

NAJNOVŠIE PRÍSTUPY V DIAGNOSTIKE LEUKÉMIÍ POMOCOU IMUNOFENOTYPIZÁCIE A SLEDOVANÍ MINIMÁLNEJ REZIDUÁLNEJ CHOROBY

MODERN TRENDS IN LEUKEMIA DIAGNOSIS BY IMMUNOPHENOTYPING AND MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

TOMOVÁ A., BABUŠIKOVÁ O.

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ONKOLÓGIE SAV, BRATISLAVA, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

Súhrn: Leukémie tvoria heterogénnu skupinu ochorení a postihujú deti aj dospelých. Diagnostiku vo veľkej miere uľahčuje prietoková cytometria, avšak relaps ochorenia zostáva veľkým problémom aj v súčasnosti. Stanovenie minimálnej reziduálnej choroby a hľadanie nových terapeutických stratégií zákonite musí byť založené na dôkladnom poznaní biologických vlastností jednotlivých typov buniek. V tomto bode má veľký význam práve prietoková cytometria s možnosťami viacfarebného značenia rôznych znakov súčasne, DNA analýzy, alebo kombinácie sortovania/separácie buniek na podklade imunofenotypu s následnou komplexnou analýzou jednotlivých bunkových populácií.

Kľúčové slová: akútna a chronická leukémia, minimálna reziduálna choroba, prietoková cytometria, sortovanie buniek

Summary: Leukemias create/represent a heterogenous group of diseases affecting both children and adults. Diagnosis is to a large extent facilitated by flow cytometry but the relapse of the disease remains a big problem also at present. Detection of minimal residual disease and finding new therapeutic strategies must be regularly based on consistent knowledge of biological characteristics of individual cell types. In this point, the great significance belongs to flow cytometry with the possibilities of multicolor staining of different markers simultaneously, DNA analysis, or combination of cell sorting on the basis of immunophenotype followed by the complete analysis of individual cell populations.

Key words: acute and chronic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, cell sorting

Fyziologický hematopoetický vývoj je špecificky regulovaný proces, ktorý zahŕňa sebaobnovu kmeňových buniek, expanziu triedovo špecifickej progenitorovej populácie a dozrievanie do konečných krvných elementov (1). Pochopenie proliferácie a diferenciácie buniek sa už nezaobíde bez znalostí ich imunofenotypového profilu, ktorý je tvorený mozaikou membránových i vnútrobunkových molekúl. V poslednom období prebehla ich rozsiahla charakterizácia z hľadiska genetickej determinácie, chemickej štruktúry a funkcie; získané poznatky sa vo veľkej miere využívajú aj v súvislosti s diagnostikou leukémií a lymfómov (2, 31, 32).

Aplikácia metódy prietokovej cytometrie v diagnostike leukémií

Prínosom použitia monoklonálnych protilátok a prietokovej cytometrie je určenie triedy akútneho alebo chronického leukémie, najmä v prípadoch nejednoznačného morfológického nálezu, stanovenie prognózy na podklade imunofenotypu a využitie v detekcii minimálnej reziduálnej choroby. Najskôr používanou bola jednofarebná imunofluorescencia, prostredníctvom ktorej sa znaky analyzovali jednotlivo. Porovnávacia analýza imunofenotypových charakteristík leukemických buniek a zdravých buniek je dôležitá pre exaktné odlíšenie zdravých buniek od nádorových (6, 36). V značnej miere používaná jednofarebná imunofluorescenčná analýza však neumožňuje presnú detekciu aberantných populácií najmä z toho hľadiska, že leukemické bunky exprimujú prevažne rovnaké znaky ako zdravé bunky (42). Líšia sa však v určitých charakteristikách (intenzita expresie, počet molekúl daného znaku) (33, 34, 41). Vývoj monoklonálnych protilátok spojených s rozličnými typmi fluorochrómov umožnil použitie a analýzu kvantitatívnych a kvalitatívnych zmien viacerých znakov naraz, čo presnejšie definuje fenotyp jedinej bunky (3, 37). Preto sa v súčasnosti pristupuje k definícii populácií prítomných v zdravej kostnej dreni a periférnej krvi pomocou troj-

a štvorfarebnéj analýzy, a k štandardizácii týchto techník vo viacerých laboratóriách (4, 5, 7).

