

Imunofenotypizace dětských leukemií

Kalina T.^{1, 2, 3}, Mejstříková E.^{1, 2, 3}, Vášková M.^{1, 2, 3}, Hrušák O.^{1, 2, 3}

¹Ústav imunologie, ²Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol, ³CLIP Childhood Leukemia Investigation Prague

Souhrn

Imunofenotypizace je již dnes standardní metodou v diagnostice hemato-onkologických onemocnění. V současné době zažíváme rozvoj mnohobarevné průtokové cytometrie, jak ve výzkumu, tak i v klinické diagnostice. Práce shrnuje diagnostiku a sledování akutní lymfoblastické leukemie pomocí průtokové cytometrie.

Klíčová slova: imunofenotypizace, mnohobarevná průtoková cytometrie, akutní leukemie, expresní profilování, minimální reziduální nemoc

Summary

Kalina T., Mejstříková E., Vášková M., Hrušák O.: Immunophenotyping of childhood leukaemias

Immunophenotyping is a standard method used in diagnostics of hematological malignancies. Progress in number of multicolour cytometry as well as new targets identified by genomics bring new possibilities in research and diagnostics. These aspects are summarized in the article.

Key words: immunophenotyping, multicolour flow cytometry, acute leukaemia, expression profiling, minimal residual disease

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 1, p. 20–25.

Úvod

Imunofenotypizace neboli stanovení povrchových znaků buněk pomocí průtokové cytometrie zažívá v poslední dekádě ohromný rozmach, jak po stránce dostupnosti, tak po stránce technické vyspělosti instrumentů a rozvoje technik a postupů uplatňujících se ve výzkumu i v diagnostice. To vede na jednu stranu k možnosti získání množství klinicky relevantních informací, ale zároveň je potřeba tyto informace zpracovat a klinicky správně interpretovat. Záměrem prezentovaného článku je poskytnout přehlednou informaci klinickým i laboratorním hematologům, která pomůže v uvažování během diagnostického a léčebného procesu. Výhodou průtokové cytometrie je její komplexní přístup a její schopnost dát relevantní odpověď i v situaci, kdy ošetřující lékař má více otázek než jasných odpovědí.

V hemato-onkologii je cytometrie centrální metodou, která řeší otázky diferenciálně diagnostické, typizuje leukemické buňky a má vliv na zařazení do léčebných protokolů. Zatím výzkumně se cytometrie používá ke sledování průběhu léčby (minimální reziduální nemoc) a k hledání nových znaků k predikci prognózy.

Leukemické buňky se vyvíjejí v kostní dřeni, v období plně rozvinuté choroby je nacházíme v periferní krvi nemocných, kudy recirkulují, podobně jako nezralé krevní buňky, ze kterých vycházejí. Schopnost zkoumat imunofenotyp jednotlivých buněk ve směsi buněk jakou je kostní dřeň i periferní krev představuje hlavní výhodu průtokové cytometrie.

V poslední době se do diagnostické průtokové cytometrie dostává možnost mnohobarevné analýzy. Současně přicházejí nové informace z genomiky a proteomiky, které mohou ovlivnit diagnostické možnosti imunofenotypizace.

Popis metody

Průtoková cytometrie používá jako zkoumaný materiál buněčnou suspenzi (např. kostní dřeň, periferní krev či likvor). Metoda vyžaduje čerstvý materiál (živé a neagregované buňky, obvykle do 24 hodin po odběru). K detekci jednotlivých povrchových nebo cytoplazmatických molekul používá monoklonální protilátky konjugované s fluorescenčními značkami. Suspenze buněk je po navázání fluorescenčně značených protilátek nasáta do průtokového cytometru, kde jsou buňky seřazeny do úzkého proudu kapaliny a vysokou rychlostí proudí komorou a jsou ozářeny laserovým paprskem. Laserové světlo excituje na buňkách navázané konjugáty protilátka-fluorescenční značka, které emitují světlo o vlnové délce určené typem fluorescenční značky. Současné průtokové cytometry umožňují zapojením jednoho až tří laserů excitovat 3 až 9 různých fluorescenčních značek zároveň. Pro každou buňku je zapsána kvantita každého fluorescenčního znaku a dva nefluorescenční parametry popisující velikost a granularitu buňky. V jednom vyšetření se obvykle použije simultánní kombinace znaků (v diagnostice leukemií cca 25 znaků, které jsou vyšetřeny v cca 15 oddělených alikvotech zkoumané suspenze), během sekund až minut se změní 20–200 tisíc buněk v každém alikvotu.

