

Применение проточной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколам со сниженной интенсивностью

А.М. Попов¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Г.А. Цаур²⁻⁴, А.Г. Солодовников³, О.Р. Аракаев²,
О.В. Стрелева^{2,3}, О.П. Хлебникова², Е.В. Шориков^{2,3}, Л.И. Савельев^{2,4}, С.Н. Лагойко¹,
Ю.В. Румянцева^{1,5}, А.И. Карачунский^{1,5}, Л.Г. Фечина^{2,3}

¹ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149, Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32;

³ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

⁴ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Россия, 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3;

⁵ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Александр Михайлович Попов uralcytometry@gmail.com

Исследовали образцы костного мозга 191 пациента в возрасте от 1 года до 16 лет с острым лимфобластным лейкозом, взятые на 15-й ($n = 188$), 36-й ($n = 191$) и 85-й ($n = 187$) дни терапии. Минимальную остаточную болезнь (МОБ) определяли методом 6–10-цветной проточной цитометрии. По данным определения МОБ на 15-й день оказалось возможным выделить 3 группы пациентов с существенными различиями в бессобытийной выживаемости (БСВ) ($p < 0,0001$): 35,64 % – с МОБ $< 0,1$ % (БСВ 100 %); 48,40 % – с $0,1 \leq \text{МОБ} < 10$ % (БСВ $84,6 \pm 4,2$ %) и 15,96 % – с МОБ ≥ 10 % (БСВ $56,7 \pm 9,0$ %). На момент окончания индукционной терапии пороговый уровень в 0,1 % позволил четко разделить пациентов на 2 группы с БСВ $93,5 \pm 2,1$ и $49,4 \pm 9,0$ % соответственно ($p < 0,0001$). Многофакторный анализ показал, что уровень МОБ на 36-й день $> 0,1$ % является более значимым фактором неблагоприятного прогноза, чем высокая величина МОБ (≥ 10 %) на 15-й день. Таким образом, определение МОБ во время индукционной терапии позволяет выделять группы пациентов с существенно различающимся прогнозом и может быть использовано в системе стратификации наряду с другими факторами риска.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-44-55

Flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia treated by regimens with reduced intensity

A.M. Popov¹, T. Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, G.A. Tsaur²⁻⁴, A.G. Solodovnikov³, O.R. Arakaev², O.V. Streneva^{2,3}, O.P. Khlebnikova²,
E.V. Shorikov^{2,3}, L.I. Saveliev^{2,4}, S.N. Lagoyko¹, Yu.V. Rumyantseva^{1,5}, A.I. Karachunskiy^{1,5}, L.G. Fechina^{2,3}

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia;
1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia;

²Regional Children Clinical Hospital; 32 S. Deryabinoy St., Ekaterinburg, 620149, Russia;

³Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Ekaterinburg, 620026, Russia;

⁴Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Repina St., Ekaterinburg, 620028, Russia;

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

191 consecutive unselected children with acute lymphoblastic leukemia aged from 1 to 16 years were enrolled in the study. Bone marrow samples were obtained at the time of initial diagnostics as well as at days 15 ($n = 188$), 36 ($n = 191$), and 85 ($n = 187$) of remission induction. Minimal residual disease (MRD) was assessed by 6–10-color flow cytometry. Flow cytometry data at day 15 allowed distinguishing three patients groups with significantly different outcome ($p < 0.0001$): 35.64 % patients with MRD < 0.1 % represented 5-year event-free survival (EFS) of 100 %; 48.40 % cases with $0.1 \leq \text{MRD} < 10$ % had EFS 84.6 ± 4.2 %; 15.96 % patients with very high MRD (≥ 10 %) belonged to group with poor outcome (EFS 56.7 ± 9.0 %). At the end of remission induction (day 36) 36 children (18.85 %) with MRD higher than 0.1 % had significantly worse outcome compared to remaining ones (EFS 49.4 ± 9.0 and 93.5 ± 2.1 % respectively; $p < 0.0001$). From a clinical standpoint it is relevant to evaluate both low-risk and high-risk criteria. Multivariate analysis showed that day 15 MRD data is better for low-risk patients definition while end-induction MRD is the strongest unfavorable prognostic factor.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry

Введение

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей, данное заболевание по-прежнему является самой частой причиной смерти детей от онкологических заболеваний [1–6]. Дальнейшее повышение интенсивности химиотерапии не приводит к увеличению выживаемости, но повышает риск развития токсических осложнений [5, 6]. Вследствие этого традиционный перечень факторов риска развития рецидива ОЛЛ нуждается в расширении, чтобы максимально точно выявлять пациентов с высокой вероятностью рецидивирования опухоли и, следовательно, интенсифицировать терапию только у этой группы больных, избегая повышения токсичности для остальных [1–6]. С другой стороны, крайне актуален вопрос выявления пациентов, у которых опухоль высокочувствительна к проводимому лечению и для которых возможно снизить его интенсивность [1, 2, 5, 6].

Ответ на терапию ОЛЛ — один из важнейших факторов прогноза и стратификации пациентов по группам риска [3, 4]. Даже в том случае, если в образцах костного мозга (КМ), взятых во время терапии, количество опухолевых клеток ниже уровня чувствительности обычных цитологических методов ($< 1\%$), они могут вносить существенный вклад в неблагоприятный исход заболевания [5–9]. Совокупность этих клеток, не выявляемых цитологически, но обнаруживаемых другими, более чувствительными методами диагностики, получила название минимальной остаточной болезни (МОБ) [7–9]. Для оценки и мониторинга МОБ чаще всего используются 2 метода: полимеразная цепная реакция и многоцветная проточная цитометрия [7–10]. Основным направлением применения проточной цитометрии для мониторинга МОБ является определение лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа, т. е. специфичного для опухоли сочетания экспрессии антигенов [7–11]. Клиническая значимость определения МОБ методом проточной цитометрии на различных этапах терапии ОЛЛ показана различными исследовательскими группами [12–17].

