

©Borgis

Robert Dębski^{1,2}, Łukasz Sędek³, Anna Jaworska-Posadzy¹, Alicja Sonsala³, Andrzej Kołtan^{1,2},
Tomasz Szczepański³, Monika Pogorzała^{1,2}, Mariusz Wysocki^{1,2}, *Jan Styczyński^{1,2}

Monitorowanie i walidacja minimalnej choroby resztkowej metodą cytometrii przepływowej w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci

Flow cytometry monitoring and validation of minimal residual diseases in childhood acute lymphoblastic leukemia

¹Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz
Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Mariusz Wysocki

²Szpital Uniwersytecki nr 1 im. Jurasza, Bydgoszcz
Dyrektor Szpitala: mgr Jacek Kryś

³Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Zabrze
Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Tomasz Szczepański

Słowa kluczowe

minimalna choroba resztkowa, cytometria przepływowa, dzieci, ostra białaczka limfoblastyczna, EuroFlow

Key words

minimal residual disease, flow cytometry, children, acute lymphoblastic leukemia, EuroFlow

Streszczenie

Wstęp. Minimalna choroba resztkowa to obecność przetrwałych w organizmie komórek nowotworowych.

Cel pracy. Ocena minimalnej choroby resztkowej (MRD) u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) metodą cytometrii przepływowej w lokalnym laboratorium i jej walidacja w laboratorium referencyjnym.

Materiał i metody. Badaniem objęto 30 kolejnych pacjentów z nowo rozpoznaną ALL. Badania przeprowadzono w Pracowni Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii w Bydgoszczy, a walidację tych wyników wykonywano w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Zabrzu. Pacjentów zaklasyfikowano do trzech grup: grupa I – MRD < 0,1%, grupa II – MRD = 0,1-10%, grupa III – MRD > 10%.

Wyniki. Wartości MRD uzyskiwane lokalnie wykazywały silną korelację z wynikami uzyskanymi w Zabrzu w dniu 15. i 33. ($p < 0,01$). Wyniki otrzymane w ośrodku bydgoskim w dniu 15. miały wyższą wartość u 9 pacjentów, niższą u 17 pacjentów i taką samą u 2 pacjentów. Natomiast w dniu 33. wyniki otrzymane w Bydgoszczy miały wyższą wartość u 20 pacjentów, niższą u 3 pacjentów i taką samą u 5 pacjentów. W przypadku 4 na 5 pacjentów, którzy zostali przekwalifikowani w 15. dniu terapii z grupy SR do IR, poziom MRD w Bydgoszczy i Zabrzu był podobny. W przypadku pacjenta, którego przekwalifikowano w 15. dniu terapii z grupy IR do HR, poziom MRD w Bydgoszczy był w drugim przedziale, natomiast w Zabrzu w przedziale trzecim. W 33. dniu terapii na podstawie diagnozy MRD > 10% w Bydgoszczy jednego z pacjentów przeklasyfikowano z IR do HR. W Zabrzu wartość MRD mieściła się w drugim przedziale.

Wnioski. Wartości MRD oznaczanej w Klinice w Bydgoszczy są porównywalne z wynikami otrzymanymi w ośrodku referencyjnym.

S u m m a r y

Introduction. Minimal residual disease denotes the persistence of malignant cells in the patient body.

Aim. Assessment of flow cytometry minimal residual disease (MRD) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in local laboratory and its validation in reference laboratory.

Material and methods. 30 consecutive patients with ALL. MRD was analyzed in Department of Pediatric Hematology and Oncology in Bydgoszcz, and validated in Department of Pediatric Hematology and Oncology in Zabrze. MRD results were qualified as: group I – MRD < 0.1%, group II – MRD = 0.1-10%, group III – MRD > 10%.

Results. MRD values obtained locally had strong correlations with the results from reference laboratory at days 15 and 33 ($p < 0.01$). MRD values obtained locally at day 15 were higher in 9 patients, lower in 17 patients and identical in 2 patients. At day 33, respective values were higher in 20 patients, lower in 3 patients and identical in 5 patients. In 4/5 patients, re-distributed at day 15 from SR to IR, MRD levels in Bydgoszcz and Zabrze were identical. In patient re-distributed at day 15 from IR to HR, the MRD value was assessed to group 2 in Bydgoszcz, and to group 3 in Zabrze. At day 33 patient re-distributed from IR to HR was assessed as group 3 in Bydgoszcz, and as group 2 in Zabrze.

Conclusions. MRD values determined in Bydgoszcz are comparable with results in reference laboratory.