Ke grafické analýze těchto 5 až 11 parametrových dat se používá speciální software, kde se provádí výběr („gating“) podskupin buněk na základě přítomnosti jednotlivých znaků (obr. 1). Komplexita změřených dat narůstá se zvyšováním počtu parametrů a vhodně zvolená strategie analýzy je velmi důležitá pro interpretaci dat. Interpretaci dat musí provádět vždy zkušený odborník-

-cytometrista. Při počtech nových diagnóz v dětském věku kolem 80 ročně je vhodná koncentrace vyšetření na jedno pracoviště, což je v ČR díky spolupráci všech dětských hematologických center zajištěno.

Cytometrie a akutní lymfoblastická leukemie

Predikce rizika

Přítomnost jednotlivých molekul na blastech ALL je intenzivně zkoumána z pohledu potenciálních prediktorů úspěšnosti terapie. Velká pozornost byla věnována aberantní expresi myeloidních znaků na buňkách ALL. Jednotlivé studie našly nepříznivý nebo žádný prognostický význam exprese těchto molekul při diagnóze. Tato diskrepance byla způsobena určitými nedostatky v designu studií. Různé myeloidní znaky byly často hodnoceny společně (např. CD13 a/nebo CD33) (1, 2). Ne

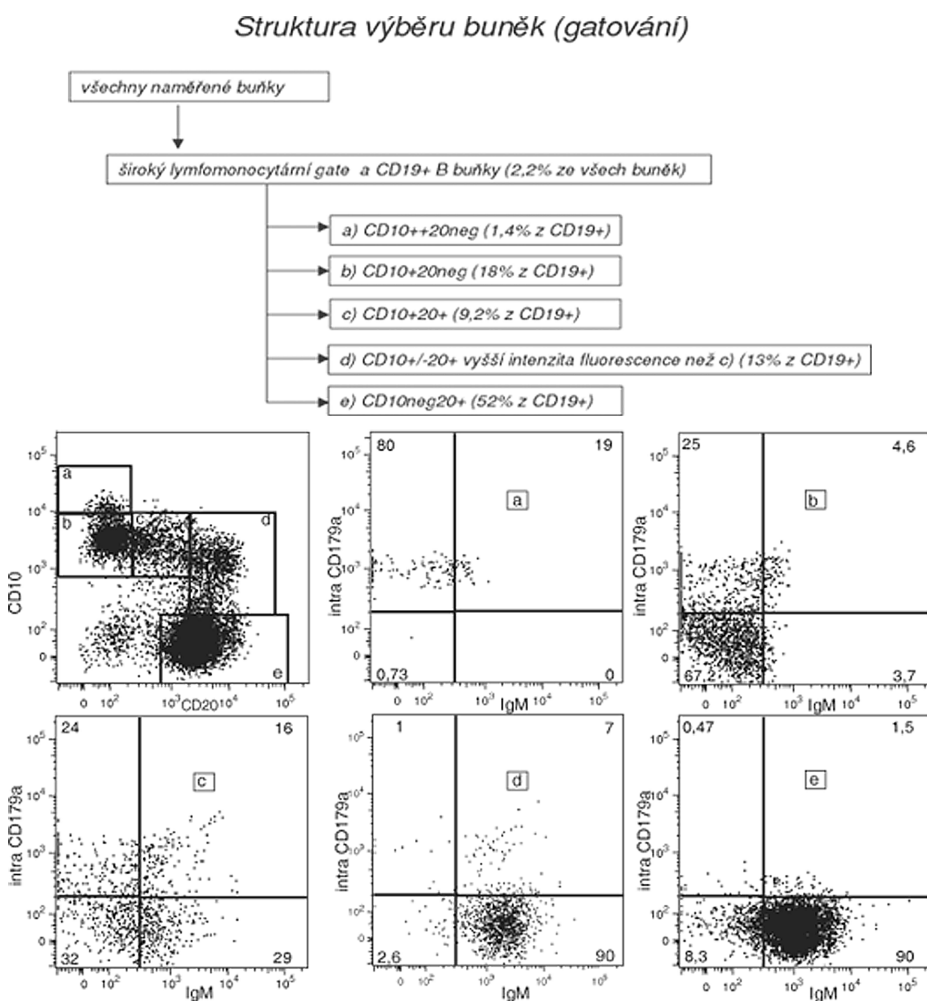
vždy byla dostatečně dlouhá doba sledování (1) nebo se hodnotili pacienti s BCP-ALL a T-ALL společně. Vzhledem k léčebnému úspěchu léčiva založeného na monoklonální protilátce anti-CD33 a cytostatika calicheamicinu u myeloidní leukemie (3) je zajímavý nález korelace CD33 pozitivitu u BCP-ALL se špatnou prognózou (4).