Наличие в Российской Федерации оригинального протокола терапии ОЛЛ у детей, разработанного группой «Москва—Берлин» (МБ) (руководитель — проф. А.И. Карачунский) [18–21], диктует необходимость разработки собственных алгоритмов мониторинга МОБ для стратификации пациентов. Несмотря на то, что технологические аспекты применения проточной цитометрии для мониторинга МОБ в рамках протоколов группы МБ описаны достаточно детально [22–26], прогностическое значение определения остаточных опухолевых клеток для данных схем терапии показано лишь в единичных работах [27–29].

Цель исследования — оценить возможность мониторинга МОБ методом проточной цитометрии у детей с ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ОЛЛ-МБ-2008.

Материалы и методы

Всего с апреля 2008 г. по ноябрь 2014 г. группой МБ в Центре детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1 (Екатеринбург) были зарегистрированы 204 пациента. В 1 (0,49 %) случае диагноз ОЛЛ был позднее снят, еще 1 (0,49 %) пациент получал терапию не по протоколу ОЛЛ-МБ-2008, а 7 (3,43 %) больных получили индукционную терапию в других клиниках. У 4 (1,96 %) пациентов не было получено ни одного образца КМ ни в одной точке наблюдения для мониторинга МОБ (в 3 случаях причиной этого была индукционная смерть, в 1 — некроз КМ). В итоге в исследуемую группу по определению прогностического значения МОБ вошел 191 пациент, что составило 93,63 % от всех зарегистрированных в Центре.

Исследуемую группу составили 83 (43,5 %) девочки и 108 (56,5 %) мальчиков в возрасте от 1 года до 16 лет (медиана возраста 5 лет и 3 месяца). У 165 (86,39 %) пациентов диагностирован ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ), у 25 (13,09 %) — Т-линейный ОЛЛ (Т-ОЛЛ), а у 1 (0,52 %) определялись 2 популяции опухолевых клеток, соответствовавшие ВП-ОЛЛ и острому недифференцированному лейкозу. У 3 (1,57 %) детей диагностирована болезнь Дауна, в 34 (17,80 %) случаях выявлена транслокация $t(12;21)(p13;q22)$ с образованием химерного гена (ХГ) *ETV6-RUNX1*, в 6 (3,14 %) случаях — транслокация $t(1;19)(q23;p13)$ с образованием ХГ *TCF3-PBX1*, а у 1 (0,52 %) ребенка — транслокация $t(9;11)(p22;q23)$ с образованием ХГ *MLL-MLLT3*.

Все пациенты получали терапию по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 (номер NCT01953770 в системе ClinicalTrials.gov). В соответствии со стратификационными критериями протокола [21] в группу стандартного риска были отнесены 76 (39,79 %) больных, в группу промежуточного риска — 101 (52,88 %), а в группу высокого риска — 14 (7,33 %). PEG-аспарагиназу в индукционной терапии получали 106 (55,50 %) пациентов [21].

МОБ определяли в образцах КМ, взятых на 15-й ($n = 188$) и 36-й ($n = 191$) дни индукционной терапии. Дальнейшее определение МОБ для пациентов групп стандартного и промежуточного риска проводили на 85-й день терапии, а для группы высокого риска — после 1-го блока интенсификации (HR1). Суммарно в этой точке наблюдения проанализированы 187 образцов. Все образцы КМ были исследованы в течение 3 ч с момента забора.

Имунофенотипирование опухолевых клеток в КМ проводили методом 6–10-цветной проточной цитометрии на приборах FACS Canto II и FACS Aria (Becton & Dickinson, США). Настройку проточных цитометров выполняли с использованием калибровочной системы Comp Beads (Becton & Dickinson). Мониторинг стабильности работы приборов осуществляли с помощью калибровочных систем Cytometer Setup and Tracking, 7-color Setup Beads (Becton & Dickinson) и DAKO Fluospheres (Dako, Дания).

Использовали моноклональные антитела (МКАТ), меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), R-фикоэритрином (PE), перидининхлорофилл-протеином (PerCP), аллофикоцианином (APC), красителем AmCyan, а также тандемными конъюгатами PE с TexasRed и цианином 7 (Cy7), PerCP с цианином 5.5 (Cy5.5) и APC с Cy7. Для определения МОБ применяли МКАТ, представленные в табл. 1. Окрашивание первично мечеными МКАТ выполняли согласно инструкции производителя. После инкубации суспензии клеток КМ с МКАТ взвесь обрабатывали лизирующим раствором (FACS Lysing solution, Becton & Dickinson), а затем отмывали фосфатно-солевым буфером (Cell Wash, Becton & Dickinson). Для внутриклеточного окрашивания использовали пермеабилизирующий реагент Fix & Perm (Life