Viacfarebná imunofluorescenčná analýza populácií zdravej kostnej drene a periférnej krvi

Použitím kombinácií priamo značených protilátok s následnou lýzou erytrocytov vo vzorke a citlivého merania sa získali detailné informácie o bunkových subpopuláciách prítomných v zdravej kostnej dreni a periférnej krvi aj vo veľmi nízkych frekvenciách, ktoré predtým nebolo možné detekovať klasickými metódami. Zvolené kombinácie protilátok proti povrchovým a vnútrobunkovým znakom a techniky značenia vychádzajú z doteraz získaných poznatkov o imunofenotype rôznych populácií leukocyto (4, 7, 8).

Pomocou prietokovo-cytometrickej analýzy sa podarilo identifikovať základné imunologické podtypy včasných progenitorov exprimujúcich znaky asociované s B-bunkovou triedou v kostnej dreni. Na základe použitia piatich trojkombinácií znakov (CD10/CD20/CD19, CD34/CD38/CD19, CD34/CD22/CD19, CD19/CD34/CD45, TdT/CD10/CD19) sa identifikovali dve subpopulácie CD19⁺ progenitorov, z ktorých jedna exprimovala znaky CD34⁺/CD22⁺/CD19⁻ a druhá TdT⁺/CD10⁺/CD19⁻. Tieto subpopulácie však predstavujú veľmi malé percento (0,11±0,09% a 0,04±0,05%) z celkového počtu buniek v kostnej dreni. Väčšina buniek exprimovala znak CD19 a podľa intenzity expresie (bright = silná intenzita expresie, dim = slabá intenzita expresie) ďalších znakov sa charakterizovali tri nasledovné podskupiny: veľmi nezrelé B-bunky, s imunofenotypom CD10^{bright}, CD34, TdT, CD19^{dim}, CD22^{dim}, CD38^{bright}, CD45^{-dim} a CD20⁻; bunky prechodného B-bunkového štádia dozrievania charakterizované imunofenotypom CD19, CD10, CD22, CD45, CD34⁻, TdT⁻, CD38^{bright}, CD22^{dim}, CD20^{dim}; zrelšiu B-bunkovú populáciu definovali znaky CD19⁺, CD22^{bright}, CD45^{bright}, CD20^{bright}, CD38^{dim}, CD10⁻, CD34⁻, TdT⁻. Prvé dve subpo-

pulácie prevládajú u detí do 15 rokov (v KD majú až 70% zastúpenie), počet buniek v tretej subpopulácii je vzhľadom k veku relatívne stabilný (4).

Podobná štúdia bola zameraná na charakterizáciu buniek s T-asociovanými znakmi, nachádzajúcimi sa v zdravej kostnej dreni. Opäť bolo použitých päť kombinácií znakov (CD7/CD5/CD3, CD7/CD4/CD8, CD7/CD2/CD3, CD7/CD38/CD34 a TdT/CD7/cCD3). V zdravej KD sa nezistili žiadne populácie buniek, ktoré by neexprimovali znak CD7, prípadne by jeho expresia bola slabá, taktiež ani populácie s koexpresiou znakov CD34+CD7+ a TdT+CD7+cCD3+. Preto sa analyzovali ostatné znaky na populácii CD7+ buniek. Dôležitým poznatkom je, že v zdravej kostnej dreni sa nenachádzajú populácie buniek, ktoré silne exprimujú znaky CD4+ a CD8+. V analyzovaných vzorkách KD sa sledovala aj možnosť koexpresie znakov CD19, CD13 a CD33 v zdravej populácii CD7+ buniek, pretože u leukémií T-bunkového typu sa ich expresia vyskytuje nezriedka (6, 40). Žiadna koexpresia CD7+CD19+ sa nezistila vo frekvencii vyššej než 10^{-4} , avšak bunky CD7+CD13+ a CD7+CD33+ boli detekované v 10% vzoriek KD vo frekvencii vyššej ako 10^{-4} ($0,06 \pm 0,03\%$ a $0,05 \pm 0,04\%$) (7).