Adres/address:

*Jan Styczyński
Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Collegium Medicum
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
tel. +48 (52) 585-48-60
jstyczynski@cm.umk.pl

WSTĘP

Radykalna poprawa skuteczności leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukemia* – ALL) u dzieci, jaka dokonana się w ostatnich trzech dekadach, pozwalająca uzyskać długotrwałą remisję u ponad 80% pacjentów, sprawiła, że obecne wysiłki lekarzy skupiają się z jednej strony na zmniejszeniu toksyczności terapii do niezbędnego minimum, z drugiej do uzyskania remisji lub na zapobieżeniu wznowie u pozostałego odsetka leczonych. Dla obydwu tych działań istotne znaczenie ma określenie ilości przetrwałych w organizmie komórek nowotworowych, tzw. minimalnej choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease* – MRD).

Ze względu na liczne doświadczenia, standaryzację oraz wysoką swoistość i czułość, zastosowanie mają tu głównie dwie techniki: cytometryczna oraz molekularna. Cytometryczna ocena MRD polega na analizie immunofenotypów charakterystycznych dla komórek białaczkowych. Do monitorowania MRD przy pomocy techniki polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) wykorzystuje się klonalne rearanżacje genów antygen-receptora i/lub strukturalne aberracje chromosomalne (charakterystyczne miejsca złamań chromosomów prowadzące do powstania genów fuzyjnych). Wielokrotnie potwierdzano korelację obu technik u chorych z ALL (1-4). Obie metody pozwalają na wykrycie jednej komórki białaczkowej na 10^5 zdrowych komórek (zakres czułości od 10^{-4} do 10^{-6}). Połączenie obu metod pozwala na monitorowanie MRD właściwie u wszystkich pacjentów z ALL, zapobiega też uzyskiwaniu wyników fałszywie negatywnych, na skutek ewolucji klonalnej lub zmian fenotypowych.

W chwili obecnej uważa się, że minimalna choroba resztkowa jest jednym z najistotniejszych czynników prognostycznych w dziecięcych ostrych białaczkach. Na jej podstawie możliwa jest nowoczesna stratyfikacja pacjentów do grup ryzyka nawrotu choroby. Niski poziom MRD lub jej brak pod koniec leczenia indukującego związany jest z dobrym rokowaniem, natomiast ryzyko wystąpienia wznowy jest proporcjonalne do poziomu MRD (5-6). Istotne znaczenie prognostyczne ma także monitorowanie MRD u dzieci z ALL z grupy wysokiego ryzyka poddawanych allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych i u pacjentów po wznowie ALL (7). **Wykazano, że klasyfikacja oparta na wynikach MRD pozwala skuteczniej wyodrębnić pacjentów z wysokim ryzykiem wystąpienia wznowy ALL niż podział oparty na badaniach cytomorfologicznych i klinicznych** (1, 4, 8).

Cytometria przepływową jest metodą dostępną w każdym ośrodku hematologicznym, stale doskonaloną i rozwijaną. Obecnie umożliwia ona detekcję komórek z czułością 10^{-4} do 10^{-5} . Rozróżnienie komórek nowotworowych od prekursorów komórek hematopoetycznych możliwe jest dzięki tzw. specyficznym immunofenotypom białaczkowym (ang. *leukemia-associated immunophenotypes* – LAIPs) (1, 8, 9). Są to charakterystyczne zaburzenia w zakresie antygenów, w których wyróżniamy:

- występowanie na badanych komórkach antygenów charakterystycznych dla innej linii komórkowej (koekspresja) (linii T na limfoblastach linii B i *vice versa*, a w przypadku ALL także antygenów z linii mieloidalnych) (8, 10),
 - jednoczesną obecność antygenów, prawidłowo występujących na etapach różnicowania/dojrzenia komórki (asynchronia) (10, 11),
 - nadmierną ekspresję antygenów,
 - obniżenie ekspresji antygenów lub jej brak (8, 9).
- Połączenie szeregu nieprawidłowości ekspresji antygenów białaczkowych powoduje, że zajmują one tzw. „puste przestrzenie” (ang. *empty spaces*) w porównaniu do prawidłowej ontogenezy limfocyty, co pozwala na poszukiwanie w szpiku remisyjnym tej nieprawidłowej populacji w ilościach śladowych (8, 10, 11).