Technologies, США). При определении МОБ применяли подход, основанный на рекомендациях группы AIEOP-BFM [30]. Сначала на точечном графике CD19/SSC или CD7/SSC выделяли В- или Т-клетки соответственно, а затем с учетом экспрессии всех применявшихся маркеров выделяли опухолевые клетки [23, 25]. После этого производили обратное гейтирование на графиках FSC/SSC и CD19/SSC или CD7/SSC. Результат рассчитывали в виде процентного содержания опухолевых клеток среди всех ядросодержащих клеток КМ, которые определялись окраской ДНК-тропным красителем Syto 41 (Life Technologies, США). Образцы КМ считали МОБ-позитивными при величине МОБ > 0,01 %. При этом для большинства образцов, взятых на 36-й и 85-й дни терапии и после HR1, удалось достичь аналитической чувствительности в 0,001 %.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 8.0 и SPSS 18.0. Статистическую значимость различий определяли с помощью непараметрических критериев χ^2 (для качественных показателей) и Манна–Уитни (для количественных показателей). Для оценки результатов терапии рассчитывали 5-летнюю бессобытийную выживаемость (БСВ). Период наблюдения определялся от момента постановки диагноза. Негативными событиями считали смерть от любой причины, прогрессию заболевания, рецидив опухоли. Выживаемость оценивали по кривым, построенным по методу Каплана–Майера [31], стандартную ошибку (СО) рассчитывали по формуле Гринвуда. Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический log-rank test критерий. Медиана наблюдения составила 4,1 года (диапазон 1,3–7,5 года). Многофакторный анализ проводили методом множественной регрессии по Коксу [32] с расчетом отношения опасности и 95 % доверительного интервала (ДИ). Параметры сравнивались с использованием теста Вальда. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

К окончанию индукционной терапии (36-й день) 184 (96,34 %) из 191 пациента достигли клинико-гематологической ремиссии. Всего в исследуемой группе произошло 26 неблагоприятных событий. Большинство из них составили рецидивы ($n = 22$; 84,6 %), кроме того, были зарегистрированы 1 смерть в индукции (3,9 %) и 3 смерти в ремиссии (11,5 %). Пятилетняя БСВ составила $84,9 \pm 2,8$ % при медиане наблюдения 4 года 1 мес. У пациентов группы стандартного риска БСВ была выше, чем в группе промежуточного риска ($92,2 \pm 3,4$ и $84,5 \pm 3,9$ % соответственно), однако различия не достигли статистической значимости ($p = 0,1062$). В группе высокого риска БСВ ($50 \pm 13,4$ %) была существенно ниже, чем в группе промежуточного риска ($p = 0,0011$).

Из 188 образцов, взятых на 15-й день терапии, в 42 (22,34 %) количество опухолевых клеток было < 0,01 %, а

Таблица 1. МКАТ, применявшиеся для определения МОБ

Флуорохром	МКАТ
ВП-ОЛЛ	
FITC	CD58, CD58*, CD45, CD38, CD20, CD15, CD44, CD65*
PE	CD10, CD58, CD11a, CD11b, CD34, CD99, CD19, CD20, CD38, CD52, NG2*, CD99**, CD133***
PerCP	CD45, CD20, CD19, CD34
PerCP-Cy5.5	CD19, CD20, CD38, CD34, CD33, CD138
PE-TexasRed	CD34*, CD38**
PE-Cy7	CD10, CD34
APC	CD19, CD10
APC-Cy7	CD20, CD45
AlexaFluor700	CD11b, CD13
AmCyan	CD45
Т-ОЛЛ	
FITC	CD7, CD99, CD99**, CD4, TdT, CD33
PE	CD99, CD99**, CD7, CD5
PerCP	CD8, CD45
PerCP-Cy5.5	CD5
PE-TexasRed	CD34*, CD8*, CD5*, CD13*
PE-Cy7	CD3
APC	CD3, TdT, CD2, CD4*, CD1a, CD8, CD4
APC-Cy7	CD45, CD3
AlexaFluor700	CD10
AmCyan	CD45

Примечание. Все антитела, если не указано иное, произведены Becton & Dickinson (США); * антитела производства Beckman Coulter (США); ** Invitrogen (США); *** Miltenyi Biotec (Германия).

а МОБ-позитивные образцы по величине остаточной опухоли распределились следующим образом: 25 (13,3 %) пациентов имели величину МОБ в диапазоне 0,01–0,1 %; 50 (26,6 %) – 0,1–1,0 %; 41 (21,81 %) – 1–10 %; у 30 (15,96 %) было выявлено > 10 % лейкоэмических бластов (рис. 1а). На 36-й день терапии 125 (65,45 %) образцов из 191 были МОБ-негативны, в 30 (15,71 %) образцах величина МОБ находилась в диапазоне 0,01–0,1 %, в 24 (12,57 %) – 0,1–1,0 % и по 6 (3,14 %) пациентов имели МОБ 1–10 и > 10 % соответственно (см. рис. 1а). На 85-й день терапии и после HR1 МОБ-негативными были 171 (91,44 %) из 187 образцов, тогда как у 9 (4,81 %), 4 (2,14 %) и 3 (1,60 %) пациентов величина МОБ составила 0,01–0,1; 0,1–1,0 и > 1 % соответственно (см. рис. 1а). Распределение пациентов по величине МОБ во всех 3 точках наблюдения различалось между ВП-ОЛЛ и Т-ОЛЛ (рис. 1б) и между группами стандартного, промежуточного и высокого риска (рис. 1в).