Vo vzorkách zdravej periférnej krvi sa analyzovali subpopulácie lymfocytov štvorfarebným značením s rôznymi CD markermi. Najviac zastúpenými populáciami boli lymfocyty s fenotypom CD3+CD8+CD2+CD4- (25%), CD3+CD8-CD2+CD4+ (42%), CD3-CD8+CD2+CD4- (4%), CD3-CD8+CD2-CD4- (1%), tieto populácie CD3-CD8+ exprimovali znaky CD16+CD56+, lymfocyty negatívne pre všetky T-znaky boli CD19+ (11%) (8).

Na základe týchto poznatkov o fenotypových vlastnostiach buniek zdravých populácií možno vymedziť tzv. „empty spaces“ (oblasti na bodových histogramoch – „dot plots“, kde sa zdravé bunky KD nenachádzajú, ale malígne bunky sú lokalizované v týchto oblastiach kvôli ich aberantnej antigénnej expresii) (5). Takýmto spôsobom prichádza do úvahy definícia ektopického pôvodu leukémie, ako je to často pozorované u akútnej leukémie pochádzajúcej z T-buniek, predovšetkým z týmsu.

Podobná charakterizácia myeloidných bunkových subpopulácií v zdravej KD alebo PK ešte nebola publikovaná, i keď sú známe práce s použitím multiparametrovej analýzy a trojfarebného značenia na definovanie aberantných fenotypov a detekciu MRD u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (9, 10, 35).

Detekcia MRD a jej prognostický význam pri viacfarebnej analýze

Detekcia malígnych buniek v „empty spaces“ má uplatnenie nielen na začiatku ochorenia pri stanovení diagnózy, ale aj v priebehu ochorenia na stanovenie efektivity liečby pri eliminácii leukemického klonu a dôkaze MRD (5, 7).

Detekcia MRD pomocou imunofenotypizácie s vysokou citlivosťou (10^{-4} až 10^{-5} pri použití špecifických s leukémiou-asociovaných imunofenotypových vlastností) umožňuje takto odlíšiť aj skupiny pacientov s vyšším rizikom relapsu. Na podklade hodnotenia minimálnej zvyškovej choroby po konsolidáčnej liečbe je možné rozdeliť pacientov do dvoch skupín. Deliacou hranicou je počet $3,5 \times 10^{-4}$ reziduálnych leukemických buniek a u pacientov s nižším počtom reziduálnych buniek sa zistila menšia pravdepodobnosť relapsu, priaznivejší cytogenetický nález a dlhodobejšie prežívanie (9). K podobným záverom možno dospieť pri analýze hladiny zvyškových buniek s aberantným fenotypom už po indukčnej liečbe u pacientov s AML. U pacientov zaradených do skupiny s najvyšším rizikom sa zistila MRD vo väčšej frekvencii než 10^{-2} aberantných buniek a výskyt relapsu $85 \pm 9\%$ v priebehu 3 rokov. Skupina pacientov v strednej rizikovej skupine mala počet zvyškových buniek 10^{-2} až 10^{-3} a riziko relapsu $45 \pm 8\%$. Pacienti s obsahom aberantných buniek v menšom počte než 10^{-3}

boli zaradení do skupiny s najnižším rizikom návratu ochorenia, $14 \pm 6\%$. U tých, ktorí mali počet aberantných buniek menší ako 10^{-4} sa v priebehu 3 rokov nevyskytol relaps (10).

Definícia vlastností buniek spojených s procesom vzniku leukémie

Mechanizmy zodpovedné za nekontrolovateľnú expanziu leukemických buniek sú úzko viazané s regulačnými mechanizmami zdravých hematopoetických buniek, najmä s reguláciou bunkového cyklu, proliferáciou a prežívaním buniek. Je všeobecne akceptovaný fakt, že leukemické bunky proliferujú vďaka zmenám v aktivácii proto-onkogénov a/alebo inaktivácii nádorových supresorových génov. Traduje sa názor, že leukemický fenotyp je odrazom úrovne hematopoetickej hierarchie, v ktorej sa genetický defekt vyskytuje (43). Najnovšie práce dokazujú, že genetická udalosť spúšťajúca leukémiu sa vyskytuje na úrovni kmeňovej bunky, bez ohľadu na fenotyp celkovej populácie leukemických blastov. Tento genetický defekt pravdepodobne sám determinuje diferenciačný program postihnutého bunkového klonu (11).