CEL PRACY

W pracy podjęto próbę oceny MRD u dzieci z ALL metodą cytometrii przepływowej i skonfrontowano wyniki uzyskane w lokalnym laboratorium z wynikami uzyskanymi w laboratorium referencyjnym, a także sprawdzono, jaki wpływ miało oznaczanie MRD w klasyfikacji pacjentów do grup ryzyka.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Badaniem objęto 30 kolejnych pacjentów z nowo rozpoznaną ALL leczonych w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii w Bydgoszczy od sierpnia 2010 do grudnia 2012 roku. Grupę stanowiło 20 chłopców i 10 dziewcząt w wieku 0,6-18 lat (mediana 4,5). Ponad połowę pacjentów (53,3%) stanowili chłopcy w wieku 2-5 lat. W analizowanym okresie w leczeniu pacjentów powyżej pierwszego roku życia stosowane były dwa programy terapeutyczne: ALL-IC-2002 (n = 9), a od kwietnia 2011 roku – ALL-IC-2009 (n = 20) (12, 13). Dzieci poniżej pierwszego roku życia leczone były według programu Interfant-06 (n = 1) (14).

Materiał

Materiałem badanym w niniejszej analizie był szpik kostny (w przypadku pacjentów z ALL wykazano wyższą zawartość MRD w szpiku kostnym niż we krwi obwodowej) (15). Preparatykę przeprowadzano w ciągu 2 godzin od pobrania materiału od pacjenta. Analizę fenotypu przeprowadzano w momencie rozpoznania, a następnie w 15. i 33. dobie leczenia. Za każdym razem standardowo wykonywano badanie mielogramu.

Badanie cytometryczne

Badania przeprowadzano w Pracowni Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej Katedry Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum w Bydgoszczy przy użyciu cytometrów przepływowych Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA – laser 488 nm; 5 zakresów fluorescencji) lub Becton Dickinson FACS

Canto™ II (lasery 488 nm i 405 nm oraz laser diodowy 405 nm; 8 zakresów fluorescencji). Akwizycja i analiza danych odbywała się w systemie System II (Coulter) lub FACS Diva (Becton Dickinson). Analizę przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producentów przeciwciał monoklonalnych oraz wzorując się na dostępnych zaleceniach grupy EuroFlow (16, 17) i BFM (11).

Badanie przeprowadzano z użyciem 0,3-1 mln komórek w zawiesinie o stężeniu $0,5-2,5 \times 10^6$ leukocytów/ml. Badanie przeprowadzano metodą „lyse, no wash” z liżą erytrocytów odczynnikami UtiLyse (DAKO, Glostrup, Dania) lub „lyse and wash” z użyciem FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy). W przypadku jednoczesnej oceny antygenów wewnątrzkomórkowych preparatykę uzupełniano permeabilizacją błon komórkowych przy użyciu odczynników Fix&Perm (Invitrogen, Camarillo, USA).

Do diagnostyki immunologicznej w momencie rozpoznania wykorzystywano szeroki panel przeciwciał (CD1a, CD2, cyCD3, sCD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD64, CD79-alfa, CD117, łańcuchy kappa i lambda, MPO, TdT). Za kryterium obecności badanej determinanty na komórce przyjęto jej ekspresję na powierzchni co najmniej 20% komórek. Okresowo wykonano badanie kontroli izotypowej, która umożliwiła właściwe odcięcie komórek z dodatnią ekspresją antygeny. Podtypy ostrych białaczek limfoblastycznych klasyfikowano zgodnie z wytycznymi programów ALL-BFM (11).

Badania cytometryczne przeprowadzano, stosując stałe zestawy przeciwciał, dostosowane do linii klonu nowotworowego limfoblastów. W ALL z linii B stosowano następujące zestawy: CD19/CD10/CD20/CD45, CD20/CD10/CD19/CD34, CD58/CD10/CD19/CD34, CD58/CD10/CD19/CD45, CD10/CD34/CD19/CD45, CD10/CD20/CD19/CD45/CD34, TdT/CD10/CD19, natomiast w ALL z linii T stosowano: CD7/sCD3/cCD3, TdT/CD7/sCD3/cCD3, CD4/CD8/CD45/CD3, CD99/CD7/CD5/sCD3/cCD3 (11). Pacjentów zaklasyfikowano do trzech grup: grupa I – MRD $< 0,1\%$ ($< 10^{-3}$), grupa II – MRD $0,1-10\%$ (10^{-3} do 10^{-1}), grupa III – MRD $> 10\%$ ($> 10^{-1}$).