Прогностическое значение МОБ, определенной на 15-й день терапии

Пациенты, имевшие на 15-й день терапии различные уровни МОБ, существенно различались и по прогнозу исхода заболевания ($p < 0,0001$). В МОБ-негативной группе, так же как и среди пациентов с величиной МОБ 0,01–0,1 %, не было зарегистрировано ни одного неблагоприятного события и БСВ составила 100 %. БСВ в группе с МОБ в диапазоне 0,1–1,0 % составила $85,7 \pm 5,6$ %, что было существенно ниже, чем в первых 2 группах ($p = 0,0031$), но не отличалось от БСВ в группе с МОБ 1–10 % ($83,3 \pm 6,4$ %;

$p = 0,7833$). В группе с высоким уровнем МОБ (≥ 10 %) была отмечена наиболее низкая БСВ ($56,7 \pm 9,0$ %), существенно отличавшаяся от 2 предыдущих групп ($p = 0,0005$). Таким образом, оказалось возможным по данным определения МОБ на 15-й день выделить 3 группы пациентов с ОЛЛ (рис. 2а): с МОБ < 0,1 %; 0,1–10,0 % и ≥ 10 %. Характеристика пациентов, попавших в разные группы, представлена в табл. 2. Результаты определения МОБ на 15-й день терапии сохраняли прогностическое значение для разных групп пациентов, однако значимыми оказались различные пороговые уровни (табл. 3).

Прогностическое значение МОБ, определенной на 36-й день терапии

На момент окончания индукционной терапии разные уровни МОБ также позволили разделить пациентов на группы с различным прогнозом. В МОБ-негативной группе было зарегистрировано 6 неблагоприятных событий, а БСВ составила $94,8 \pm 2,1$ %. В группе с величиной МОБ 0,01–0,10 % БСВ была несколько ниже ($87,4 \pm 6,9$ %), однако различия не были статистически значимы ($p = 0,2777$). Прогноз в остальных группах (МОБ в диапазоне 0,1–1,0 %, 1–10 % и > 10 %) существенно не различался (БСВ составила $52,3 \pm 11,6$; $66,7 \pm 19,2$ и $16,7 \pm 15,2$ % соответственно; $p = 0,0893$), однако был хуже, чем в первых двух ($p < 0,0001$). Таким образом, при использовании в данной точке наблюдения порогового уровня МОБ 0,1 % оказалось возможным четко выделить 2 группы пациентов с существенно различным прогнозом (рис. 2б). Характеристика больных, попавших в разные группы, представлена

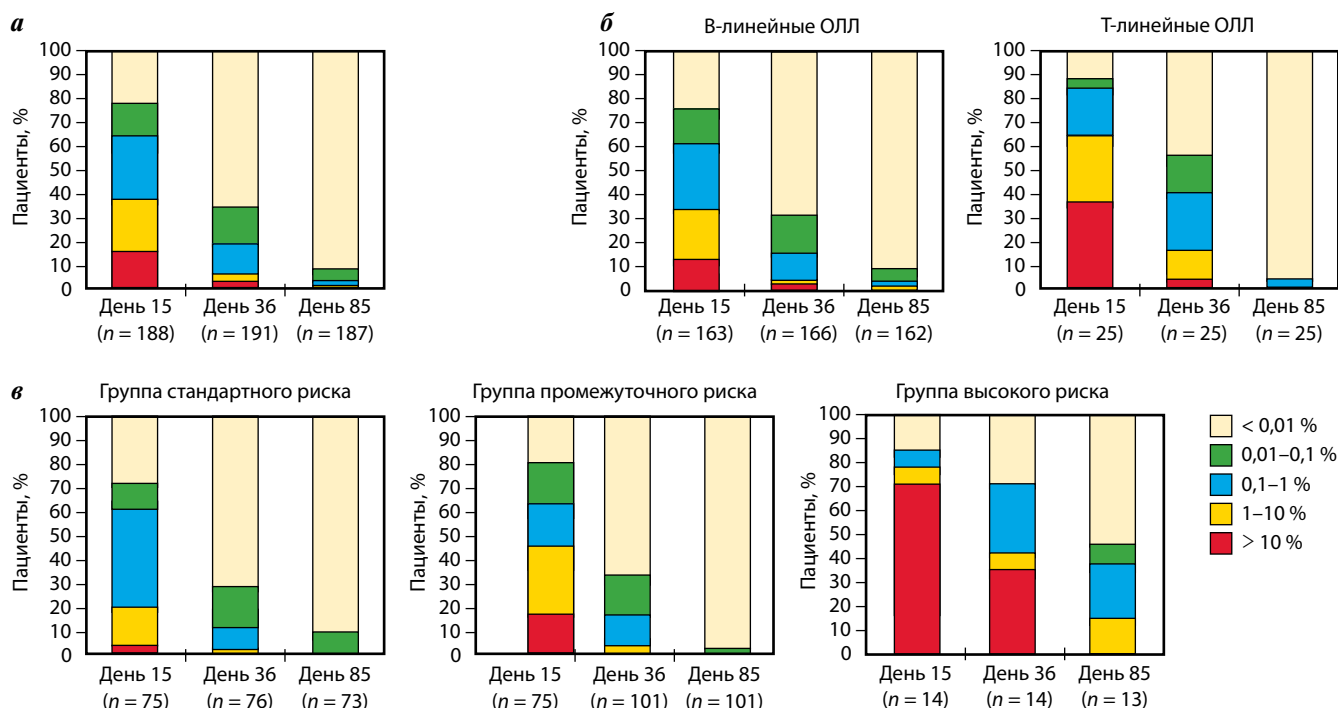


Рис. 1. Распределение пациентов с ОЛЛ по величине МОБ на 15, 36 и 85-й дни терапии (пояснения в тексте)

в табл. 4. Свое прогностическое значение величина МОБ в 0,1 % на 36-й день терапии сохраняла для разных групп пациентов (табл. 5).