Sortovanie leukemických buniek prietokovým cytometrom

Pri imunofenotypizácii patologických buniek v PK a KD pacienta možno analyzovať stupeň heterogenity v abnormálnej bunkovej populácii, spôsobený existenciou rôznych patologických klonov alebo prítomnosťou buniek v rozličných dozrievacích štádiách (12). Prietoková cytometria už v súčasnosti poskytuje viac ako len charakterizovanie imunofenotypu buniek. Separovanie bunkových populácií s následnou analýzou buniek fluorescenčnou in-situ hybridizáciou (FISH) alebo simultánnou analýzou fenotypu a obsahu DNA majú veľkú výpovednú hodnotu o vlastnostiach týchto buniek (12, 13, 14).

Separovanie/sortovanie buniek prietokovou cytometriou umožňuje získať suspenziu buniek, ktorá obsahuje viac ako 95% buniek s požadovaným fenotypom. Princípom je rozdelenie prúdu unášajúceho bunky kmitaním piezoelektrického kryštálu na jednotlivé kvapky, ktoré obsahujú len jednu bunku. Bunky sú potom vychyľované elektrickým nábojom do jednotlivých skúmaviek podľa zvolených parametrov (15).

Veľa prác sa zaoberá detekciou leukemických buniek v subpopulácii hematopoetických progenitorových buniek kostnej drene alebo periférnej krvi, predovšetkým na základe špecifických imunologických znakov a ich kombinácií a charakteristických chromozomálnych odchýlok.

Sledovaním pacientov v chronickej fáze CML sa zistilo, že v periférnej krvi sa u nich nachádza zvýšené množstvo progenitorových buniek, ktoré sa od seba fenotypovo veľmi neodlišovali. Pri ich skúmaní zistili prítomnosť ako normálnych (Ph⁻), tak aj Ph⁺ progenitorov (16). Paralelné štúdie buniek CML ukázali, že mnohé leukemické kmeňové a progenitorové bunky sa delia, je zaujímavé, že u všetkých sledovaných pacientov aj bunky v G₀ fáze bunkového cyklu obsahovali BCR-ABL mRNA (17).

Podobne ako u CML aj u AML boli detekované leukemické a zdravé progenitorové bunky. Ich fenotyp je veľmi podobný z hľadiska expresie CD34 a nízkej expresie CD38, môžu sa líšiť stratou expresie Thy-1 (18). K úplne opačným záverom dospeli autori v inej práci, ktorí demonštrovali, že prípady so silnou expresiou CD34 na leukemických kľudových kmeňových bunkách môžu reprezentovať neoplastickú dysreguláciu medzi CD34 negativitou a schopnosťou pre rýchlu elimináciu (eflux) lipofilných molekúl (19). Separovanie nezrelých buniek AML periférnej krvi pacientov preukázalo, že progenitory schopné obnovovania exprimujú fenotyp CD34+CD71+HLA-DR-CD38⁻, teda podobne ako zdravé progenitory. Výsledky naznačili, že u týchto pacientov sa leukemická transformácia mohla vyskytnúť v primitívnych bunkách, ktoré exprimujú CD34 s následnou klonálnou evolúciou, ale napriek tomu si zachovali schopnosť proliferovať a obnoviť hematopoézu NOD/SCID myši (20).

Zistilo sa, že pacienti s AML a translokáciou t(8;21) majú dokázateľne aj dva mesiace po dosiahnutí klinickej remisie prítomných až 80% CD34⁺ buniek s touto translokáciou (13). Demonštrovalo sa tiež, že t(8;21)-špecifická AML1/ETO mRNA je exprimovaná v zreých monocytoch a B-bunkách, ako aj HSC (hematopoietic stem cell), lymfoidných progenitoroch a myeloidných progenitoroch aj počas remisie pacienta, takže t(8;21)+ HSC v remisii sú schopné diferencovať do zreých krvných buniek *in vivo* (21).

