSC^{low}).

In 2007 FDA approved alemtuzumab for first-line therapy in B-CLL (Royd R. et al., 2008). This therapy was associated with rather high rates of MRD-negative complete response and demonstrated relationship between MRD eradication and prolonged survival (Moreton R. et al., 2005). Accuracy of MRD quantification on alemtuzumab therapy is of much importance because it allows optimization of further treatment strategy and improves prediction of outcome in B-CLL. The main purpose of this study was to establish MRD monitoring criteria in accordance with recent publications (Rawstron A. et al., 2007), web-site guidelines (www.clldmr.org; <http://www.ericll.org/projects/index.php>) and our own experience in the MRD diagnosis and quantification in B-CLL, rather than analysis of rates of MRD-negative complete response to alemtuzumab therapy in B-CLL (such analysis requires accumulation of a large material, possibly with participation of several centers).

When developing the standardized protocol the authors (Rawstron A. et al., 2007) analyzed more than 50 antibody combinations to select 3 Mab pairs, i.e. CD20/CD38, CD81/CD22 and CD79b/CD43 that provided the highest accuracy of MRD quantification in B-CLL with minimal rates of false-negative results in CD19+/CD5+ gate analysis (4-color immunofluorescence). As a whole, 5 tests are proposed for MRD monitoring as presented in table.

The antibody combinations shown in the table and the use of 4-color flow cytometry ensure B-CLL diagnosis and MRD quantification even in cases with aberrant leukemic cell immunophenotype. The most common aberrant B-CLL immunophenotype is characterized by weak CD23 (rarer CD5) and marked CD20 expression on malignant cell membrane. The leukemic cell clone may be heterogeneous, with only a part of malignant B-lymphocytes having the specific B-CLL immunophenotype. In all such cases the Mab panel proposed in the standardized protocol by Rawstron A. et al. (2007) plays a very important role in verification of B-CLL diagnosis and selection of Mab combinations for MRD monitoring.

Consider the MRD quantification procedure in B-CLL on the example of a patient with complete response to alemtuzumab therapy by NCI criteria. At assessment his bone marrow was normocellular (77 000 myelokaryocytes per mcl [normal range 41 600 to 195 000], lymphocytes 15.8% [normal range 4.3 to 13.7%]).

Figs. 1 and 2 demonstrate details of the analysis and sequence of gating. Fig. 1 shows the need to use tubes 1 and 2 (table) for B-lymphocyte gating to continue the analysis.

Таблица / Table
Комбинации МКА и флуорохромов для определения МРБ при В-ХЛЛ / MCA and fluorochrom combinations for MRD detection in patients with B-CLL (Rawstron A. et al., 2007)

№ пробы / of tubes	Антитела и флуорохром / Antibodies and fluorochroms			
	FITC (FL1)	PE (FL2)	PE-Cy5 (FL3)	APC (FL4)
1	sIgκ	sIgλ	CD19	CD5
2	CD45	CD14	CD19	CD3
3	CD20	CD38	CD19	CD5
4	CD81	CD22	CD19	CD5
5	CD43	CD79b	CD19	CD5

Первоначально эта область должна включать максимально возможное количество В-клеток и исключать моноциты на основании светорассеяния.

- б. Проба 2. Прямое и боковое светорассеяние FSC (ось X) против SSC (ось Y). Формируется область R2 вокруг популяции В-лимфоцитов, исключая апоптотические клетки, разрушенные клетки (дебрис) и клеточные дуплеты.
- в. Проба 2. CD19 (ось X) против SSC (ось Y) в гейте R2
- г. Проба 2. CD3 (ось X) против SSC (ось Y), без гейтов. Формируется область R3 вокруг Т-клеточной популяции (CD3⁺ SSC_{low}).
- д. Проба 2. FSC (X) против SSC (Y) в гейтах R1+R2+R3.
- е. Проба 2. CD19 (X) против SSC (Y) в гейтах R1+R2+R3. Количество клеток в гейте на этой цитограмме иллюстрирует контаминацию выделенного региона В-клеток Т-лимфоцитами (в представленном случае 6 клеток). Это позволяет определить предел детекции МРБ в анализируемом материале (описано ниже).
- ж. Проба 2. CD45 (X) против SSC (Y) без гейта. Формируем область R4 вокруг лейкоцитов (CD45⁺), исключая эритроидные клетки и дебрис.
- з. Проба 1. К-цепь Ig (X) против CD5 (Y) в гейте R1+R2.
- и. Проба 1. Лямбда цепь Ig (X) против CD5 (Y) в гейте R1+R2.