Imunofenotypizace při diagnóze

Cytometrie je díky rychlosti provedení vyšetření základním laboratorním vyšetřením vedoucím k diagnóze leukemie. Základní otázky, které diagnostické vyšetření odpovídá jsou:

- Jedná se o leukemii, o nemaligní proliferaci prekurzorů nebo o změnu procentuálního zastoupení subpopulací buněk např. při útlumu v kostní dřeni?
- Vychází leukemie z myeloidní nebo z lymfoidní řady?
- Jedná se o ALL z B-prekurzorů nebo z T-řady?

- Odpovědi na tyto diagnostické otázky mají význam pro potvrzení nebo vyloučení maligního onemocnění a pro zařazení pacienta do léčebného protokolu.



Obr. 1. Příklad použití mnohobarevné kombinace (CD34 FITC/CD10 PE/intra CD179a PC5/CD20 A405/IgM Dy647) znázorňující vývoj B řady v nemaligní KD. Vlevo nahoře jsou zobrazeny CD19+ buňky ze širokého lymfomonocytárního gate podle exprese CD10 a CD20 antigenu. Během vývoje B řady buňky postupně získávají antigen CD20 a ztrácí antigen CD10. Zralé B buňky, které jsou CD20^{pos} a CD10^{neg} nebo jen slabě + pak opouštějí KD. Na dalších obrázcích je pak rozvedena podle jednotlivých subpopulací exprese intracelulárního V preB receptoru (intra CD179a a povrchového IgM). Buňky postupně v průběhu svého vývoje přechodně exprimují VpreB receptor a postupně více buněk exprimuje na povrchu IgM. Osy zobrazují intenzitu fluorescence v grafu jmenovaných znaků.

B-prekurzorová akutní lymfoblastická leukemie (BCP-ALL)

Kostní dřev je primárním místem vývoje prekurzorů krevních buněk. Sebeobnova a vývoj hematopoetických kmenových buněk, vývoj prekurzorů B lymfocytů a myeloidních buněk probíhá pouze v kostní dřev, zatímco prekurzory T lymfocytů dozrávají v thymu. Imunofenotyp B-prekurzorových leukemií připomíná imunofenotyp nemaligních prekurzorů B řady. Klíčovým úkolem je tedy nalézt spolehlivé znaky, které odliší normální prekurzory od maligních buněk. Kombinace změn jako např. aberantní exprese, asynchronní exprese, hyperexprese, útlak normálních vývojových stádií či přítomnost prekurzorů v periferní krvi umožní stanovit správný diferenciálně diagnostický závěr.

Imunofenotypová klasifikace BCP-ALL podle návr-

hu skupiny EGIL (5) (tab. 1), kterou používáme v rámci BFM léčebných protokolů i v České republice rozlišuje tři – kategorie:

- proB ALL
- common ALL
- preB ALL

Tato klasifikace vychází z vývojového schématu B lymfopoézy. Ačkoliv imunofenotyp proB ALL je spojen s přestavbou MLL genu a horší prognózou, rozdíl v prognóze či biologických vlastnostech mezi common ALL a preB ALL nebyl prokázán. Zároveň se z pohledu ALL řeší i otázka hybridních leukemií, kdy jednotlivým znakům, je dáno hybridní skóre a pokud je skóre vyšší než 2, je leukemie klasifikována jako akutní hybridní leukemie (AHL – ALL/My+ nebo AML/Ly+).

V následujícím přehledu diskutujeme znaky používané v diagnostice ALL (tab. 2), více informací o jednotlivých CD znacích, pokud není uvedena reference, lze dále získat na webové stránce HLDA (Human Cell Differentiation Molecules Antigens Workshop).