Na podklade predchádzajúcich štúdií ktoré ukázali, že viac ako 95% detísky B-ALL exprimuje znak CD38, sa predpokladalo, že je možné izolovať v KD detí s B-ALL normálne CD34⁺CD38⁻ progenitory v čase remisie. CD34⁺ bunky boli separované do CD34⁺CD38⁺ a CD34⁺CD38⁻ populácií. Následná analýza u 10 detí ukázala, že u štyroch z nich sa vyskytujú pre tento typ leukémie netypické leukemické pre-skupenia TCR, charakteristické pre daného pacienta, aj v CD34⁺CD38⁻ populácii (22).

Zaujímavá štúdia bola urobená s izolovanými Ph⁺ progenitorovými bunkami ALL s rôznym fenotypom (CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁻, CD34⁺) od pacienta, ktorými transplantovali NOD/SCID myši. Najlepšiu proliferáciu schopnosť mali bunky CD34⁺CD38⁻, schopné vytvoriť veľké množstvo leukemických blastov, ktoré exprimovali rovnaké aberantné kombinácie povrchových antigénov ako mal pacient (11).

Je pozoruhodné, že počas remisie sa HSC s translokáciou dokážu diferencovať do zreých krvných buniek. „Klonálna remisia“ u pacientov s AML naznačuje, že dominantné „pre-leukemické“ kmeňové bunky schopné normálnej diferenciácie môžu existovať a že ďalšia mutačná udalosť/udalosti môžu transformovať tieto pre-leukemické kmeňové bunky do skutočných leukemických kmeňových buniek ako výsledok viac-

stupňovej leukemogenézy. V práci sa demonštruje, že t(8;21) nemusí špecificky značiť leukemické bunky. Na druhej strane je dôležité vedieť, či reziduálne bunky prítomné u rôznych hematologických malignít sú potomkami maligných alebo nemaligných kmeňových buniek s leukemickými špecifickými gémi (21).

Hodnotenie proliferatívnych markerov, bunkového cyklu, apoptózy a rezistencie pomocou prietokovej cytometrie

Definovanie leukemických buniek v populácii hematopoietických prekursorov má teda význam nielen z hľadiska definovania minimálnej reziduálnej choroby, ale aj z hľadiska objasnenia mechanizmov vzniku leukémie. Súčasná analýza povrchových, vnútrobunkových znakov a obsahu DNA umožňuje presnejšiu charakterizáciu vlastností leukemických buniek (23). Odpoveď leukemických buniek na indukčnú terapiu, prítomnosť MRD a prognóza ochorenia sú do značnej miery determinované práve schopnosťou proliferácie a apoptózy leukemických buniek v prítomnosti podaných liečiv. Metóda prietokovej cytometrie využíva rôzne metódy fixácie a permeabilizácie na dôkaz proliferatívnych znakov v spojení s detekciou obsahu DNA na stanovenie proliferatívneho indexu leukemických buniek (23, 24, 25). Detekcia zmien v expresii nádorových supresorových génov (p53, p21), anti- a pro-apoptotických molekúl (Bcl-2, Bax, CD95), mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR) u hematologických malignít je zriedkavá v čase diagnózy, má však špecifický význam pre detekciu mechanizmov progresie leukemického procesu u niektorých diagnóz, ako sa potvrdilo napríklad u CML či AML (26, 27, 28, 29, 30, 38, 39).

Praca bola podporená Grantom c. 2/1109/21 Slovenskej grantovej agentúry.