Данный пример хорошо иллюстрирует моноклональность CD5-позитивных В-лимфоцитов по лямбда цепям мембранных Ig уже на уровне первой пробы. Именно с этой целью используются пробы №1 и №2 – оценка клональности CD5⁺ В-клеток в случае их незначительного количества, а также снижение степени контаминации Т-клетками (детали гейтирования для снижения уровня контаминации можно получить на сайте www.clldmrd.org). В представленном нами образце набрано клеточных событий 1 млн, лейкоцитов – 952 966, В-клеток немного – 35 030 (3,68%), порог детекции – 0,00525%. Иными словами, образец отвечает всем требованиям для оценки МРБ в соответствии со стандартизованным протоколом (A. Rawstron et al., 2007). Анализ МРБ у данного пациента представлен на рис. 2.

- а. Проба 3. CD20 (ось X) против CD5 (ось Y) в регионе R1+R2, показано формирование региона R5, включающего CD5-позитивные (экспрессия CD5 у данного пациента невысокая), CD20-слабопозитивные В-клетки.
- б. Проба 3. CD20 (X) против CD38 (Y) в гейте R1+R2. Формируем область R6, исключая В-лимфоидные предшественники с яркой экспрессией CD38 (CD20⁺), также все В-клетки с яркой экспрессией CD20 вне зависимости от уровней CD38.
- в. Проба 3. CD38 (X) против CD20 (Y) в гейтах R1+R2+R5+R6. Количество клеток В-ХЛЛ в этом регионе 29 886, а общее количество В-клеток в данной пробе 35 905, то есть клетки В-ХЛЛ составляют 83,24% среди В-лимфоцитов. Учитывая общее относительное содержание В-клеток среди лейкоцитов 3,68%, пропорция клеток В-ХЛЛ среди лейкоцитов костного мозга пациента равна 3,06%.

- a. Tube 2. CD19 (X axis) versus SSC (Y axis), all cells (no gating). Region R1 is formed around B-cell population (CD19⁺ SSC_{low}). This region should initially include maximum B-cells and exclude monocytes basing on light scatter parameters.
- b. Tube 2. Forward and side scatter: FSC (X axis) versus SSC (Y axis). Region R2 is formed around B-cell population that excludes apoptotic cells, debris cells and cell duplets.
- c. Tube 2. CD19 (X axis) versus SSC (Y axis) in gate R2.
- d. Tube 2. CD3 (X axis) versus SSC (Y axis), no gates. Region R3 is formed around T-cell population (CD3⁺ SSC_{low}).
- e. Tube 2. FSC (X axis) versus SSC (Y axis) in gates R1+R2+R3.
- f. Tube 2. CD19 (X axis) versus (SSC (Y axis) in gates R1+R2+R3. The number of cells in the gate demonstrates contamination of B-cell region by T-lymphocytes (6 cells in this case). This circumstance determines MRD detection limit in the study material (see below).
- g. Tube 2. CD45 (X axis) versus SSC (Y axis), no gates. Region R4 is formed around leukocytes (CD45⁺) that excludes erythroid and debris cells.
- h. Tube 1. Ig kappa-chain (X axis) versus CD5 (Y axis) in gate R1+R2.
- i. Tube 1. Ig lambda-chain (X axis) versus CD5 (Y axis) in gate R1+R2.

This example is a good illustration of CD5-positive B-lymphocyte monoclonality with respect to membrane Ig lambda-chains already at the first test. It is for this very purpose that tubes 1 and 2 were used, i.e. to evaluate CD5⁺ B-cell clonality in case of few B-cells and decreased T-cell contamination (see www.cllmrd.org for details of gating to decrease contamination). In the example above there were 1 million cell events, 952 966 leukocytes, not many B-cells (35 030/3.68%), detection threshold was 0.00525%. In other words, this example met all requirements for MRD detection in accordance with the standardized protocol (Rawstron A. et al., 2007). Fig. 2 shows MRD analysis procedure in the same patient.

- a. Tube 3. CD20 (X axis) versus CD5 (Y axis) in region R1+R2. Region R5 is formed that includes CD5⁺ cells (CD5 expression is not high in this case), CD20-low positive B-cells.
- b. Tube 3. CD20 (X axis) versus CD38 (Y axis) in gate R1+R2. Region R6 is formed that excludes B-lymphoid precursors with high CD38 (CD20⁺) expression and all B-cells with high CD20 expression irrespective of CD38 expression level.
- c. Tube 3. CD38 (X axis) versus CD20 (Y axis) in gates R1+R2+R5+R6. There are 29,866 B-CLL cells in this region, the B-cell total is 35 905, i.e. B-CLL cells are 83.24% of B-lymphocytes. Since the total relative content of B-cells among leukocytes is 3.68%, the portion of B-CLL cells among bone marrow leukocytes in this case is 3.06%.