Liniově specifické znaky pro B-lymfocytární řadu

Pro zařazení vyžadujeme přítomnost alespoň dvou z následujících tří znaků:

CD19

Znak definující příslušnost k B řadě je především znak CD19, který se objevuje záhy po liniovém rozhodnutí společného lymfoidního prekursoru směrem k B řadě, ve kterém hraje hlavní úlohu transkripční faktor Pax (Nutt, 1998). Tento znak zůstává na povrchu B buněk ve všech stádiích, ztrácí se až na zralé plazmatické buňce. Hraje nepostradatelnou roli jako koreceptor B-buněčného receptoru ve fyziologickém vývoji, aktivaci a diferenciaci B buněk.

CD79a

CD79a (Ig-alfa) je signální molekula, je rovněž B-liniově specifickým znakem, jeho cytoplazmatická exprese dokonce předchází znak CD19 a je první specifickou molekulou oddělující B-prekursor od společného lymfoidního prekursoru (7).

CD22

Tab. 1. Přehled klasifikace podle návrhu skupiny EGIL.

Kategorie	Kritéria	Podtřída	Kritéria
B prekurzorová	<ul style="list-style-type: none"> • 2 nebo 3 z následujících: CD19^{poz} (intra)CD79a^{poz} and CD22^{poz} • CD3^{neg} • intraCD3^{neg} • κ^{neg} a λ^{neg} 	proB ALL	CD10 ^{neg} CD20 ^{neg}
		cALL	CD10 ^{poz} intraIgM ^{neg}
		preB ALL	intraIgM ^{poz}
zralá B	<ul style="list-style-type: none"> • 2 nebo 3 z následujících: CD19^{poz}, (intra)CD79a^{poz} and CD22^{poz} • CD3^{neg} • intraCD3^{neg} • κ^{poz} nebo λ^{poz} 	<i>Bez další subklasifikace</i>	
T-ALL	<ul style="list-style-type: none"> • (intra)CD3^{poz} • CD7^{poz} 	proT ALL preT ALL intermediární T- ALL zralá T-ALL TCRαβ ^{poz} T-ALL TCRγδ ^{poz} T-ALL	CD2 ^{neg} CD5 ^{neg} CD8 ^{neg} CD2 ^{poz} a/nebo CD5 ^{poz} a/nebo CD8 ^{poz} CD1a ^{poz} CD3 ^{poz} CD1a ^{neg} TCRαβ ^{poz} TCRγδ ^{poz}

Tab. 2. Panely protilátek, které používáme při diagnostice akutní leukemie v naší laboratoři.

základní panel	T-ALL	BCP-ALL	AML
i-MPO/i-CD79acy/i-3	CD34/38/7	CD10/33/19	Syto-16/33/45/34
i-TdT/mCD7/m3/i-3	i-CD22	CD65/2/HLADR	CD19/56/33/34
i-CD22	CD1a (PE)	CD10/13/19	CD2/7/33/34
CD45/14	TcRγδ/TcRαβ	CD34/38/19	HLA DR/38/33
CD66c/19	CD7/NG2	CD79a	i-CD13
CD4/8/3	CD64/13 (pokud je AHL skóre2)	CD22/24	CD33/13
CD20/10/19/34	Je-li TcRγδ ^{poz} CD64 (pokud je AHL skóre 2)	CD19/NG2	CD41
CD99/7/5/3	resp. TcRαβ ^{poz} , je AHL skóre 2)	i-IgM/mCD19	CD42b
CD15/117/33/34	nastaví se Vδ resp. Vβ panel	κ/CD19	CD61
stanovení DNA cyklu		λ/CD19	glykoforin A (CD235a)
		mIgM	CD65/33
			CD33/NG2

Vysvětlivky:	m	povrchové značení
	i	intracelulární značení
	AHL skóre	viz text
	Vδ panel	protilátky proti jednotlivým typům Vδ řetězců
	Vβ panel	protilátky proti jednotlivým Vβ řetězcům
	Syto-16	fluorescenční barvička, značící buňky obsahující DNA, pomáhá k odlišení drti

CD22 je specifický znak pro B lymfocytární řadu, v časných fázích vývoje je exprimován jen cytoplazmaticky, k povrchové expresi dochází v normálním vývoji v pozdních stádiích spolu s IgD a CD21 (8, 9). U leukemií z B řady se vyskytuje ve 3/4 případech (obvykle cALL a preB ALL). Molekula je příbuzná molekule CD33. Testuje se terapeutický účinek protilátky proti CD22 konjugované s cytostatikem calicheamicinem u různých CD22^{pos} malignit (10).