Walidacja wyników w ośrodku referencyjnym

Równolegle do analizy minimalnej choroby resztkowej prowadzonej w Katedrze Pediatrii, Hematologii i Onkologii w Bydgoszczy przeprowadzano walidację jej wyników za pomocą 8-kolorowej cytometrii przepływowej w ośrodku referencyjnym, posiadającym europejską akredytację cytometryczną EuroFlow (16, 17), tj. w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrzu. W celu przeprowadzenia walidacji wyników, 5 ml szpiku kostnego pobrane na EDTA w dniu rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej oraz w 15. i 33. dniu leczenia przesyłano w ciągu 24-48 godzin do Kliniki w Zabrzu.

Analiza statystyczna

Różnice pomiędzy grupami oceniono testem chi-kwadrat lub testem Fishera. Walidację wyników MRD w ośrodku referencyjnym oceniono testem korelacji Spearmana oraz testem par Wilcozona.

WYNIKI

Fenotyp komórek białaczkowych

W badanej grupie dominowały białaczki z linii B-komórkowej (27/30 przypadków) (tab. 1), z czego w 25 przypadkach z immunofenotypem pre-B/common-ALL. U dwóch pacjentów (w tym u jednego niemowlęcia) rozpoznano białaczkę o fenotypie pro-B-ALL. U trzech pacjentów (wyłącznie chłopców w wieku powyżej 5 lat) stwierdzono białaczkę z linii T-komórkowej, w tym u dwóch pacjentów stwierdzono białaczkę o immunofenotypie pre-T-ALL, a jeden przypadek sklasyfikowano jako białaczkę z dojrzałych postaci limfocytów T (mature-T-ALL TCR- $\gamma\delta$ -dodatnia).

Tabela 1. Immunofenotypy komórek nowotworowych u poszczególnych pacjentów.

Lp.	ALL z linii B-komórkowej
1	CD19+CD20-TdT+CD10+/-CD34-CD45-
2	CD19+CD10+CD45słabo+CD20+/-TdT+CD34-
3	CD19+CD10+CD20-CD34-CD45-TdT-
4	CD19+CD10+ TdT+CD45-CD34-CD20-
5	CD19+CD10+CD34+TdT+CD20-CD45-
6	CD19+CD10+TdT+CD13+CD20-CD45-CD34-
7	CD19+CD10+CD45-CD20-TdT+CD34+CD2+
8	CD19+CD10+CD20+TdT+CD45-
9	CD19+CD10+CD38+TdT+CD45-CD34-
10	CD19+CD38+CD45słabo+CD10+/-CD20-TdT-
11	CD19+CD10+CD20-TdT+CD45-CD34-CD10+/-
12	CD19+CD10+CD20-CD34+TdT+CD45-
13	CD19+CD10+CD20-TdT+CD45-CD34-
14	CD19+CD10+CD20-CD45-CD34-TdT+
15	CD19+CD20-CD34+TdT+CD45słabo+CD10+/-
16	CD19+CD10+CD20-TdT+CD45-CD34-
17	CD19+CD10+CD20-CD45-TdT+CD34+
18	CD19+CD10+CD20-CD45-TdT+CD34+
19	CD19+CD20-CD10+CD34+TdT+CD45-
20	CD19+CD20-CD10-CD45-CD34+TdT+CD15+
21	CD19+CD20-CD10+CD45-CD34+TdT+CD13słabo+CD-33słabo+
22	CD19+CD20-CD10+CD34+TdT+CD45+
23	CD19+CD20-CD10-CD34-TdT-CD45słabo+CD38słabo+
24	CD19+CD10+CD20-CD34+TdT+CD45-
25	CD19+CD10+CD20-CD34+TdT+CD45-
26	CD19+CD10+CD20-CD34+TdT+CD45+/-
27	CD19+CD10+CD20-CD45-CD34-TdT+
ALL z linii T-komórkowej	
28	CD2+CD3cy+CD5+CD7+CD45+CD99+C-D1a-CD3s-CD4-CD8-TCR-TdT-
29	CD2+CD3cy+CD3s-CD5+CD7+CD38+TdT+CD117+CD-45słabo+
30	CD45+CD2+CD3+CD5+CD7+CD38+C-D1A-CD4-CD8-TdT-TCR $\gamma\delta$ +