- а. Проба 4. CD22 (X) против CD5 (Y) в гейте R1+R2. Формируем область R7, исключающую клетки с яркой экспрессией CD22 (в представленном образце различий в уровнях экспрессии CD22 между клетками В-ХЛЛ и нормальными В-лимфоцитами практически нет) позитивных по CD5.
- б. Проба 4. CD81 (X) против CD22 (Y) в гейте R1+R2. Формируем область R8, исключающую клетки с яркой экспрессией CD81 и яркой экспрессией CD22 (в данной пробе клетки В-ХЛЛ разделились от нормальных В-лимфоцитов на основании экспрессии CD22).
- в. Проба 4. CD81 (ось X) против CD5 (ось Y) в гейтах R1+R2+R7+R8. Количество клеток В-ХЛЛ, отвечающих этим требованиям равно 28 070, общее количество В-клеток в данной пробе 35 905, то есть клетки В-ХЛЛ составляют 78,18% среди В-лимфоцитов. Учитывая общее относительное содержание В-клеток среди лейкоцитов 3,68%, пропорция клеток В-ХЛЛ среди лейкоцитов костного мозга пациента равна 2,88%.
- г. Проба 5. CD79b (ось X) против CD5 (ось Y) в гейтах R1+R2. Формируем область клеток R9, позитивных по CD5 со слабой экспрессией CD79b.
- д. Проба 5. CD43 (ось X) против CD5 (ось Y) в гейтах R1+R2. Формируем область R10, позитивную по CD5 с яркой экспрессией CD43 (исключаются события со слабой экспрессией CD43).
- е. Проба 5. CD43 (ось X) против CD79b (Y). Количество клеток В-ХЛЛ, отвечающих этим требованиям равно 30 567, общее количество В-клеток в данной пробе 38 220, то есть клетки В-ХЛЛ составляют 80,2% среди В-лимфоцитов. Учитывая общее относительное содержание В-клеток среди лейкоцитов 3,68%, пропорция клеток В-ХЛЛ среди лейкоцитов костного мозга пациента равна 2,95%.

Таким образом, содержание резидуальных клеток В-ХЛЛ среди лейкоцитов костного мозга у данного больного было следующим: проба 3 – 3,06%; проба 4 – 2,88%; проба 5 – 2,95%; среднее – 2,96%. Иными словами, МРБ-негативная полная ремиссия у данного больного не достигнута ни по одному из тестов, включенных в стандартизованный протокол (A. Rawstron et al., 2007).

Приведенный пример отобран нами не случайно. Он позволяет даже на малом проценте клеток В-ХЛЛ дать ответ на ряд вопросов, возникающих в практической деятельности:

1. Как уже было отмечено, уровень экспрессии CD5 на клетках В-ХЛЛ в данном случае является низким. Вместе с тем, резидуальные клетки легко визуализируются по сниженной экспрессии CD20, CD79b, CD81.

- a. Tube 4. CD22 (X axis) versus CD5 (Y axis) in gate R1+R2. Region R7 is formed by excluding cells with bright CD22 expression (there is practically no difference in CD22 expression between B-CLL and normal B-lymphocytes in this case) and CD5 expression.
- b. Tube 4. CD81 (X axis) versus CD22 (Y axis) in gate R1+R2. Region R8 is formed by excluding cells with bright CD81 and bright CD22 expression (B-CLL cells are differentiated from normal B-lymphocytes by CD22 expression).
- c. Tube 4. CD81 (X axis) versus CD5 (Y axis) in gate R1+R2+R7+R8. There are 28 070 B-CLL cells meeting these requirements, the B-cell total in this specimen is 35 905, i.e. B-CLL cells are 78.18% of B-lymphocytes. Since the total relative count of B-cells among leukocytes is 3.68%, the portion of B-CLL cells among bone marrow leukocytes in this case is 2.88%.
- d. Tube 5. CD79b (X axis) versus CD5 (Y axis) in gates R1+R2. Region 9 is formed that includes CD5+ cells with weak CD79b expression.
- e. Tube 5. CD43 (X axis) versus CD5 (Y axis) in gates R1+R2. Region 10 is formed that includes CD5+ cells with bright CD43 expression (events with weak CD43 expression are excluded).
- f. Tube 5. CD43 (X axis) versus CD79b (Y axis). There are 30 567 B-CLL cells meeting these requirements, the B-cell total in this specimen is 38 220, i.e. B-CLL cells are 80.2% of B-lymphocytes. Since the total relative count of B-cells among leukocytes is 3.68%, the portion of B-CLL cells among bone marrow leukocytes in this case is 2.95%.

Thus, portion of B-CLL residual cells among bone marrow leukocytes from this patients was, as follows: 3.06% in tube 3, 2.88% in tube 4, 2.95% in tube 5; average 2.96%. This means that the patient did not achieve MRD-negative complete response in any of the standardized tests (Rawstron A. et al., 2007).