Vývojová stadia B-prekursorů

Další znaky popisují v normální kostní dřeni vývoj (CD10, CD34, CD20, cytoplazmatické TdT, povrchové i cytoplazmatické IgM).

CD10

Znak CD10, tzv. CALLA antigen, byl popsán jako typický znak pro „common

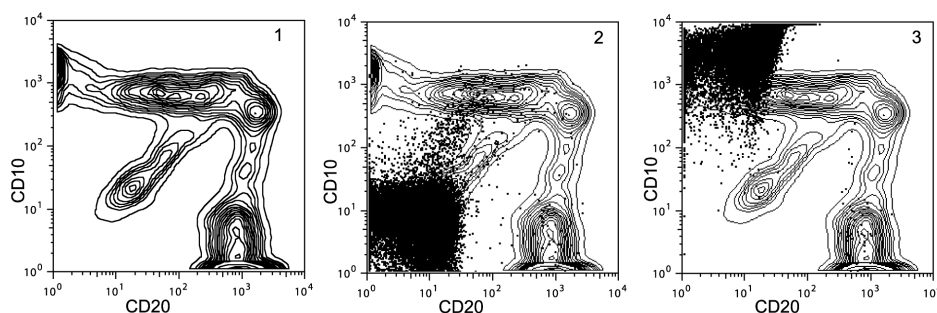
ALL“ (11–14). B lymfocyty v periferní krvi tento znak nemají, na rozdíl od většiny B-prekurzorů v kostní dřeni. Leukemické blasty jej nesou ve více než 95 %, velmi často ve vysokých množstvích (tzv. hyperexprese CD10). V periferní krvi jsou B buňky většinou CD10 negativní, jen malá subpopulace je CD10 slabě pozitivní (tzv. transitional B buňky). CD10 hyperexprese v periferní krvi je tedy specifická pro leukemii (obr. 2). Není liniově specifický, vyskytuje se také u granulocytů (15) a ve stadiu kortikálního thymocyty i v rámci vývoje T řady. Část T-ALL je rovněž pozitivní, intenzita je ale zpravidla nižší než u BCP-ALL (16).

CD34

Znak časných progenitorů a kmenových buněk. Není liniově specifický.

Imunoglobulin M (IgM) těžký řetězec

V normální B lymfopoéze je po úspěšné VDJ rekombinaci nejprve exprimován těžký řetězec IgM cytoplazmaticky, poté je spolu s VpreB molekulou vystaven na



Obr. 2. Obrázek vlevo ukazuje normální vývoj B řady podle exprese antigenu CD20 a CD10, uprostřed na pozadí normální KD (kontury) je zobrazena CD10 negativní proB ALL a vpravo cALL, kde u většiny blastů je hyperexprese CD10. Všechny grafy jsou z gatí CD19^{pos} buněk s odpovídajícími optickými vlastnostmi.

povrch, což spouští signalizaci umožňující proliferaci prekurzoru s úspěšně přestavěným antigenním receptorem. Klasifikace leukemií používá detekci cytoplazmatického IgM jako marker pro preB ALL, povrchové IgM definuje zralou B-leukemii, která je nejméně obvyklá a liší se prognózou i léčbou.

CD20

se objevuje zhruba paralelně s dokončením přestavby těžkého řetězce a s jeho cytoplazmatickou expresí. U leukemií je často přítomen, někdy asynchronně s hyperexpresí CD10. Zpravidla je pozitivní jen na subpopulaci blastů, což limituje eventuální využití specifické anti-CD20 léčby u BCP-ALL. Zralá B-ALL je typicky vysoce pozitivní.

Terminální deoxy-nukleotidyl transferáza (TdT)

Cytoplazmatická TdT je typicky přítomna u leukemických buněk, v normální kostní dřeni se vyskytuje jen u malé subpopulace prekurzorů (především CD19+34+10+ až ++), lze využít pro odlišení maligní a nemaligní B lymfoproliferace.

CD58

Je znak nespecifický pro B řadu, ale jeho vysoká exprese spolu s vysokou expresí CD10 je charakteristická pro

některé leukemie a lze proto využít pro sledování MRN (17).

Aberantní znaky u B-lymfocytární řady

Znaky omezené v normálním vývoji pro jiné řady, ale vyskytující se často na leukemických buňkách (18).