Ocena MRD w 15. i 33. dniu leczenia

Analizę minimalnej choroby resztkowej w 15. i 33. dniu terapii przeprowadzono u wszystkich 30 pacjentów. W 15. dobie leczenia odsetek przetrwałych komórek nowotworowych w szpiku wyniósł od 0 do 90,5% (mediana 0,28%). W 33. dobie leczenia odsetek MRD wyniósł 0-81% (mediana 0,02%). Podział na grupy wiąże się ze stratyfikacją pacjentów do grup ryzyka wprowadzoną w programie ALL-IC-2009. Warunkiem pozostania pacjenta w grupie standardowego ryzyka (SR) jest m.in. MRD < 0,1%, a uzyskanie MRD > 10% lokalizuje pacjenta zawsze w grupie wysokiego ryzyka (HR). Zgodnie z tym podziałem w 15. dobie leczenia u 13 pacjentów zdiagnozowano MRD < 0,1%; u 14 – MRD w zakresie 0,1-10%; u 3 pacjentów – MRD powyżej 10%. W 33. dniu terapii 25 pacjentów zaklasyfikowano do grupy I, 3 pacjentów wykazywało obecność MRD na poziomie grupy II, u dwóch pacjentów stwierdzono obecność przetrwałych komórek białaczkowych powyżej 10% (tab. 2).

Tabela 2. Stratyfikacja pacjentów według grup MRD i jej walidacja.

Grupy MRD	MRD 15. dzień		MRD 33. dzień	
	Bydgoszcz	walidacja*	Bydgoszcz	walidacja*
I grupa: < 0,1%	13	9	25	24
II grupa: 0,1-10%	14	15	3	3
III grupa: > 10%	3	4	2	1

*w dwóch przypadkach ze względów technicznych nie wykonano badania

Stratyfikacja pacjentów do grup ryzyka

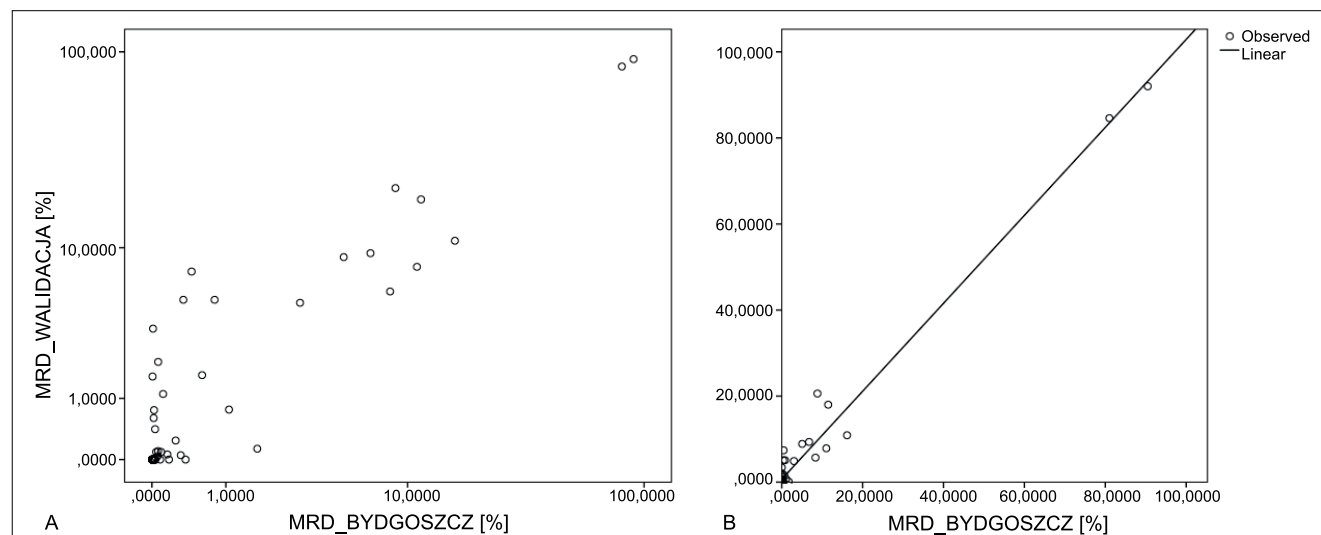
W dniu rozpoznania 30 pacjentów sklasyfikowano zgodnie z programami leczenia ALL do określonej grupy ryzyka. Poziom minimalnej choroby resztkowej w 15. i 33. dniu terapii stanowił jedno z podstawowych kryteriów do weryfikacji grupy ryzyka. W dniu rozpoznania 8 pacjentów zaklasyfikowano do grupy o stan-

dardowym ryzyku (SR), 17 pacjentów do pośredniej grupy ryzyka (IR), a 5 do wysokiej grupy ryzyka (HR). W 15. dniu terapii z uwagi na poziom MRD > 0,1% pięcioro spośród ośmiorga dzieci (62,5%) przeklasyfikowano z SR do IR. U jednego dziecka zmieniono IR na HR. W 33. dniu terapii na podstawie diagnozy MRD > 10% u jednego z pacjentów przeklasyfikowano go z IR do HR. W przypadku pacjenta leczonego według programu terapeutycznego Interfant-06, u którego stwierdzono ostrą białaczkę limfoblastyczną o immunofenotypie pro-B, zdiagnozowano brak obecności MRD w 15. i 33. dniu terapii. Pacjent w dniu rozpoznania został zaklasyfikowany do pośredniej grupy ryzyka. Na podstawie oceny MRD pozostał w grupie IR.