Таблица 2. Характеристика групп пациентов, выделенных по результатам определения МОБ на 15-й день терапии

Характеристика	МОБ < 0,1 %, n (%)	0,1 % ≤ МОБ < 10 %, n (%)	МОБ ≥ 10 %, n (%)	p
Возраст, лет				
< 10	56 (83,6)	72 (79,1)	22 (73,3)	0,452
≥ 10	11 (16,4)	19 (20,9)	8 (26,7)	
Пол				
Женский	28 (41,8)	42 (46,2)	12 (40,0)	0,783
Мужской	39 (58,2)	49 (53,8)	18 (60,0)	
Поражение центральной нервной системы				
Нет	57 (85,1)	76 (83,5)	21 (70,0)	0,175
Есть	10 (14,9)	15 (16,5)	9 (30,0)	
Инициальное количество лейкоцитов в периферической крови при ВП-ОЛЛ, × 10 ⁹ /л				
< 30	48 (71,6)	68 (74,7)	16 (53,4)	0,081
≥ 30	19 (28,4)	23 (25,3)	14 (46,6)	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии				
< 1000	67 (100)	87 (95,6)	21 (70,0)	< 0,001
≥ 1000	0 (0)	4 (4,4)	9 (30,0)	
Иммунофенотип				
ВП-ОЛЛ	63 (94,0)	79 (86,8)	21 (70,0)	0,006
Т-ОЛЛ	4 (6,0)	12 (13,2)	9 (30,0)	
Размер селезенки, см				
< 4	43 (64,2)	57 (62,6)	14 (46,6)	0,228
≥ 4	24 (35,8)	34 (37,4)	16 (53,4)	
ETV6-RUNX1-статус				
ETV6-RUNX1–	53 (79,1)	76 (83,5)	27 (90,0)	0,411
ETV6-RUNX1+	14 (20,9)	15 (16,5)	3 (10,0)	
Группа риска по стратификации ОЛЛ-МБ-2008				
Группа стандартного риска	29 (43,3)	42 (46,2)	4 (13,3)	< 0,001
Группа промежуточного риска	36 (53,7)	47 (51,6)	16 (53,4)	
Группа высокого риска	2 (3,0)	2 (2,2)	10 (33,3)	

Прогностическое значение МОБ, определенной после окончания индукционной терапии

Пациенты, у которых МОБ выявлялась на 85-й день терапии и после HR1, имели крайне неблагоприятный прогноз по сравнению с остальными детьми (БСВ $34,6 \pm 13,3$ и $89,8 \pm 2,4$ % соответственно; $p < 0,0001$). Результаты определения МОБ в данной точке наблюдения позволили выявить пациентов с худшим прогнозом и среди тех, у кого на 36-й день выявлялось более 0,1 % опухолевых клеток (БСВ $66,7 \pm 10,3$ и $28,6 \pm 13,3$ % соответственно), однако различия статистической значимости не достигли ($p = 0,1225$). Все неблагоприятные события ($n = 9$) произошли среди пациентов, оставшихся МОБ-позитивными (не ниже 0,001 %) и при дальнейшем наблюдении ($n = 11$), но не среди тех, кто в данной точке наблюдения последний раз был МОБ-позитивным ($n = 5$). БСВ в этих группах составила $18,2 \pm 10,3$ и 100 % соответственно ($p = 0,0254$).

Взаимосвязь результатов определения МОБ с другими факторами риска ОЛЛ

Так как в группе с низкой величиной МОБ на 15-й день не было зарегистрировано ни одного неблагоприятного

Таблица 3. БСВ в различных группах пациентов в зависимости от результатов определения МОБ на 15-й день терапии

МОБ, %	Число пациентов	Число событий	БСВ, %	СО, %	<i>p</i>
Пациенты с ВП-ОЛЛ					
< 0,1	63	0	100	—	< 0,001
0,1–10	79	7	88,7	4,1	
≥ 10	21	8	61,9	10,6	
Пациенты с Т-ОЛЛ					
< 10	16	5	68,8	11,6	0,303
≥ 10	9	5	44,4	16,6	
Пациенты группы стандартного риска					
< 0,1	29	0	100	—	0,053
≥ 0,1	46	5	86,7	5,6	
Пациенты группы промежуточного риска					
< 0,1	36	0	100	—	< 0,001
0,1–10	46	6	85,6	5,5	
≥ 10	16	7	58,8	11,9	
Пациенты группы высокого риска					
< 10	4	1	75,0	21,6	0,166
≥ 10	10	6	40,0	15,5	
Пациенты с ETV6-RUNX1					
< 1	24	0	100	—	0,003
≥ 1	8	3	60,2	18,2	