CD66c (KOR-SA3544 antigen)

Aktivační znak granulocytů, u nemaligních B prekurzorů se nevyskytuje, proto jej můžeme na B prekurzorech považovat za znak malignity (6).

CD33, CD13

Znak monocytů a granulocytů, aberantně se vyskytuje na BCP-ALL.

CD15, CD65

Znak granulocytů, aberantně se vyskytuje na BCP-ALL.

NG2

Molekula chondroitin sulfátu, ve fyziologické hematopoéze tato molekula není exprimována. NG2 molekula se aberantně vyskytuje u leukemií (ALL i AML) s přestavbou genu MLL (obr. 3).

T-akutní lymfoblastická leukemie (T-ALL)

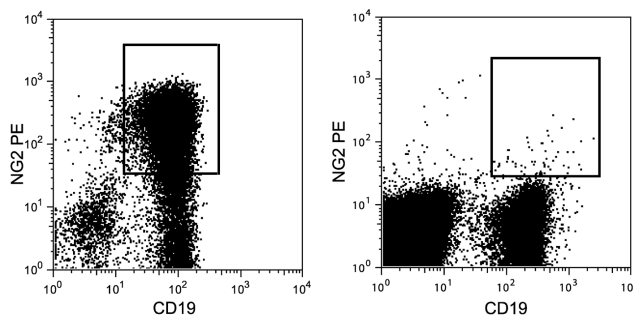
Primárním místem T lymfopoézy je thymus, leukemické buňky však cirkulují v periferní krvi a kostní dřeni. Přítomnost nezralých T lymfocytů v periferní krvi či kostní dřeni tedy ukazuje na diagnózu T-ALL. Typickou známkou malignity u T-ALL je koexprese CD7

a CD5 na CD3 negativních buňkách nebo koexprese CD4 a CD8 v periferní krvi nebo kostní dřeni.

Liniově specifické znaky pro T-lymfocytární řadu

CD7

CD7 je glykoprotein exprimovaný na zralých T lymfocytech, NK buňkách a thymocytech, ale i na některých nediferencovaných progenitorech. Je to senzitivní mar-



Obr. 3. Aberantní exprese NG2 na BCP ALL blastech u pacientky kojeneckou ALL s prokázaným fúzním genem MLL/AF4 (vlevo). Vpravo obrázek u téže pacientky 2 roky od diagnózy onemocnění v kompletní remisi a negativním fúzním genem MLL/AF4. Je zřetelné nenulové pozadí v regenerující KD, které limituje využití při detekci MRN.

ker T-ALL, ale není specifický, jelikož jej exprimují také některé typy myeloidních leukemií. Malá část nezralých progenitorů ve fyziologické KD je CD7+33+.

CD3

CD3 je součástí komplexu T-buněčného receptoru (TCR). CD3 je exprimován v cytoplasmě časnými thymocyty. Cytoplazmatická exprese CD3 je základním znakem, který zařazuje buňky k T řadě.

CD5 a CD2

Znaky CD2 a CD5 jsou exprimovány na thymocytech a zralých T lymfocytech. CD5 také definuje podskupinu B lymfocytů (tzv. T independentní B1 lymfocyty). CD2 nalézáme také na NK buňkách. Oba antigeny jsou exprimovány na více než 90 % T-ALL a používáme je jako podpůrné znaky. CD2 je aberantně exprimována u části AML, typicky u AML M3v (6).

Znaky definující vývojová stadia a funkční podskupiny

CD4

Znak definující „T-helper“ podskupinu T lymfocytů v periferní krvi, zároveň je exprimován také monocyty. V thymu se objevuje nejprve u dvojité pozitivních thymocytů (spolu s CD8). Je koreceptorem komplexu CD3-TCR. Bývá pozitivní u AML s monocytárním vyvrávnáním.

CD8

Definuje cytotoxické T lymfocyty (antigen specifické zabíječe). V thymu se objevuje nejprve u dvojité pozitivních thymocytů (spolu s CD4). Je koreceptorem komplexu CD3-TCR.

TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$

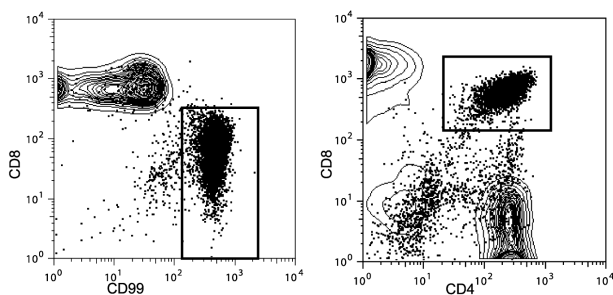
T-buněčný receptor, je základním nástrojem T buněk při specifickém rozeznávání antigenů.