Walidacja wyników MRD w ośrodku referencyjnym

Równolegle do analizy MRD prowadzonej w Bydgoszczy, prowadzono walidację tych wyników w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Zabrze. Ze względów technicznych, walidacja w dniach 15. i 33. terapii możliwa była u 28 spośród 30 analizowanych pacjentów. Odsetek komórek o fenotypie odpowiadającym komórkom nowotworowym, stwierdzany w obu ośrodkach w 15. i 33. dobie leczenia, przedstawiono na rycinie 1. Wyniki MRD uzyskiwane lokalnie były zbieżne z wynikami uzyskanymi w ośrodku zabrzańskim, zarówno w dniu 15. ($p < 0,01$, współczynnik korelacji Spearmana – 0,779), w dniu 33. ($p < 0,01$, współczynnik korelacji Spearmana – 0,560), jak i dla wszystkich wyników łącznie ($p < 0,01$, współczynnik korelacji Spearmana – 0,783). Również analiza wyników MRD w postaci par powiązanych przeprowadzona testem Wilcoxon'a nie wykazała istotnych różnic pomiędzy ośrodkami dla wszystkich pacjentów dla wszystkich wyników łącznie ($p = 0,251$).

Jednakże analizując wyniki oznaczeń w poszczególnych dniach, stwierdzano istotne różnice pomiędzy ośrodkami zarówno w dniu 15. ($p = 0,013$), jak i w dniu 33. ($p = 0,018$). Porównując do wyników z ośrodka referencyjnego, w dniu 15. wyniki otrzymana-



Ryc. 1. Wyniki 56 badań MRD (Bydgoszcz) i ich walidacja (Zabrze): (A) w skali logarytmicznej, (B) korelacja i regresja liniowa zwalidowanych wyników MRD; linię opisuje równanie $y = 1,022x + 0,694$, przy korelacji Spearmana na poziomie $p < 0,01$.

ne w ośrodku bydgoskim miały wyższą wartość u 9 pacjentów, niższą u 17 pacjentów i taką samą u 2 pacjentów. Z kolei w dniu 33. wyniki otrzymane w Klinice w Bydgoszczy miały wyższą wartość u 20 pacjentów, niższą u 3 pacjentów i taką samą u 5 pacjentów.

W przypadku czterech z pięciu pacjentów, którzy zostali przekwalifikowani w 15. dniu terapii z grupy standardowego ryzyka do grupy pośredniego ryzyka, poziom MRD zdiagnozowany w Klinice w Bydgoszczy oscylował w tych samych przedziałach co w ośrodku walidacyjnym. Natomiast u jednego z nich w ośrodku walidacyjnym nie wykonano badania MRD z powodu braku materiału. W przypadku pacjenta, którego przekwalifikowano w 15. dniu terapii z grupy pośredniego ryzyka do grupy wysokiego ryzyka, poziom MRD zdiagnozowany w Klinice w Bydgoszczy był w drugim przedziale, natomiast w ośrodku walidacyjnym w przedziale trzecim. W 33. dniu terapii na podstawie diagnozy MRD na poziomie $> 10\%$ w Klinice w Bydgoszczy jednego z pacjentów przeklasyfikowano do wyższej grupy ryzyka (z IR do HR). Natomiast poziom MRD w ośrodku walidacyjnym u tego pacjenta oscylował w drugim przedziale (1-10%).