This example was not taken by chance. It allows several questions to be answered even with a small amount of B-CLL cells:

1. As mentioned, CD5 expression on B-CLL cells is low. However residual cells are easily visualized by decreased CD20, CD79b and CD81 expression.

2. Слабую экспрессию CD22 в комбинации с CD5 оценить не удастся, так как в силу большого числа накопленных событий эта область (CD22low) сливается с небольшой зоной более ярких по CD22 клеток. Однако имеет место четкое разделение по CD22 в той же пробе (№4) при анализе CD22 против CD81. В этом случае четко визуализируется область CD22low CD81low, характерных для В-ХЛЛ и отличающихся от нормальных В-лимфоцитов. Следовательно, для точной идентификации клеток В-ХЛЛ полезным является оценка антигенов в комбинациях, предложенных стандартизованным протоколом (A. Rawstron et al., 2007).
3. В-линейные предшественники, идентифицируемые в костном мозге на основании экспрессии CD38 (ярко) и CD20 (в основном слабо) – цитограмма «к» на рис. 2. Их количество в некоторых ситуациях регенерации костного мозга может быть выраженным относительно общего числа В-клеток. В подобных случаях необходим контроль того, что эти клетки попадают в область CD45⁺ (рис. 1ж). В случаях CD45-негативных В-линейных предшественников их количество необходимо суммировать с количеством лейкоцитов (CD45⁺) для точной оценки процента В-клеток среди лейкоцитов костного мозга.
4. Мы привели пример нормоклеточного костного мозга, так как именно восстановление костного мозга после лечения (в том числе, алемтузумабом) является критерием полного ответа согласно критериям NCI. На практике после проведения терапии костный мозг, как правило, гипоклеточный (5–7–10 тыс/мкл). В этих случаях необходим выбор одной наиболее информативной пробы для анализа МРБ (эта проба должна быть установлена при диагностике или перед лечением алемтузумабом). В гипоклеточных образцах костного мозга с крайне низким содержанием В-клеток на наш взгляд, в ряде случаев целесообразна постановка изотипических контролей к тем или иным антигенам.

Полученные нами данные указывают на то, что стандартный европейско-американский протокол (A. Rawstron et al., 2007) является высокотехнологичным современным методом, который позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью определять минимальную резидуальную болезнь при В-ХЛЛ.

В заключение следует отметить, что данный подход может быть использован не только для определения МРБ, но и для диагностики В-ХЛЛ. Для повышения точности диагностики В-ХЛЛ иммунофенотипирование лейкозных клеток может быть дополнено тестами, рекомендованными стандартизованным подходом (A. Rawstron et al., 2007) для определения резидуальной болезни при данном заболевании, то есть иммунодиагностику В-ХЛЛ по клеткам крови и костного мозга целесообразно проводить методом 4-цветной проточной цитометрии. Это полезно, так как уже при диагностике позволяет отобрать наиболее информативные комбинации МКА и использовать их для определения МРБ в процессе лечения в гипоклеточных образцах.

2. Weak CD22 expression in combination with CD5 expression cannot be assessed because this region (CD22^{low}) fuses with a small zone of cells with brighter CD22 expression due to a large number of events. However, analysis of CD22 versus CD81 in the same tube (No.4) ensures clear-cut distinction with respect to CD22. In this case there is clear-cut visualization of the CD22^{low} CD81^{low} cell region characteristic of B-CLL and different from normal B-lymphocytes. It follows then, that analysis of antigens in combinations proposed by the standardized protocol (Rawstron A. et al., 2007) is a useful tool for accurate B-CLL cell identification.
3. B-cell precursors are identifiable in bone marrow by CD38 (bright) and CD20 (mainly weak) expression (fig. 2k). Their portion in relation to the B-cell total may be rather big in some cases of bone marrow regeneration. In such cases one has to make sure these cells are within CD45⁺ region (fig. 1g). If CD45-negative B-cell precursors are found, their number should be summed up with CD45⁺ leukocyte count to quantify accurately percentage of B-cells in bone marrow leukocytes.
4. In our example bone marrow was normocellular because bone marrow recovery after treatment (including alemtuzumab therapy) is a criterion of complete response according to NCI guidelines. While in practice, bone marrow as a rule is hypocellular (5 to 7 to 10 thousand/mcl). In such cases one has to select the most informative sample for MRD monitoring (this sample should be selected at diagnosis or before alemtuzumab therapy start). It seems reasonable to use isotypic controls to some antigens for hypocellular bone marrow samples with extremely low B-cell count.

Our findings demonstrate that the standard European-American protocol (Rawstron A. et al., 2007) is a high-technology up-to-date tool to ensure MRD quantification in B-CLL with high accuracy and reproducibility.