Literatúra

- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Ratajczak, J., Ratajczak, M.Z. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cell* 2001, 19:99-107
- Koubek, K. Výskyt CD znakov na hematopoietických buňkách. *Vnitř Lék* 1998, 44:609-623
- Campana, D. and Coustan-Smith, E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999, 38:139-152
- Lucio, P., Parreira, A., van den Beemd, M.W.M., van Lochem, E.G., van Wering, E.R., Baars, E., Porwit-MacDonald, A., Björklund, E., Gaipa, G., Biondi, A., Orfao, A., Janossy, G., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999, 13:419-427
- Lucio, P., Gaipa, G., van Lochem, E.G., van Wering, E.R., Porwit-MacDonald, A., Faria, T., Björklund, E., Biondi, A., van den Beemd, M.W.M., Baars, E., Vidrales, B., Parreira, A., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Orfao, A. BIOMED-I concerned action report: Flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple stainings. *Leukemia* 2001, 15:1185-1192
- Babušíková, O., Glasová, M., Koníková, E., Kusenda, J. Leukemia-associated phenotypes: their characteristics and incidence in acute leukemia. *Neoplasma* 1996, 43:367-372
- Porwit-MacDonald, A., Björklund, E., Lucio, P., van Lochem, E.G., Mazur, J., Parreira, A., van den Beemd, M.W.M., van Wering, E.R., Baars, E., Gaipa, G., Biondi, A., Ciudad, J., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Orfao, A. BIOMED-I concerned action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000, 14:816-825
- Schiavon, V., Roth, P., Bolton, W.E., farcet, J.P., Bensussan, A., Boumsell, L. Lymphocytes subsets in normal individuals: analysis by four color immunofluorescence and flow cytometry on whole blood. *Tissue Antigens* 1996, 48:312-318
- Venditti, A., Buccisano, F., Del Poeta, G., Maurillo, L., Tamburini, A., Cox, C., Battaglia, A., Catalanò, G., Del Moro, B., Cudillo, L., Postorino, M., Masi, M., Amadori, S. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000, 96:3948-3952
- San Miguel, J.F., Vidrales, M.B., Lopez-Berges, C., Diaz-Mediavilla, J., Gutierrez, N., Canizo, C., Ramos, F., Calmunúa, M.J., Perez, J.J., Gonzales, M., Orfao, A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001, 98:1746-1751
- Cobaleda, C., Gutierrez-Cianca, N., Perez-Losada, J., Flores, T., Garcia-Sanz, R., Gonzales, M., Sanches-Garcia, I. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 95:1007-1013
- Orfao, A., Schmitz, G., Brando, B., Ruiz-Arquelles, A., Basso, G., Braylan, R., Rothe, G., Lacombe, F., Lanza, F., Papa, S., Lucio, P., San Miguel, J.F. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: Current status and future directions. *Clin Chem* 1999, 45:1708-1717
- Varella-Garcia, M., Hogan, C.J., Odom, L.F., Murata-Collins, J.L., Ai, H., Chen, L., Richkind, K., Paskulin, G., Andreeff, M., Brizard, A., McGavran, L., Gemmill, R.M., Berger, R., Drabkin, H.A. Minimal residual disease (MRD) in remission t(8;21) AML and *in vivo* differentiation detected by FISH and CD34+ cell sorting. *Leukemia* 2001, 15:1408-1414
- Jordan, C.T., Yamasaki, G., Minamoto, D. High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996, 24:1347-1355
- Eckschlager, T a kol.: Prútoková cytometrie v klinické praxi. Grada Publishing 1999, 169 s.
- Petzer, A.L., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Ponchio, L., Barnett, M.J., Eaves, A.C. Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. *Blood* 1996, 88:2162-2171
- Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C., Eaves, A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999, 94:2056-2064
- Feuring-Buske, M. and Hogge, D.E. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34+CD38- progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 97:3882-3889
- Wulf, G.G., Wang, R., Kuehnie, I., Weidner, D., Marini, F., Brenner, M.K., Andreeff, M., Goodell, M.A. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 98:1166-1173
- Blair, A., Hogge, D.E., Sutherland, H.J. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* have the phenotype CD34+/CD71-/HLA DR-. *Blood* 1998, 92:4325-4335
- Miyamoto, T., Weissman, I.L., Akashi, K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:7521-7526
- George, A.A., Franklin, J., Kerkof, K., Shah, A.J., Price, M., Tsark, E., Bockstoe, D., Yao, D., Hart, N., Carcich, S., Parkman, R., Crooks, G.M., Weinberg, K. Detection of leukemic cells in the CD34(+)/CD38(-) bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001, 97:3925-3930
- Garrido, S.M., Willman, Ch., Appelbaum, F.R., Banker, D.E. Three-color versus four-color multiparameter cell cycle analyses of primary acute myeloid leukemia samples. *Cytometry* 2000, 42:83-94
- Bolton, W.E., Freeman, J.W., Mikulka, W.R., Healy, C.G., Schmittling, R.J., Kenyon, N.S. Expression of proliferation-associated antigens (PCNA, p120, p145) during the reentry of G0 cells into the cell cycle. *Cytometry* 1994, 17:66-74
- Jordan, C.T., Yamasaki, G., Minamoto, D. High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996, 24:1347-1355
- Cory, S., Vaux, D.L., Strasser, A., Harris, A.W., Adams, J.M. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 1999, 59:1685-1692