DYSKUSJA

Najnowsze protokoły leczenia ALL u dzieci podejmują próbę lepszej stratyfikacji pacjentów opartej na analizie poziomu MRD. Od 2002 roku dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną w Polsce leczone były według protokołu ALL-IC-2002, w którym kwalifikacja pacjentów do grup ryzyka oparta była wyłącznie na kryteriach klinicznych i genetycznych. Ze względu na relatywnie wysoki koszt i brak bazy laboratoryjnej w protokole tym monitorowanie MRD było niezwykle utrudnione i w większości ośrodków diagnostycznych niewykonywane. Mimo iż globalnie protokół ALL-IC-2002 okazał się wielkim sukcesem, ewidentnie proces kwalifikacji do grup ryzyka wymagał optymalizacji. W grupie SR 4-letnie przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń (EFS) sięgało 85%, co oznacza, że u około 15% pacjentów leczenie nie było wystarczająco skuteczne. Większość tych pacjentów można było zidentyfikować dzięki monitorowaniu MRD. W grupie IR 4-letni EFS osiągnął 77%, a w HR 58%. W protokole BFM/AEIOP 2000 zastosowanie MRD do stratyfikacji leczenia przy podobnych schematach chemioterapii pozwoliło na uzyskanie wyższych wskaźników EFS w każdej z grup ryzyka (18, 19). Dlatego grupa ALL-IC podjęła decyzję o wprowadzeniu MRD jako elementu kwalifikacji do grup ryzyka w nowym programie ALL-IC-2009. Technika wybraną do monitorowania MRD w ALL-IC-2009 jest wieloparametryczna cytometria przepływowa.

Stratyfikacja w grupie ALL-IC obejmuje: wczesną odpowiedź na terapię prednizonem, ocenę morfologii szpiku kostnego w 15. i 33. dniu, ocenę liczby leukocytów oraz ocenę obecności genów fuzyjnych BCR/ABL i MLL/AF4. Wykazano, iż poziom MRD istotnie koreluje z wyodrębnionymi grupami ryzyka. U pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, znacznie częściej obserwowano

wysoki poziom MRD w porównaniu z grupą standardowego i niskiego ryzyka. Ponadto wykazano, iż u chorych słabo odpowiadających na leczenie prednizonem obecność komórek przetrwałych wykrywano znacznie częściej na zakończenie indukcji, w porównaniu do pacjentów, którzy szybko odpowiedzieli na zastosowaną terapię (8). Obecność minimalnej choroby resztkowej korelowała także z występowaniem aberracji genetycznych (chromosom Philadelphia, translokacja TEL-AML1) (8).

Nasza analiza objęła 30 pacjentów, których ocena MRD była wykonywana w laboratorium lokalnym i referencyjnym. Wykazaliśmy dużą zbieżność wyników, potwierdzoną testami statystycznymi, przekładającą się na zgodną reklasyfikację pacjentów do grup ryzyka w 15. i 33. dniu terapii. Różnice poszczególnych oznaczeń były jednak widoczne. Spośród czynników je wywołujących nie można wykluczyć wpływu transportu próbek do laboratorium referencyjnego (przykładem jest brak walidacji dwóch wyników), w niektórych przypadkach zajmującym ok. 48 godzin. W przypadkach materiałów ubogokomórkowych, z jakimi często spotykamy się w 15. i 33. dobie leczenia, nawet niewielkie różnice w przechowywaniu materiału mogą wpływać na wynik badania.

Rozbieżności między laboratoriami dotyczące cytometrów (cytometry różnych producentów różnią się źródłami światła, liczbą i rodzajem oznaczanych jednocześnie fluorochromów oraz algorytmem ich detekcji) oraz oprogramowania mają chyba najistotniejsze znaczenie, tym bardziej, że rzutują na możliwości doboru odczynników. Wreszcie odnotować należy różnice, niekiedy pozornie nieistotne, w preparatyce materiału w różnych pracowniach (antykoagulanty, roztwory lizujące i odczynniki permeabilizujące).

Dobór odczynników jest na tyle istotnym elementem standaryzacji, że grupa EuroFlow ustaliła listę zalecanych odczynników z dokładnością do klonu zastosowanego przeciwciała, fluorochromu i producenta (16, 17). Dobór ten poprzedzony był wieloma próbami. Konieczność zapewnienia bardzo szerokiego panelu odczynników jest jednak trudna do spełnienia. Stąd próby znalezienia „złotego środka” dokonywane są od lat, nie tylko w Polsce. Autorzy tych prób zwracają też uwagę na dość ograniczony repertuar fenotypów w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. Z tego względu w naszym laboratorium skupiliśmy się na zestawach antygenów, umożliwiających optymalne wykorzystanie zasobów sprzętowych, szybkość i relatywną łatwość wykonania badania oraz ograniczenie kosztów, wykorzystując jednocześnie wiele zaleceń EuroFlow. Różnice w doborze zestawów antygenów oznaczanych jednocześnie między laboratorium lokalnym a referencyjnym nie mogą nie wywołać różnic w uzyskiwanych wynikach.