In conclusion, this approach is useful both for MRD detection and the diagnosis of B-CLL. To improve accuracy of B-CLL diagnosis leukemic cell immunophenotyping may be supplemented with standard tests (Rawstron A. et al., 2007) to detect residual disease, i.e. it is reasonable to make B-CLL immunodiagnosis by blood and bone marrow cells using 4-color flow cytometry. This approach is helpful because already at diagnosis it ensures selection of most informative Mab combinations to be used for MRD on-therapy monitoring by hypocellular samples.

We believe it reasonable (since we deal with bone marrow) to count accurately CD19+CD45^{low} B-cell precursors when quantifying B-cell portion within MRD monitoring on alemtuzumab therapy, more so during hemopoiesis recovery and hypoplasia cessation. In our routine MRD monitoring in B-CLL we use a test with CD23, i.e. CD20FITC/CD23PE/CD19 PerCP/CD5APC besides the standardized tests (see table 1), because even though CD23 does not differentiate normal B-cells from B-CLL cells, CD23 expression is an obligatory criterion for the diagnosis of B-CLL.

На наш взгляд при анализе МРБ в ходе терапии алемтузумабом, поскольку речь идет о костном мозге, для подсчета пропорции В-клеток целесообразно точно учитывать количество В-линейных предшественников CD19+CD45low, особенно в период восстановления кроветворения и выхода из гипоплазии. На практике в повседневном анализе МРБ при В-ХЛЛ помимо предложенных стандартизованным протоколом тестов (см. табл.), мы используем пробу, включающую CD23: CD20FITC/CD23PE/CD19 PerCP/CD5APC.

Это обусловлено тем, что, хотя CD23 и не позволяет разграничить нормальные В-лимфоциты от клеток В-ХЛЛ, тем не менее, экспрессия данного антигена является обязательным требованием для установления диагноза В-ХЛЛ.

Таким образом, в условиях современной терапии В-ХЛЛ с применением иммунотерапевтических или химио-иммунотерапевтических протоколов на основе МКА важным является не только определение точных показаний к назначению этих эффективных (и дорогостоящих) препаратов, но и стандартизованный контроль результатов. Оценка эффективности терапии может быть достигнута только на основе определения минимальной резидуальной болезни у пациентов с полным ответом (полной ремиссией). Определение МРБ в соответствии со стандартизованным европейско-американским протоколом (A. Rawstron et al., 2007) является обязательным в ходе применения лечебных протоколов, включающих алемтузумаб.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем глубокую благодарность доктору биологических наук Д. Б. Казанскому и сотрудникам его лаборатории за предоставленную возможность работы на приборе FACSCanto.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bosch F., Ferrer A., Lopez-Guillermo A. et al. For the GELCAB (Grup per l'Estudi dels Limfomes a Catalunya I Balears). Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia. Br. J. Haematol. – 2002. – V.119. – P.976-84.
2. Boyd K., Dearden C.E. Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Expert Rev Anticancer Ther. – 2008. – V.8, №4. – P.525-33.
3. Byrd J.C., Peterson B.L., Morrison V.A. et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). /Blood. – 2003. – V. 101. – P. 6-14.
4. Eihhorst B., Hallek M. Revision of the guidelines for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL). Best practice and research clinical haematology. – 2007. – V.20. – P.469-477.
5. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid System. IACR Press. Lyon, 2001, p.75-108.

In summary, up-to-date treatment for B-CLL by Mab-based immunotherapy or chemoimmunotherapy protocols necessitates both accurate selection of candidates for these effective (and costly) therapies and standardized control of response. Evaluation of therapy efficacy may be made only on the basis of MRD monitoring in complete responders. MRD detection in accordance with standardized European-American protocol (Rawstron A. et al., 2007) is a mandatory procedure on alemtuzumab-based therapy.

Acknowledgement

We are grateful to D.B. Kazansky, D. Sci. (biol.), and his colleagues for the opportunity to use their FACSCanto apparatus.

References

6. Moreton P., Kennedy B., Lukas G. et al. Eradication of minimal residual disease in B-ctll chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J. Clin. Oncol.* – 2005. –V.23. –P.2971-9.
7. Provan D., Barlett-Pandite L., Zwicky C. et al. Eradication of polymerase chain reaction detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood.* -1996. –V.88. – P. 2228-35.
8. Rawstron A.C., Kennedy B., Evans P.A. et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood.* - 2001. –V.98. –P.29-35
9. Rawstron A.C., Villamor N., Ritgen M. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* – 2007. –P.1-9
10. Shultz H., Klein S.K., Rehwal U. et al. German CLL Study Group. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* – 2002. –V.100. – P. 3115-20.
11. Thieblemont C., Bouafia F., Hornez E. et al. Maintenance therapy with monthly injection with alemtuzumab prolongs response duration in patients with refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL). *Leuk. Lymphoma.* – 2004. –V.45. –P. 711-4.
12. Van Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene combinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* – 2003. –V.17. – P.2257–317.
13. Wendtner C.M., Ritgen M., Schweighofer C.D. et al. German CLL Study Group (GCLLSG). Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission – experience on safety and efficacy with a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia.* – 2004. –V.18. –P.1093-01.