27. Di Bacco, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., Cotter, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *The Oncologist* 2000, 5:405-415
28. Blau, O., Avigad, S., Stark, B., Kodman, Y., Luria, D., Cohen, I.J., Zaizov, R. Exon 5 mutations in the p53 gene in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1997, 8:721-729
29. Lam, V., McPherson, J.P., Salmena, L., Lees, J., Chu, W., Sexsmith, E., Hedley, D.W., Freedman, M.H., Reed, J.C., Malkin, D., Goldenberg, G.J. p53 gene status and chemosensitivity of childhood acute lymphoblastic leukemia cells to adriamycin. *Leuk Res* 1999, 23:871-880
30. Tiirikainen, M.I., Syrjälä, M.T., Jansson, S.-E., Krusius, T. Flow cytometry analysis of P-glycoprotein in normal and leukemic cells. *Ann Hematol* 1992, 65:124-130
31. Jennings, C.D. and Foon, K.A. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997, 90:2863-2892
32. Braylan, R.C., Orfao, A., Borowitz, M.J., Davis, B.H. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001, 46:23-27
33. Glasová, M., Koníková, E., Kusenda, J., Babušíková, O. Evaluation of different fixation methods for simultaneous detection of surface, cytoplasmic markers and DNA analysis by flow cytometry in some human hematopoietic cell lines. *Neoplasma* 1995, 42:337-346
34. Weir, E.G., Cowan, K., LeBeau, P., Borowitz, M.J. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 1999, 13:558-567
35. San Miguel, J. F., Martínez, A., Macedo, A., Vidriales, M. B., Lopez-Berges, C., Gonzalez, M., Caballero, D., Garcia-Marcos, M.A., Ramos, F., Fernandez-Calvo, J., Calmuntia, M.J., Diaz-Mediavilla, J., Orfao, A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997, 90:2465-2470
36. Drach, J., Drach, D., Glassl, H., Gatringer, C., Huber, H. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry* 1992, 13:893-901
37. Farahat, N., Lens, D., Zomas, A., Morilla, R., Matutes, E., Catovsky, D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukemic B-cell precursors. *Br J Hematol* 1995, 91:640-646
38. Lacombe, F. and Belloc, F. Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia. *Hematol Cell Ther* 1996, 38:495-504
39. Wuchter, C., Karawajew, L., Ruppert, V., Büchner, T., Schoch, C., Haferlach, T., Ratei, R., Dörken, B., Ludwig, W.-D. Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult *de novo* acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics. *Leukemia* 1999, 13:1943-1953
40. Babušíková, O., Glasová, M., Koníková, E., Kusenda, J., Čáp, J., Gyárfás, J., Koubek, K.: Phenotypic heterogeneity and aberrant markers expression in T-cell leukemia. *Neoplasma* 1998, 45, 128-134
41. Babušíková, O., Glasová, M., Stašáková, J., Kusenda, J., Koníková, E. Quantitative immunocytofluorometry – new parameters for the definition of leukemia cells. *Neoplasma* 1997, 44, 348-355
42. Ratei, R., Sperling, C., Karawajew, L., Schott, G., Schrappe, M., Harbott, J., Riehm, H., Ludwig, W.-D. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1998, 77:107-114
43. Foon, K.A. and Todd, R.F. III Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986, 68:1-31