

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

Влияние режима приема дексаметазона на выявление нормальных В-клеточных предшественников в костном мозге у детей с острым лимфобластным лейкозом на момент окончания индукционной терапии

Е.В. Михайлова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Ю.В. Румянцева¹, О.И. Илларионова¹,
А.А. Семченкова¹, Л.Г. Фечина^{2,3}, А.И. Карачунский¹, А.М. Попов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

Мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) методом проточной цитометрии на момент окончания индукционной терапии – один из основных способов оценки прогноза при лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). При лейкозах из В-клеточных предшественников (ВП–ОЛЛ) определение МОБ данным методом бывает затруднено из-за схожести иммунофенотипа лейкоэмических и нормальных клеток. Деинтенсификация индукционной терапии может приводить к более частому появлению в костном мозге нормальных ВП, что существенно усложняет мониторинг МОБ. Целью исследования была оценка частоты появления в костном мозге нормальных ВП на 36-й день терапии по протоколу ОЛЛ-МБ 2015 в зависимости от режима приема глюкокортикоидов (ГК). Исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В исследование были включены 220 пациентов с ВП–ОЛЛ, рандомизированных на две группы в зависимости от типа индукционной терапии: постоянный прием дексаметазона ($n = 139$) и перерыв в приеме дексаметазона между 15-м и 22-м днями лечения ($n = 81$). На 36-й день терапии проводили определение МОБ в пунктате костного мозга методом проточной цитометрии с подсчетом процента лейкоэмических клеток и нормальных ВП. Для схемы индукции с интермиттирующим приемом дексаметазона на 36-й день терапии установлен более высокий процент ВП(+)-образцов по сравнению со схемой с непрерывным приемом ГК (43,2 и 27,3% соответственно; $p = 0,016$). При сравнении процентного содержания ВП в ВП(+)-образцах в случае применения схемы лечения с интермиттирующим приемом дексаметазона равновероятно выявляли ВП на разных стадиях созревания; при непрерывном приеме ГК чаще обнаруживали только наиболее ранние ВП с процентным содержанием менее 0,01%. Снижение интенсивности лечения ОЛЛ приводит к заметному увеличению доли нормальных ВП в костном мозге уже на момент окончания индукционной терапии. Большее количество ВП(+)-образцов костного мозга усложняет выявление МОБ в связи со схожестью иммунофенотипа ВП и лейкоэмических клеток.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, дексаметазон, индукционная терапия

Михайлова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 53–57.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

The influence of a dosage regimen of dexamethasone on detection of normal B-cell precursors in the bone marrow of children with BCP-ALL at the end of induction therapy

E.V. Mikhailova¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, J.V. Roumiantseva¹, O.I. Illarionova¹, A.A. Semchenkova¹,
L.G. Fechina^{2,3}, A.I. Karachunskiy¹, A.M. Popov¹

¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² Regional Children Clinical Hospital No 1; Ekaterinburg

³ Research Institute of Medical Cell Technologies; Ekaterinburg

Minimal residual disease (MRD) monitoring by flow cytometry at the end of induction therapy is one of the key ways of a prognosis assessment in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). In B-cell precursor ALL (BCP-ALL), this method of MRD detection is complicated due to the immunophenotypic similarity between leukemic cells and normal B-cell precursors (BCPs). A decrease in intensity of induction therapy can lead to a more frequent appearance of normal BCPs in the bone marrow, which significantly complicates the MRD monitoring. Aim: to assess the incidence of normal BCPs in bone marrow on the 36th day of induction therapy with two different regimens of glucocorticoid (GC) administration according to ALL-MB 2015 protocol. This study was approved by the Independent Ethical Committee and the Academic Council of Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. The study included 220 patients with BCP-ALL who were randomized to two types of GC-based induction therapy: a continuous

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 23.12.2019
Принята к печати 29.01.2020

Контактная информация:

Попов Александр Михайлович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией иммунофенотипирования гемобластозов НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 23.12.2019
Accepted 29.01.2020

Correspondence:

Alexander M. Popov, MD, PhD, Head of Hemoblastosis immunophenotyping laboratory of the Department of pediatric oncological surgery Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

administration of dexamethasone ($n = 139$) and an intermittent regimen with a 1-week dexamethasone therapy stop ($n = 81$). On the 36th day of induction therapy, MRD and normal BCPs were quantified in bone marrow samples by flow cytometry. On the 36th day of treatment, 43.2% of BCP(+) samples were established in the intermittent-therapy group, and 27.3% in the continuous-therapy group ($p = 0.016$). Comparison of the BCP level in BCP(+) samples revealed the more equitable distribution of BCPs at different developmental stages in the intermittent-therapy group, meanwhile mainly the immature BCPs in a quantity of less than 0.01% were found in the continuous-therapy group. Reduced-intensity induction therapy for patients with BCP-ALL leads to a noticeable increase of normal BCPs in bone marrow at the end of this treatment stage. A higher rate of BCP(+) bone marrow samples hinder the MRD detection due to the immunophenotypic similarity of BCPs and leukemic cells.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, dexamethasone, remission induction

Mikhailova E.V. et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 53–57.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

За последние десятилетия достигнуты серьезные успехи в терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей [1]. Однако, несмотря на это, далеко не во всех случаях удается достичь желаемого эффекта, а именно добиться устойчивой продолжительной ремиссии. Эффективная индукционная терапия – важный компонент результативного лечения острых лейкозов. От эффективности данного этапа лечения, в частности, зависит прогноз в каждом конкретном клиническом случае [2]. Важным компонентом индукционной терапии уже более полувека являются глюкокортикостероиды (ГКС). Один из побочных эффектов применения стероидных препаратов на кроветворение – уничтожение не только опухолевых, но и нормальных лимфоидных клеток-предшественников [3]. В связи с этим возникает необходимость коррекции гормональной терапии таким образом, чтобы при уменьшении дозовой нагрузки эффективность лечения не снижалась.

В клинической практике существуют критерии, по которым можно оценить степень ответа пациентов на противоопухолевую терапию. Один из таких критериев – величина минимальной остаточной болезни (МОБ) на различных этапах лечения. Величина МОБ на определенном этапе терапии в совокупности с другими прогностическими факторами позволяет стратифицировать пациентов по группам риска для определения схемы лечения в рамках определенного протокола [4]. Для мониторинга МОБ используются такие методы, как цитогенетический анализ, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), высокопроизводительное секвенирование и многоцветная проточная цитометрия [5, 6]. Последний метод благодаря своей высокой чувствительности и доступности получил широкое распространение в лабораторной практике [7]. Однако в некоторых случаях при определении МОБ могут возникать трудности при разделении пула лейкоэмических клеток и нормальных В-клеточных предшественников (ВП). Неоднократно было показано, что детектируемое восстановление В-лимфопоэза в подавляющем большинстве случаев начинается уже после окончания индукционной терапии [8], поэтому нормальные ВП обычно не препятствуют цитометрическому определению МОБ

в наиболее прогностически важных точках наблюдения (середина и окончание индукционной терапии) [8]. Однако благодаря совершенствованию терапии ОЛЛ уже на самых ранних этапах лечения пациентов могут появляться ВП. Один из методов модификации индукционной терапии – изменение режима дозирования ГКС, которое предусматривает отказ от непрерывного введения данных препаратов. Подобное изменение в схеме лечения потенциально может снизить его токсичность и ускорить процесс регенерации кроветворения, тем самым оказывая влияние на более раннее появление ВП в костном мозге пациентов. В связи с этим повышается риск получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов при определении МОБ методом проточной цитометрии, причем чем больше ВП содержится в образце, тем выше риск [9].

Цель данного исследования: оценить частоту появления нормальных ВП на момент окончания индукционной терапии в костном мозге в зависимости от режима приема глюкокортикоидных препаратов у пациентов с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП–ОЛЛ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. В исследование были включены 220 пациентов в возрасте от 1 до 18 лет с ВП–ОЛЛ, проходившие лечение в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России и Областной детской клинической больницы г. Екатеринбурга с 2015 по 2019 год.