PROGRAMME

Haematopoiesis immunology

5th Russian Conference with international participation

«Secondary infections and cancer in HIV- infected persons» and «Diagnostics and MRD-detection in haematopoietic tumors»

**(WORKING LANGUAGES ENGLISH AND RUSSIAN.
SYNCHRONOUS TRANSLATION)**

June 5-6, 2008

Chairpersons:

Professor G. Janossy (London, UK)
Professor Z. G. Kadagidze (Moscow, Russia)
Professor N. N. Tupitsyn (Moscow, Russia)

Place:

State N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated
to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation
Address: Moscow, Kashirskoye shosse 24
(Conference Hall of Institute of Clinical Oncology)

5 июня, 2008. Регистрация

6 июня, 2008

9:00–10:00. Регистрация, открытие

Вступительное слово директора РОНЦ им. Н. Н. Блохина

РАМН, академика РАН и РАМН, профессора М. И. Давыдова

Вступительное слово профессора З. Г. Кадагидзе

10:00–13:00. Утреннее заседание. «Вторичные инфекции и рак у ВИЧ-инфицированных больных»

**Председатели: профессор З. Г. Кадагидзе, профессор
G. Janossy (London, UK), профессор В. Э. Гурцевич**

10:00–10:30. Professor G. Janossy (London, UK)

«Immunodiagnosics in haemoblastoses, AIDS, tuberculosis and cancer»

10:30–10:50. Д-р биол. наук Д. Б. Казанский «Внутрилимфатическая селекция и противоопухолевый иммунологический надзор»

10:50–11:20. Профессор В. Э. Гурцевич «Онкогенные вирусы HHV-8»

11:20–11:40. Профессор Н. Н. Тупицын «Роль HHV-8 в патогенезе неходжкинских лимфом, множественной миеломы и рака предстательной железы»

11:40–12:10. Д-р биол. наук А. М. Ковригина «Диагностика HIV-ассоциированных лимфом»

12:10–12:30. Профессор А. В. Пивник «Клиника, диагностика, лечение лимфомы Ходжкина у ВИЧ-инфицированных больных»

12:30–12:40. Канд. мед. наук Л. Д. Гунтупова «Клинико-морфоиммунологические особенности активности саркоидной гранулемы»

12:40–13:00. Обсуждение

13:00–13:30. Обед

13:30–16:30. *Дневное заседание «Диагностика и оценка минимальной резидуальной болезни при гемопоэтических опухолях»*

Председатели: профессор Н. Н. Тупицын, д-р мед. наук А. В. Попа

13:30–14:00. Канд. мед. наук Л. Ю. Гривцова «Оценка минимальной резидуальной болезни при острых лимфобластных лейкозах по протоколу D. Camrانا»

14:00–14:20. Канд. мед. наук О. Ю. Баранова «Применение алемтузумаба при Т-клеточных лимфомах. Опыт ГУ РОНЦ РАМН»

14:20–14:40. Канд. мед. наук Н. А. Купрышина «Иммунодиагностика В-ХЛЛ с учетом определения минимальной резидуальной болезни»

14:40–15:00. Профессор Е. Е. Зуева «Диагностика множественной миеломы и мониторинг эффективности терапии»

15:00–15:20. Канд. мед. наук Е. Н. Шолохова «Дифференциальная диагностика лимфомы из предшественников гамма/дельта Т-лимфоцитов и НК-бластных (гематодермических) лимфом. Демонстрация случая». С докладом профессора А. В. Филатова

15:20–16:30. Общая дискуссия. Круглый стол.

Вопросы к обсуждению:

1. Опухоли у ВИЧ-инфицированных больных.
2. Минимальная резидуальная болезнь при ОЛЛ; что важнее — скорость циторедукции или аберрантный фенотип.
3. Нормальный неопухолевый эквивалент для клеток В-ХЛЛ.

Заккрытие конференции.

