

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

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

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

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

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

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

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

Введение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

Materials and methods

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Результаты и обсуждение

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

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

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

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

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

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

Results and discussion

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

Современные ПЦ протоколы детекции остаточных бластов при BCP-ALL

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

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

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

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

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

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

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

Table 1

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 2

Характеристика образцов костного мозга. 15 день химиотерапии индукции

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 3

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

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

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

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

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

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

Table 3

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

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

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

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

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

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

Заключение

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

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

Conclusion

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

Литература / Literature

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

10. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Breneman J.C., Cherlow J.M., Grossman N.J., Kersey J.H., *et al.* Cyto reduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia – the importance of early marrow response: report from Children's Cancer Group. *J. Clin Oncol* 1996; 14: 389 – 398
11. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G., Dworzak M., Ratei R., Silvestri D., *et al.* Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow/ *J Clin Oncol.* 2009; 27 (31): 5168–5174
12. Coustan- Smith E., Ribeiro R.C., Stow P., *et al.* A simplified cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006; 108 (1): 97–102.
13. Ratei R., Basso G., Dworzak M., Gaipa G., Veltroni M., Rhein P., Biondi A., Shrappe M. *et al.* Monitoring treatment response of childhood precursors B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 rotocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2008; 1–7
14. Popov A.M., Verzhbitskaia T.Yu., Tsauro G.A., Shorikov E.V.*et al.* Minimal Residual disease monitoring by simplified flow cytometry assay in children with pre-b-cell acute lymphoblastic leukemia: advantages and limitations. *Haematopoiesis Immunology* 2010; 2: 21–28
15. Borowitz M. Minimal residual disease detection in childhood ALL. *Haematopoiesis Immunology* 2010; 1:24–35.