CD1a

Je znak exprimovaný nezralými T lymfocyty v thymu. Definuje intermediární T-ALL (19).

CD99

CD99 je exprimováno na řadě hematopoetických buněk i progenitorů, v případě thymocytů a T-ALL je exprese kvantitativně zvýšená (20).



Obr. 4. Srovnání imunofenotypu nemaligních T lymfocytů (v konturách) a intermediární T-ALL (zvýrazněná populace obdélníkem). Na levém obrázku (kombinace CD99/7/5/3, gate CD7^{poz} bez hyperexprese CD5^{poz} pro kontury a CD7⁺⁺5^{slabě} poz CD99⁺⁺) typicky vysoká exprese CD99 a nízká až negativní povrchová CD3. Na pravém obrázku koexprese CD4 a CD8 z kombinace CD4/8/3.

Sledování průběhu léčby

Současný přístup k sestavování léčebných protokolů ALL používá strategii terapie šité na míru rizika selhání léčby. Jedním z parametrů je odpověď na léčbu. Již přes dvě dekády se hodnotí rychlost redukce počtu blastů při prednisonové předfázi. Nyní se zavádí v některých protokolech detekce minimální reziduální nemoci (MRN) v průběhu terapie jako kritérium pro přeřazení mezi rizikovými skupinami. K detekci MRN se používá metoda kvantitativní PCR a zatím pouze výzkumně také průtoková cytometrie. Ne docela vyřešeným problémem aplikace cytometrie ve sledování MRN je značná podobnost leukemických buněk a regenerujících B-lymfocytů, které v některých časových bodech terapie tvoří významné pozadí. Pro klinicky použitelné měření MRN je třeba detekovat leukemickou buňku na pozadí 1 000 až 10 000 buněk. Zlepšení specifity očekáváme od zavedení mnohobarevných protokolů (více než 4 fluorescenční znaky).

Nové prediktory

Studie expresního profilování (EP, expression profiling, gene chips, microarrays) přinášejí data o expresi desetitisíců genů. Jejich vyhodnocením je možné hledat skupiny (například ALL pacientů), které mají podobné expresní vzorce („expression patterns“), tzn. je pro ně charakteristická exprese některých genů, nebo hledat geny, které jsou typické pro jednotlivé skupiny (a vztahovat je k biologii, leukemogenezi a prognóze) (21). Odhady počtu genů, které jsou klíčové pro identifikaci určité skupiny pacientů (např. genotypové a rizikové), se liší. Někteří autoři předpokládají, že genů určujících např. genotypové poskupiny nemusí být více než 20 (např. Downing (22)). Takový počet genů, či odpovídajících proteinů je potom možné studovat metodami molekulární biologie (RT-PCR) či průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie má výhodu simultánního stanovení více molekul na jedné buňce a relativní nenáročnosti na kvalitu, množství vzorku a na provedení. V naší studii využíváme dat z EP k nalezení těchto klíčových molekul. Podařilo se nám nalézt dvě molekuly (CD44 a CD27) předpovídající přítomnost fúzního genu TEL/AML1 (23). Chen et al. (17) navrhli na základě dat z EP detekci molekuly CD58 při vyšetřování minimální reziduální nemoci. Stále se také intenzivně pracuje na standardizaci EP pro diagnostické účely, ale jako racionálnější se jeví využití této metody pro výzkumné účely a pro nalezení nových diagnostických a prognostických znaků.

Závěr

Vhodné a metodicky dobře provedené použití průtokové cytometrie má významnou roli při diagnostice a diferenciální diagnostice leukemie. Imunofenotypizací odlišíme nemaligní prekurzory od leukemických buněk v aspirátu kostní dřeně či periferní krve. Na základě liniově specifické

kých znaků stanovíme typ leukemických buněk. Další znaky definují stupeň zralosti a můžou předpovědět i riziko selhání terapie. Mnohobarevná průtoková cytometrie je výzkumně používána k vyhledávání a stanovení prediktivní hodnoty dalších molekul a ke sledování MRN.