Таблица 1 / Table 1

Направления диагностики множественной миеломы / Multiple myeloma diagnosis fields

Скрининг / Screening	Методы подтверждения диагноза / Diagnosis verification	Методы определения объема опухоли и прогноза / Disease measurement and prognosis	Методы выявления функциональной недостаточности органов, вызванной миеломой / Detection of organic impairment due to myeloma	Специальные методы, необходимые некоторым пациентам / Special tests needed in some cases
Клинический анализ крови / Blood count СОЭ / ESR Электролиты сыворотки / Serum electrolytes Мочевина / Urea Креатинин / Creatinine Кальций / Calcium Альбумин / Albumin Электрофорез сыворотки и концентрированной мочи / Serum and concentrated urine electrophoresis Уровень неизотипических ИГ / Non-isotypic Ig level	Аспират костного мозга Иммунофиксация сыворотки и мочи / Bone marrow aspiration Serum and urine immunofixation	Цитогенетика или FISH / Cytogenetic study or FISH Количество моноклонального белка в сыворотке и моче / Serum and urine monoclonal protein measurement Кальций / Calcium Альбумин / Albumin B2-микроглобулин / B2-microglobulin	Клинический анализ крови (анемия) / Blood count (anemia) Клиренс креатинина / Creatinine clearance Кальций / Calcium Альбумин / Albumin ЛДГ / LDH СРБ / CRP Уровень неизотипических ИГ / Non-isotypic Ig level	Проточная цитометрия клеток костного мозга При макроцитозе: витамин B ₁₂ / Bone marrow cell flow cytometry In macrocytosis: Vitamin B12 Фолиевая кислота / Folic acid

Таблица 2 / Table 2

Болезни, сопровождающиеся моноклональной секрецией / Diseases associated with monoclonal secretion

Плазмоклеточные новообразования / Plasma cell neoplasms	Другие новообразования / Other neoplasms	Неопухолевые образования / Non-tumor diseases
Миеломная болезнь / Multiple myeloma Амилоидоз / Amyloidosis Болезнь тяжелых цепей / Heavy-chain disease Склеромикседема Аридта-Готтрона / Arndt-Gottron scleromixedema	Макроглобулинемия Вальденстрема / Waldenstrom's macroglobulinemia В-клеточные лимфомы ХЛЛ / B-cell lymphomas CLL Новообразования из клеток, не секретирующих ИГ (сóлидные опухоли, моноцитарные лейкозы, миелодисплазии) / Neoplasms from non-Ig-producing cells (solid tumors, monocytic leukemias, myelodisplasias)	Моноклональная гаммапатия неясного генеза / Monoclonal gammopathy of undetermined significance Аутоиммунные заболевания Болезни печени и желчных путей / Autoimmune diseases of liver and bile ducts Хронические воспалительные заболевания / Chronic inflammatory diseases Иммунодефициты / Immunodeficiencies Нарушения обмена включая болезнь Гоше / Metabolic disorders including Gaucher's disease Псевдопарапротеинемии / Pseudoparaproteinemias

Таблица 3 / Table 3

Объем исследования / Study volume

Показатель / Parameter	Число исследований, n / No. of investigations
Сывороточный М-протеин / Serum M-protein	260
Миеломный протеин в моче (Бенс-Джонса) / Urine myeloma protein (Bence-Jones)	65
Легкие цепи λ - и κ - типа в сыворотке / Serum and light chains	94
Легкие цепи λ - и κ - типа в моче / Urine and light chains	65
Альбумин / Albumin	260
B ₂ -микроглобулин / B2-microglobulin	170
Иммуноглобулины сыворотки IgA, IgM, IgG / Serum IgA, IgM, IgG	60
Креатинин / Creatinine	260
Иммунофиксация белков сыворотки / Serum protein immunofixation	260
Иммунофиксация белков мочи / Urine protein immunofixation	65
Иммунофенотипирование клеток костного мозга / Bone marrow cell IPT	50

Таблица 4 / Table 4

Результаты иммунофиксации белков сыворотки у больных ММ / Serum protein immunofixation results in multiple myeloma patients

Результат иммунофиксации / Immunofixation result	Концентрация иммуноглобулинов основных классов в сыворотке / Serum immunoglobulin		
	Концентрация ИГ класса IgA, IgM или IgG повышена, n=122 / Increased IgA, IgM or IgG concentration, n=122	Концентрация ИГ сыворотки в пределах нормы, n=65 / Serum Ig concentration within normal, n=65	Концентрация всех ИГ снижена, n=73 / Decreased concentration of all Ig, n=73
Отрицательный / Negative test	13	17	34
Положительный / Positive test	109	48	39

III

Таблица 5 / Table 5

Показания к ИФТ при ММ и других моноклональных гаммапатиях / Indications for immunophenotyping in MM and other monoclonal gammopathies

Клинические показания / Clinical indications	Параметры проточной цитометрии / Flow cytometry findings
Дифференциальный диагноз ММ, МГНЗ и реактивных состояний / Differentiation of MM from MGUS and reactive conditions	Относительное содержание плазматических клеток (ПК) / PC relative content
	Иммунофенотип ПК / PC immunophenotype
	Клональность ПК / PC clonality
	Содержание трансформированных ПК среди всех ПК / Transformed PC content among all PC
Маркеры прогноза ММ / MM prognostic markers	Экспрессия на трансформированных ПК маркеров CD45, CD56, CD117, CD28 / Expression of transformed PC markers CD45, CD56, CD117 and CD28
Выявление МОБ у больных ММ после терапии / MRD detection in MM patients after treatment	Содержание трансформированных ПК среди всех лейкоцитов и среди всех ПК ($1:10^{-4}$) / Transformed PC markers content among all leucocytes and all PC ($1:10^{-4}$)