В рамках используемого протокола лечения ВП–ОЛЛ для пациентов терапевтических групп А, В и 1221-SR/IR предусмотрено два типа индукционной терапии: схема с перерывом в приеме дексаметазона между 15-м и 22-м днями лечения (далее – схема *Dexa intermittent*) и более традиционная схема с приемом дексаметазона на протяжении всей индукционной терапии (далее – схема *Dexa constant*). Среди пациентов, включенных в исследование, лечение по схеме *Dexa intermittent* получили 81 человек, по

схеме *Dexa constant* – 139 человек.

По окончании индукционной терапии проводили определение МОБ в пунктате костного мозга пациентов методом многоцветной проточной цитометрии. По полученным точечным графикам определяли процент опухолевых клеток и нормальных ВП.

Определение МОБ производили на цитометрах FACS Canto II (3 лазера, 8 цветов; *Becton Dickinson*, США) и Navios (3 лазера, 10 цветов; *Beckman Coulter*, США). Окрашивание образцов выполняли согласно методике, разработанной в рамках протоколов группы «Москва–Берлин» [10]. Анализ скаттерграмм осуществляли при помощи программного обеспечения *Kaluza 2.1* (*Beckman Coulter*, США). Для выявления нормальных ВП использовали особенности их расположения на точечных графиках [11]. На количественном уровне величину МОБ и ВП оценивали как процентное содержание от ядросодержащих клеток в образце. Образец костного мозга считался ВП- или МОБ-положительным при уровне ВП или МОБ более 0,001%. Статистическую обработку результатов проводили по количественному критерию Манна–Уитни и качественному критерию χ^2 с поправкой Йетса с использованием программного обеспечения *Statistica*. Достоверными считали различия при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование образцов костного мозга 220 пациентов на 36-й день терапии показало, что в 73 (33,2% всех исследуемых образцов) из них содержится более 0,001% нормальных ВП. Установлено также, что в 43,2% образцов от пациентов, лечившихся по схеме *Dexa intermittent*, на конец индукционной терапии в костном мозге присутствовали нормальные ВП; при схеме лечения *Dexa constant* эта цифра составила 27,3% ($p = 0,016$) (рисунок 1). Сравнение процентного содержания ВП в образцах от пациентов, находящихся на двух разных схемах индукционной терапии, не выявило достоверных различий (рисунок 2).

При исследовании количества МОБ(+)-образцов было выявлено, что частота их встречаемости не отличается: в группе *Dexa intermittent* МОБ(+)-образцы составила 27,16%, в группе *Dexa constant* – 26,62% ($p = 0,931$). Обнаружено также, что некоторые ВП(+)-образцы одновременно являются и МОБ-позитивными. При схеме лечения *Dexa intermittent* таких образцов было 6 (17,14% всех ВП(+)-образцов данной группы); при схеме *Dexa constant* – тоже 6 (15,79% всех ВП(+)-образцов данной группы) ($p = 0,877$). Кроме того, установлено, что в 16,44% ВП(+)-образцов костного мозга имеются также опухолевые клетки; среди ВП(-)-образцов их процент выше – 31,97% ($p = 0,015$).

При разделении ВП(+)-образцов на подгруппы по процентному содержанию ВП оказалось, что в группе *Dexa constant* распределение неравномерное: самой многочисленной здесь оказалась подгруппа с 0,005–0,0099% ВП (12 образцов) (рисунок 3). Выделение тех же подгрупп в группе *Dexa intermittent* показало, что образцы сравнительно равномерно распределены по процентному содержанию ВП в них.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В более ранних исследованиях неоднократно было показано, что интенсивность полихимиотерапии при лечении ВП–ОЛЛ непосредственно влияет

Рисунок 1

Частота встречаемости ВП(+)-образцов костного мозга в зависимости от схемы лечения пациентов (в столбцах указано количество образцов)

Figure 1
The frequency rate of BCP(+) BM samples in two different dexamethasone regimens (the number of patients is indicated in the column center)