Niezależnie od różnic w wynikach walidacji, najistotniejszym dla klinicysty efektem oznaczenia MRD ma być odpowiednie przypisanie pacjenta do grupy ryzyka i zastosowanie najbardziej skutecznego protokołu

leczenia. W badanej grupie zwrócono uwagę zarówno na to, czy istniały różnice w stratyfikacji opartej na dotychczasowych czynnikach rokowniczych a stratyfikacji uwzględniającej MRD oraz czy i jak różnice między wynikami laboratorium lokalnego i referencyjnego mogły wpłynąć na grupę ryzyka. Stratyfikacja pacjentów do poszczególnych grup ryzyka oparta na ocenie minimalnej choroby resztkowej w niniejszej analizie wykazała, iż ponad połowa dzieci zaklasyfikowana do grupy standardowego ryzyka zmieniła w 15. dniu terapii grupę ryzyka na wyższą. W przypadku jednej pacjentki z grupy pośredniego ryzyka wymagana była kwalifikacja do grupy wysokiego ryzyka. Zaistniałe zmiany przemawiają za tym, iż obecność MRD w 15. dniu terapii może nie korelować z początkową stratyfikacją pacjentów, zwłaszcza do grupy ryzyka standardowego, a morfologiczna kwalifikacja pacjentów do grup ryzyka jest niewystarczająca.

Nie ustają wysiłki zmierzające do zwiększenia powtarzalności wyników i porównywalności pomiędzy laboratoriami. Koniecznością stało się opracowanie i wdrożenie standardów badań choroby resztkowej z jednoczesnym powołaniem do działania wyspecjalizowanej sieci laboratoriów referencyjnych przy dzie-

jących ośrodkach hematologicznych w Europie, a także w Polsce. Standaryzacja obarczona jest jednak wysokimi kosztami i pracochłonnością. Dlatego równolegle wiele ośrodków stara się znaleźć konsensus zadowalający klinicystów i diagnostów. Stąd próba prowadzenia badań MRD w ośrodkach lokalnych.

WNIOSKI

Wydaje się, że istota MRD może być wyjaśniona jako obecność białaczkowych komórek macierzystych, które przetrwały chemioterapię. Koncepcja białaczkowych komórek macierzystych tłumaczy występowanie klonów opornych i MRD. W świetle wiedzy opartej na MRD wydaje się, że należy zrewidować pojęcie remisji całkowitej u pacjentów MRD-dodatnich.

Przeprowadzone badania obecności MRD u dzieci z ALL, wykonane metodą cytometrii przepływowej w naszym ośrodku wykazały wysoką korelację z wynikami wykonanymi w ośrodku referencyjnym. Monitorowanie obecności MRD pozwala na bardziej precyzyjną stratyfikację pacjentów do grup ryzyka i stosowanej terapii oraz kwalifikację do przeszczepienia komórek krwiotwórczych i ewentualnego leczenia poprzyszczepowego.

PIŚMIENNICTWO

- Coustan-Smith E, Campana D: Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: A comparative approach to molecular testing. *Clin Haematol* 2010; 23: 347-358.
- Kerst G, Kreyenberg H, Roth C: Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005; 128: 774-782.
- Malec M, van der Velden VHJ, Bjorklund E et al.: Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004; 18: 1630-1636.
- Morley AA, Latham S, Brisco MJ et al.: Sensitive and specific measurement of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Diagn* 2009; 11: 201-210.
- Bruggemann M, Schrauder A, Raff T et al.: Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010; 24: 521-535.
- Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG: Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 52-58.
- Krejci O, van der Velden V, Bader P et al.: Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 849-851.
- Szczepański T, Orfao A, van der Velden VHJ et al.: Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001; 2: 409-417.
- Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ et al.: Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 940-949.
- Campana D, Coustan-Smith E: Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol* 2004; 112: 8-15.
- Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R et al.: Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 331-340.
- ALL IC-BFM 2002: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Hannover, 3 May 2002.
- ALL IC-BFM 2009: A randomized trial of the I-BFM-SG for the management of childhood non-B acute lymphoblastic leukemia. Kiel, 14 August 2009.
- Infant-06: International collaborative treatment protocol for infants under one year with acute lymphoblastic or biphenotypic leukemia. Rotterdam, 10-11 November 2005.
- Zhou J, Goldwasser MA, Li A et al.: Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCIALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2007; 110: 1607-1611.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH et al.: EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; 26: 1986-2010.
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S et al.: EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26: 1908-1975.
- Ratei R, Basso G, Dworzak M et al.: AIEOP-BFM-FCM-MRD-Study Group. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009; 23: 528-534.
- Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG et al.: Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010; 115: 3206-3214.