Таблица 6 / Table 6

Критерии ответа ММ на терапию / Multiple myeloma response criteria

Фаза заболевания / Disease phase	Критерии оценки / Criteria
Полная ремиссия (ПР) / Complete response (CR)	5% и менее плазматических клеток нормальной морфологии в пунктате костного мозга, полученного не ранее, чем через 1 месяц после завершения курса терапии и отсутствие моноклонального ИГ в сыворотке крови и/или моче / 5% of plasma cells with normal morphology in bone marrow puncture specimen at least 1 months after therapy completion and no monoclonal immunoglobulin in serum and/or urine
Почти ПР (п-ПР) / Almost CR (aCR)	100% редукция М-протеина, но выявляемая с помощью высокочувствительных методов / 100% reduction in M-protein but detectable by high-sensitivity tests
Очень хорошая частичная ремиссия / Very good partial response	Более чем 90% снижение парапротеина (патологического иммуноглобулина) в сыворотке крови или моче / > 90% paraprotein (pathological immunoglobulin) reduction in serum or urine
Частичная ремиссия / Partial response	≥50% редукция плазматических клеток, ≥ 50% уменьшение сывороточного иммуноглобулина и/или 75% уменьшение уровня белка Бенс-Джонса / 50% reduction in plasma cells, 50% reduction in serum immunoglobulin and/or 75% reduction in Bence-Jones protein
Частичный ответ (ЧО) (минимальный ответ) / Minor response	> 25% редукция плазматических клеток, ≥ 25% снижение уровня моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови, ≥ 50% белка Бенс-Джонса в моче / > 25% reduction in plasma cells, ≥ 25% reduction in serum monoclonal immunoglobulin, ≥ 50% reduction in urine Bence-Jones protein
Большой ответ / Major response	≥ 75% редукция М-протеина, 5% и менее плазматических клеток / ≥ 75% reduction in M-protein, ≤ 5% of plasma cells
Стабилизация процесса / Stable disease	Стабилизация параметров болезни (включая число и размеры костных деструкций), умеренное снижение уровня моноклонального ИГ в сыворотке крови и белка Бенс-Джонса в моче на фоне не менее 3-х циклов химиотерапии / Stabilization of lesions (including number and size of bone destruction sites), moderate reduction in serum monoclonal immunoglobulin and urine Bence-Jones protein after at least 3 chemotherapy cycles
Резистентность / Resistant disease	Отсутствие уменьшения в сыворотке крови моноклонального иммуноглобулина или белка Бенс-Джонса в моче / No reduction in serum monoclonal immunoglobulin or urine Bence-Jones protein
Прогрессирование болезни (рецидив) / Progressive disease (recurrence)	Появление моноклонального иммуноглобулина, 25% увеличение его уровня, появление новых очагов деструкции в костях скелета или плазмцитомы / 25% increase in monoclonal immunoglobulin, appearance of new bone destruction sites or plasmacytoma

Таблица 7 / Table 7

Иммунофенотипические особенности плазматических клеток

Экспрессия / Expression	Плазматические клетки / Plasma cells	
	Нормальные / Normal	Миеломные / Malignant
Стабильная / Stable	CD45dim, CD38bright, CD138	CD38bright ⁺ , CD138 ⁺
Нестабильная / Unstable	CD56	CD10, CD19, CD27, CD40, CD117, CD56, CD45
Отсутствует / Absent	CD19, CD20, CD117	CD20, CD22

Таблица 8 / Table 8

Информативность отдельных маркеров при диагностике ММ с помощью многопараметрической проточной цитометрии /
 Informative value of individual markers in multiple myeloma diagnosis by multiparametric flow cytometry

Маркеры / Markers	Экспрессия / Expression, %		Информативность / Informative value
	Нормальные плазмациты / Normal plasma	Миеломные клетки / Myelomatous	
CD19	+ (>70%)	95	Необходим / compulsory
CD56	– (<15%)	75	
CD117	– (0%)	30	Рекомендован / recommended
CD20			
CD28	–/слабо(<15%) / –/weak (< 15%)	15–45	
CD27	++ (100%)	40–50	
CD81	+ (100%)	Нет данных / No data	Предложен / proposed
CD200	Слабо + / Weakly +	Нет данных / No data	

Редакторская правка профессора G. Janossy
MRD ALL paper edited by Professor G. Janossy



Иммунология гемопоэза. 2008. Т.5. №2
Haematopoiesis Immunology. 2008. Vol.5. №2

ISSN 1818-4820



9 771818 482005