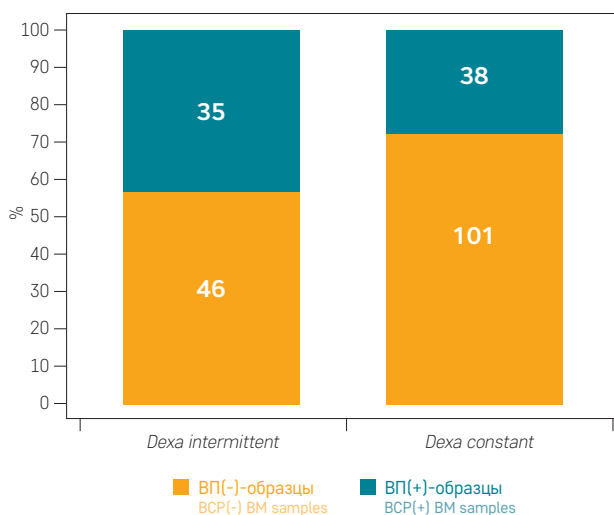


Рисунок 2

Процентное содержание ВП в ВП(+)-образцах костного мозга в двух исследуемых группах

Figure 2
BCP level in BCP(+) BM samples of two investigated groups

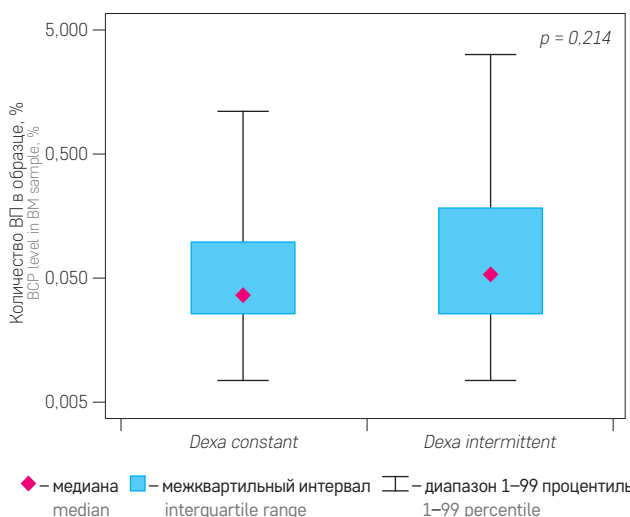
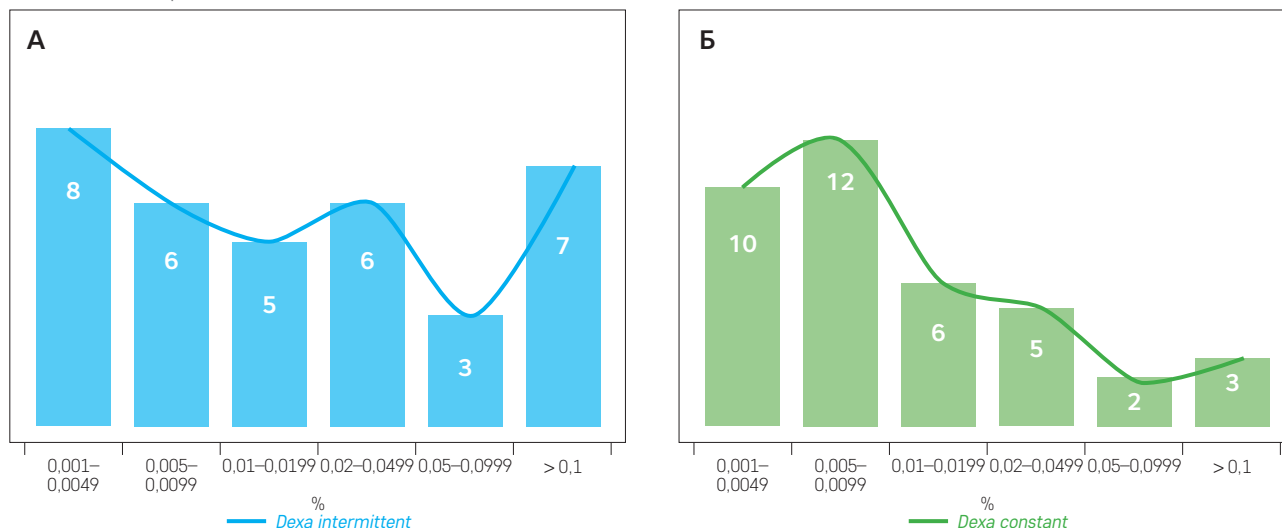