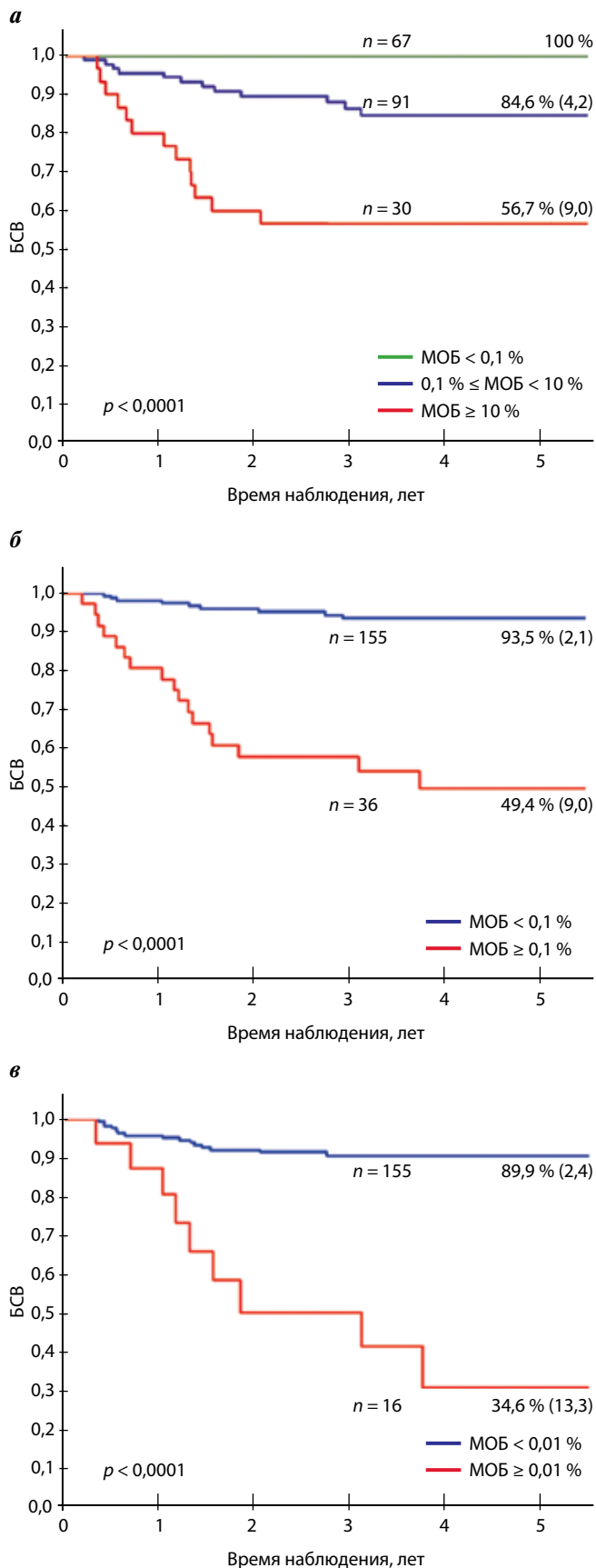


Рис. 2. Распределение пациентов на группы с различным прогнозом в зависимости от результатов определения МОБ на 15-й (а), 36-й (б) и 85-й (в) дни терапии

Таблица 4. Характеристика групп пациентов, выделенных по результатам определения МОБ на 36-й день терапии

Характери- стика	МОБ < 0,1 %, n (%)	МОБ ≥ 0,1 %, n (%)	p
Возраст, лет			
< 10	127 (81,9)	25 (69,4)	0,123
≥ 10	28 (18,1)	11 (30,6)	
Пол			
Женский	70 (45,2)	12 (33,3)	0,269
Мужской	85 (54,8)	24 (66,7)	
Поражение центральной нервной системы			
Нет	127 (81,9)	29 (80,6)	0,963
Есть	28 (18,1)	7 (19,4)	
Инициальное количество лейкоцитов в периферической крови при ВП-ОЛЛ, × 10 ⁹ /л			
< 30	115 (74,2)	24 (66,7)	0,480
≥ 30	40 (25,8)	12 (33,3)	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии			
< 1000	150 (96,8)	28 (77,8)	< 0,001
≥ 1000	5 (3,2)	8 (22,2)	
Иммунофенотип			
ВП-ОЛЛ	140 (90,3)	26 (72,2)	0,008
Т-ОЛЛ	15 (9,7)	10 (27,8)	
Размер селезенки, см			
< 4	95 (61,3)	19 (52,8)	0,454
≥ 4	60 (38,7)	17 (47,2)	
ETV6-RUNX1-статус			
ETV6-RUNX1–	125 (80,6)	33 (91,7)	0,183
ETV6-RUNX1+	30 (19,4)	3 (8,3)	
Группа риска по стратификации ОЛЛ-МБ-2008			
Группа стан- дартного риска	67 (43,2)	9 (25,0)	< 0,001
Группа про- межуточно- го риска	84 (54,2)	17 (47,2)	
Группа вы- сокого риска	4 (2,6)	10 (27,8)	
МОБ на 15-й день терапии, %			
< 0,1	67 (43,2)	0 (0)	< 0,001
0,1–10	77 (49,7)	14 (38,9)	
≥ 10	9 (5,8)	21 (58,3)	
Неизвестно	2 (1,3)	1 (2,8)	

Таблица 5. БСВ в различных группах пациентов в зависимости от результатов определения МОБ на 36-й день терапии

МОБ, %	Число пациентов	Число событий	БСВ, %	СО, %	<i>p</i>
Пациенты с ВП-ОЛЛ					
< 0,1	140	5	95,6	1,9	< 0,001
≥ 0,1	26	11	52,3	11,0	
Пациенты с Т-ОЛЛ					
< 0,1	15	4	73,3	11,4	0,157
≥ 0,1	10	6	40,0	15,5	
Пациенты группы стандартного риска					
< 0,1	67	2	96,4	2,5	< 0,001
≥ 0,1	9	3	57,1	19,9	
Пациенты группы промежуточного риска					
< 0,1	84	7	90,7	3,4	< 0,001
≥ 0,1	17	7	56,6	12,6	
Пациенты группы высокого риска					
< 0,1	4	0	100	—	0,026
≥ 0,1	10	7	30,0	14,5	
Пациенты с ETV6-RUNX1					
< 0,1	30	0	100	—	< 0,001
≥ 0,1	4	3	25,0	21,6	