Seznam použitých zkratk

KD	kostní dřev
BCP	B cell precursor
MRN	minimální reziduální nemoc
TCR	T cell receptor
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
MLL	mixed lineage leukemia

Práce byla podpořena grantem IGA MZ CR 7430-3.

Poděkování

Výsledky jsou umožněny spoluprací všech center v rámci Pracovní skupiny pro dětskou hematologii (B. Blažek, Z. Černá, Y. Jabali, V. Mihál, D. Procházková, J. Starý, J. Štěrba, J. Hak, K. Toušová). Laborantkám a laborantům Ústavu imunologie a Kliniky dětské hematologie a onkologie za pomoc při získávání a analýze dat (J. Ridošková, K. Pospíšilová, L. Gondorčinová, D. Thürner, P. Semerák, K. Mužiková, L. Řezníčková, K. Krejčíková, A. Brabencová).

Literatura

1. Uckun FM, Sather HN, Gaynon PS, Arthur DC, Trigg ME, Tubergen DG, et al. Clinical Features and Treatment Outcome of Children With Myeloid Antigen Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Cancer Group. *Blood* 1997; 90(1): 28-35.
2. Putti MC, Rondelli R, Cocito MG, Arico M, Sainati L, Conter V, et al. Expression of Myeloid Markers Lacks Prognostic Impact in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia: Italian Experience in AIEOP-ALL 88-91 Studies. *Blood* 1998; 92(3): 795-801.
3. Giles F, Estey E, O'Brien S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 2003; 98(10): 2095-2104.
4. Mejstrikova E, Kalina T, Trka J, Sary J, Hrusak O. Correlation of CD33 with poorer prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy. *Leukemia* 2005; 19(6):1092-1094.
5. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9(10): 1783-1786.
6. Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002; 16(7): 1233-1258.
7. Dworzak MN, Fritsch G, Froschl G, Printz D, Gadner H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* 1998; 92(9): 3203-3209.
8. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70(5): 1316-1324.
9. Coleman M, Goldenberg DM, Siegel AB, Ketas JC, Ashe M, Fiore JM, et al. Epratuzumab: Targeting B-Cell Malignancies through CD22. *Clin Cancer Res* 2003; 9(10): 3991-3994.
10. DiJoseph JF, Armellino DC, Boghaert ER, Khandke K, Dougher MM, Sridharan L, et al. Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood* 2004; 103(5):1807-1814.
11. Shipp MA, Stefano GB, Switzer SN, Griffin JD, Reinherz EL. CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood* 1991; 78(7): 1834-1841.
12. Shipp MA, Stefano GB, D'Adamio L, Switzer SN, Howard FD, Sinisterra J, et al. Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. *Nature* 1990; 347(6291): 394-396.
13. Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988; 168(4): 1247-1253.
14. Brown G, Greaves MF, Lister TA, Rapson N, Papamichael M. Expression of human T and B lymphocyte cell-surface markers on leukaemic cells. *Lancet* 1974; 2(7883): 753-755.
15. Bene MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett* 2005; 98(1): 9-21.
16. Barcena A, Muench MO, Galy AH, Cupp J, Roncarolo MG, Phillips JH, et al. Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid-cell development. *Blood* 1993; 82(11): 3401-3414.
17. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97(7): 2115-2120.
18. Kalina T, Vaskova M, Mejstrikova E, Madzo J, Trka J, Sary J, et al. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer* 2005; 5(1): 38.
19. Res P, Blom B, Hori T, Weijer K, Spits H. Downregulation of CD1 Marks Acquisition of Functional Maturation of Human Thymocytes and Defines a Control Point in Late Stages of Human T Cell Development. *J Exp Med* 1997; 185(1): 141-152.
20. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Zen LD, Gaipa G, Ratei R, et al. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2004; 18(4): 703-708.
21. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1(2): 133-143.
22. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003:102-131.
23. Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, Martinkova P, Omelka M, Trka J, et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005.

MUDr. Tomáš Kalina, Ph.D.

Klinika dětské hematologie a onkologie LF2UK a FN Motol
CLIP-Childhood leukemia Investigation Pratur
V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

Korespondenční autor:

MUDr. Ester Mejstříková

Klinika dětské hematologie a onkologie LF2 UK a FN Motol
V Úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: ester.mejstrikova@lfmotol.cuni.cz

Dodáno: 5. 1. 2006

Přijato: 23. 1. 2006