Рисунок 3

Распределение ВП(+)-образцов костного мозга в группах *Dexa constant* (А) и *Dexa intermittent* (Б) в зависимости от процентного содержания ВП (в столбцах указано количество образцов)

Figure 3

Distribution of BCP(+) BM samples of *Dexa constant* group (А) and *Dexa intermittent* group (Б) according to the BCP percentage (the number of samples is indicated in the column center)



на скорость появления ВП в костном мозге пациентов [9, 12, 13]. В исследовании ALL-BFM 95 продемонстрировано, что по окончании индукционной терапии (33-й день для данного протокола лечения) в костном мозге пациентов полностью отсутствуют нормальные ВП [8]. В исследовании в рамках протокола ALL-MB 2008 показало, что на 36-й день терапии, по данным проточной цитометрии, частота встречаемости ВП(+)-образцов костного мозга составляет не более 10% [12]. В нашем исследовании установлен более высокий уровень частоты встречаемости ВП(+)-образцов в конце индукционной терапии – 33,18%. Помимо этого, было установлено, что вероятность обнаружения опухолевых клеток в конце индукционной терапии в образцах костного мозга, содержащих ВП, существенно ниже, чем в образцах без ВП.

Более высокая частота встречаемости ВП(+)-образцов костного мозга наблюдается в группе *Dexa intermittent* по сравнению *Dexa constant*. Очевидно, что регенерация В-клеточного звена кроветворения более интенсивно протекает у пациентов, находящихся на индукционной терапии с паузой в приеме дексаметазона. Вероятно, перерыв в гормональной терапии положительно влияет на способность костного мозга к восстановлению. При этом не теряется и эффективность индукционной терапии по отношению к опухолевым клеткам: частота встречаемости МОБ(+)-образцов костного мозга в обеих группах варьирует незначительно.

Особого внимания заслуживает разница в распределении по процентному содержанию ВП-образцов костного мозга пациентов на разных схемах индукционной терапии. В группе *Dexa constant* наибольшее количество образцов содержало минимальные количества регенераторных клеток (до 0,01%) (рисунок 3).

Вероятно, это связано с тем, что постоянный прием ГКС на протяжении индукционной терапии сильнее угнетает гемопоэз и образование ВП, в связи с чем лишь к концу терапии начинают появляться первые регенераторные клетки с фенотипом CD10++ CD34+ CD19+ (BCP1 – по Dworzak M.N., et al. [14]). Пациенты группы *Dexa intermittent* подвергались меньшей курсовой нагрузке ГКС, что позволило регенерации В-клеточного звена кроветворения начаться несколько раньше. Результатом этого стало не только более равномерное распределение образцов костного мозга по процентному содержанию ВП внутри группы (рисунок 3), но также появление более зрелых предшественников лимфопоэза с фенотипом CD10+ CD34- CD19+ (BCP2 – по Dworzak M.N., et al. [14]). Все эти результаты согласуются с выводами из исследования E.G. van Lochem о том, что интенсивность индукционной терапии напрямую влияет на профиль ВП: чем выше лекарственная нагрузка на костный мозг, тем численно меньшим будет отношение процента более зрелых ВП к менее зрелым [9].

Более раннее появление ВП в костном мозге пациентов благодаря снижению дозовой нагрузки ГКС во время индукционной терапии может затруднить интерпретацию результатов определения МОБ методом проточной цитометрии. Известно, что лейкоэмические клетки могут частично повторять фенотип ВП, из-за чего на точечных графиках происходит наложение нормальных и опухолевых клеточных популяций [15, 16]. В условиях окончания циторедуктивной фазы лечения, когда крайне важно обнаружение лейкоэмических клеток в количестве сотых долей процента, при нахождении ВП в образце требуется особое внимание в интерпретации показателей определения МОБ во избежание получения ложноположительных результатов.