ятного события, проведение многофакторного анализа с включением различных благоприятных факторов оказалось невозможным. Высокое значение МОБ на 15-й день ($\geq 10\%$) и сохранение $> 0,1\%$ опухолевых бластов на момент окончания индукционной терапии, проанализированные отдельно друг от друга, оказались независимыми прогностическими факторами на фоне других критериев высокого риска, таких как мужской пол, возраст ≥ 10 лет, высокий инициальный лейкоцитоз, инициальное поражение центральной нервной системы, Т-линейный фенотип и наличие более 1000 бластных клеток в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии, а также принадлежность к группе высокого риска по стратификации, принятой в ОЛЛ-МБ-2008 [21]. Для 15-го дня отношение опасности составило 4,206 при 95 % ДИ 1,569–11,272 ($p = 0,004$), а для 36-го – 6,468 при 95 % ДИ 2,630–15,906 ($p = 0,001$). Когда же оба показателя МОБ были помещены в одну модель, независимым неблагоприятным прогностическим фактором остался результат определения МОБ на 36-й день, но не на 15-й (табл. 6).

Обсуждение

В течение уже достаточно длительного времени показатели ответа на терапию считаются одними из ос-

новных факторов, определяющих прогноз заболевания [3–6]. К таким показателям относятся как традиционные – «плохой» ответ на монотерапию кортикостероидами, МЗ-статус КМ по результатам цитологического исследования на 15-й день и отсутствие клинико-гематологической ремиссии на момент окончания индукционной терапии [3–6], так и ставшие популярными в последние годы результаты определения МОБ различными методами [7–9]. Традиционно прогностическое значение показателей ответа на терапию рассматривалось с точки зрения выявления пациентов с высокой вероятностью развития рецидивов ОЛЛ. В то же время крайне важно выявление группы низкого риска, для которой возможны деинтенсификация терапии и ослабление неблагоприятных побочных эффектов противоопухолевых препаратов. В наиболее ранних работах, посвященных применению проточной цитометрии для мониторинга МОБ при ОЛЛ, определялась только группа высокого риска, поэтому основной точкой наблюдения считался момент окончания индукционной терапии [12, 14–16, 27, 29]. Однако в этой точке количество МОБ-негативных пациентов очень велико (более 2/3 в зависимости от применяемого протокола терапии). Кроме того, зачастую существенная доля негативных событий происходит именно в МОБ-негативной группе [14, 16]. Поэтому выделить группу низкого риска по результатам определения МОБ на момент окончания индукционной терапии не представляется возможным. Позднее были опубликованы данные, указывающие на то, что низкий уровень МОБ на самых ранних этапах лечения является крайне важным показателем благоприятного прогноза при ОЛЛ [13, 17]. G. Basso и соавт. удалось с помощью определения МОБ только в 1 точке (15-й день) разделить пациентов на 3 группы с совершенно различным прогнозом. Группу низкого риска составили пациенты с МОБ $< 0,1\%$, группу высокого риска – те, у кого выявлялось $> 10\%$ опухолевых клеток, а группу промежуточного риска – дети с уровнем МОБ 0,1–10,0 % [17]. Таким образом, для стратификации пациентов были использованы количественные результаты проточной цитометрии, а не только качественное разделение больных на МОБ-позитивных и МОБ-негативных.

В нашем исследовании по данным определения МОБ на 15-й день терапии также удалось разделить пациентов на 3 группы с использованием тех же пороговых уровней, что и в работе G. Basso и соавт. [17]. При этом в группе с МОБ $< 0,1\%$ не было зарегистрировано ни одного неблагоприятного события. Некоторые различия в распределении пациентов по группам между 2 исследованиями обусловлены применением разных терапевтических протоколов и, как следствие, неодинаковой скоростью элиминации опухолевых клеток. МОБ на 15-й день сохраняла свое прогностическое значение в группе ВП-ОЛЛ, а отсутствие статистической значимости различий при Т-ОЛЛ, скорее всего, вызвано малым числом пациентов ($n = 25$).

Таблица 6. Результаты многофакторного анализа влияния на БСВ различных неблагоприятных факторов

Характеристика	Число пациентов	Число событий	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			отношение опасности	95 % ДИ	<i>p</i>	отношение опасности	95 % ДИ	<i>p</i>
Возраст, лет								
< 10	150	16	1		0,020	1		0,096
≥ 10	38	9	2,635	1,163—5,967		2,081	0,878—4,931	
Пол								
Женский	82	12	1		0,644			
Мужской	106	13	0,831	0,379—1,822				
Поражение центральной нервной системы								
Нет	154	16	1		0,013	1		0,115
Есть	34	9	2,828	1,249—6,401		2,096	0,835—5,259	
Количество бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии								
< 1000	175	20	1		0,005	1		0,484
≥ 1000	13	5	4,080	1,529—10,890		0,608	0,151—2,451	
Инициальное количество лейкоцитов в периферической крови при ВП-ОЛЛ, × 10 ⁹ /л								
< 100	150	20	1		0,001	1		0,053
≥ 100	38	5	8,331	3,098—22,403		7,175	0,974—52,832	
Иммунофенотип								
ВП-ОЛЛ	163	15	1		0,001	1		0,005
Т-ОЛЛ	25	10	5,428	2,434—12,106		3,944	1,512—10,291	
МОБ на 15-й день терапии, %								
< 10	158	12	1		0,001	1		0,349
≥ 10	30	13	6,916	3,152—15,177		1,761	0,538—5,764	
МОБ на 36-й день терапии, %								
< 0,1	153	9	1		0,001	1		0,007
≥ 0,1	35	16	9,872	4,354—22,384		4,456	1,498—13,251	
Группа риска по стратификации ОЛЛ-МБ-2008								
Группа стандартного риска + группа проме- жуточного риска	174	18	1		0,001	1		0,866
Группа высокого риска	14	7	6,226	2,592—14,958		0,870	0,173—4,370	