ВЫВОДЫ

Для схемы индукции с интермиттирующим приемом дексаметазона, по данным проточной цитометрии, на 36-й день терапии установлен более высокий процент ВП(+)-образцов, чем для схемы с непрерывным приемом ГКС. В конце индукционной терапии вне зависимости от схемы лечения встречаются образцы костного мозга, содержащие, помимо нормальных ВП, также лейкемические клетки. Вероятность обнаружения опухолевых клеток в конце индукционной терапии в образцах костного мозга, содержащих ВП, существенно ниже, чем в образцах без ВП. В случае применения схемы лечения с интермиттирующим приемом дексаметазона в костном мозге пациентов в конце индукционной терапии равновероятно могут содержаться ВП с различными стадиями созревания и процентным содержанием, а

при лечении по схеме с непрерывным приемом ГКС наиболее вероятно обнаружение ранних ВП с иммунофенотипом CD10++ CD34+ CD19+ и процентным содержанием менее 0,01%. Большое количество ВП(+)-образцов костного мозга на 36-й день терапии усложняет диагностику МОБ в связи со схожестью иммунофенотипа ВП и лейкемических клеток.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>

Illarionova O.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2685-674X>

Semchenkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7082-1694>

Fechina L.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1885-3912>

Popov A.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

1. Румянцев А.Г. Эволюция лечения острого лимфобластного лейкоза у детей. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского 2011; 95 (4): 11–22.
2. Panzer-Grümayer E.R., Schneider M., Panzer S., Fasching K., Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 95 (3): 790–4.
3. Heasman S.J., Giles K.M., Ward C., Rossi A.G., Haslett C., Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. The Journal of endocrinology 2003; 178 (1): 29–36.
4. Borowitz M.J., Devidas M., Bowman W.P., Carroll W.L., Chen I.M., Harvey R., et al. Prognostic Significance of Minimal Residual Disease (MRD) in Childhood B-Precursor ALL and Its Relation to Other Risk Factors. A Children's Oncology Group (COG) Study. Blood 2006; 108 (11): 219.
5. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. British journal of haematology 2003; 121 (6): 823–38.
6. Kotrova M., Muzikova K., Mejstrikova E., Novakova M., Bakardjieva-Mihaylova V., Fiser K., et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. Blood 2015; 126 (8): 1045–7.
7. Moppett J., Burke G.A.A., Steward C.G., Oakhill A., Goulden, N.J. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Journal of clinical pathology 2003; 56 (4): 249–53.
8. Dworzak M.N., Fröschl G., Printz D., Mann G., Pötschger U., Mühlegger N., et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 99 (6): 1952–8.
9. Van Lochem E.G., Wiegers Y.M., Van Den Beemd R., Hählen K., Van Dongen J.J.M., Hooijkaas H. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. Leukemia 2000; 14 (4): 688–95.
10. Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Фадеева М.С., и др. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы. Онкогематология 2016; 11 (4): 64–73.
11. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г., Шестопапов А.В., Плясунова С.А. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их опухолевых аналогов в костном мозге. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2016; 9 (3): 302–13.
12. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Цвиренко С.В., Савельев Л.И. и др. Ограниченная возможность применения упрощенного подхода для определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. Клиническая лабораторная диагностика 2011; 3: 25–9.
13. Van Wering E.R., Van der Linden-Schreier B.E., Szczepański T., Willemse M.J., Baars E.A., Van Wijngaarde-Schmitz H.M., et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. British journal of haematology 2000; 110 (1): 139–46.
14. Dworzak M.N., Fritsch G., Fleischer C., Printz D., Fröschl G., Buchinger P., et al. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. Leukemia 1997; 11 (8): 1266–73.
15. Gaipa G., Basso G., Maglia O., Leoni V., Faini A., Cazzaniga G., et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. Leukemia 2005; 19 (1): 49–56.
16. Lucio P., Parreira A., Van den Beemd M.W.M., Van Lochem E.G., Van Wering E.R., Baars E., et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. Leukemia 1999; 13 (3): 419–27.