При этом среди пациентов с Т-ОЛЛ наиболее четко выделялась группа с благоприятным прогнозом, хотя в нее вошли лишь 4 человека. Среди пациентов группы стандартного риска также все неблагоприятные события были зарегистрированы у детей с величиной МОБ $\geq 0,1$ %, хотя различия оказались на границе статистической достоверности. В группе промежуточного риска по данным 15-го дня выделялись все 3 группы пациентов, а в группе высоко-

го риска лишь 4 больных из 14 имели МОБ < 10 %, и их прогноз отличался от детей с высоким уровнем МОБ. В группе ОЛЛ, ассоциированного с перестройкой *ETV6-RUNX1*, прогностически наиболее значимой оказалась величина МОБ в 1 %. Таким образом, в разных группах пациентов с использованием различных пороговых уровней МОБ неизменно вносила существенный вклад в определение прогноза (см. табл. 3).

Результаты определения МОБ на 36-й день также показали высокую способность выделять пациентов с различным прогнозом. При этом наиболее применимым оказался пороговый уровень 0,1 %, а не 0,01 %, принятый за предел рутинной чувствительности метода. Величина МОБ 0,1 % позволила четко выделить пациентов с высоким риском развития рецидивов во всех исследованных подгруппах ОЛЛ. В работе Н.В. Мигаль и соавт. в рамках того же протокола ОЛЛ-МБ-2008 по данным определения МОБ на 36-й день пациентов разделяли на МОБ-негативных и МОБ-позитивных [29]. В группе стандартного риска, выделенной по стратификационным критериям протокола ОЛЛ-МБ-2008 [21], наличие МОБ не имело прогностического значения [29]. Возможно, это связано с тем, что авторы, по сути, применяли не количественную, а качественную проточную цитометрию. В таком случае пациенты с уровнем МОБ 0,01–0,1 %, имевшие, по нашим данным, благоприятный прогноз, оказались отнесены в неблагоприятную группу, что уменьшило различия между группами. В целом же наши данные еще раз подтвердили прогностическое значение МОБ, определенной на момент окончания индукционной терапии, ранее показанное группой из РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минск) как в рамках протокола ОЛЛ-МБ-2008 [29], так и для предыдущей версии протокола — ОЛЛ-МБ-2002 [27]. Однако, как и ожидалось, в этой точке наблюдения оказалось возможным выделить только группу высокого риска: более 1/3 всех неблагоприятных событий (34,6 %) произошло в группе с МОБ < 0,1 %, что не позволяет по данным МОБ выделить группу с благоприятным прогнозом.

По результатам определения МОБ на 85-й день терапии и после HR1 также выделялись пациенты высокого риска. Однако эта группа получилась очень немногочисленной, а почти 2/3 неблагоприятных событий произошло в МОБ-негативной группе. Кроме того, определение МОБ в этой точке наблюдения не принесло дополнительной прогностической информации к данным, полученным на 36-й день. Наконец, важным оказалось не само наличие МОБ на 85-й день, а длительная персистенция остаточной опухоли при дальнейшем мониторинге. Тем не менее пациенты с сохранением МОБ на 85-й день или после HR1, безусловно, относятся к группе высокого риска и требуют пристального внимания.

В нашем исследовании единственным критерием низкого риска оказался уровень МОБ на 15-й день < 0,1 %, в то время как критериев неблагоприятного прогноза, основанных на МОБ, было несколько. Это и МОБ ≥ 10 % на 15-й день, и МОБ $\geq 0,1$ % на 36-й день, и любая МОБ-позитивность на 85-й день. При выборе точки наблюдения и порогового уровня для выявления пациентов с высокой вероятностью развития рецидива нужно учитывать несколько факторов. Определение МОБ методом проточной цитометрии технически

проще во время индукционной терапии, потому что после 36-го дня в КМ чаще всего определяются нормальные В-предшественники [14, 33, 34], которые не всегда просто отличить по иммунофенотипу от опухолевых клеток. Кроме того, на 85-й день возможный пороговый уровень является одновременно и предельным для рутинной чувствительности исследования, что делает результаты менее воспроизводимыми и затрудняет стандартизацию определения МОБ в рамках многоцентровых исследований. Учитывая это, а также описанные выше особенности полученных на 85-й день или после HR1 данных, представляется более рациональным использовать для стратификации пациентов результаты определения МОБ во время индукционной терапии.

По результатам нашего исследования, выделение 3 групп пациентов по данным МОБ возможно 3 различными путями (рис. 3). При этом критерием низкого риска во всех случаях остается уровень МОБ на 15-й день < 0,1 %. Группу с неблагоприятным прогнозом можно выделить по данным 15-го дня (МОБ ≥ 10 %; см. рис. 3а), можно по данным 36-го дня (МОБ $\geq 0,1$ %; см. рис. 3б), а можно комбинировать результаты, полученные в этих точках наблюдения (МОБ ≥ 10 % на 15-й день или МОБ $\geq 0,1$ % на 36-й день; см. рис. 3в). Учитывая результаты многофакторного анализа, а также то, что на 15-й день терапии образцы КМ бывают крайне малоклеточными, предпочтительным представляется использовать в качестве критерия высокого риска результаты, полученные на 36-й день. Как показано на рис. 3б, такой способ выделения пациентов с плохим прогнозом в действительности приводит к наиболее четкому разделению групп. При этом попытка совмещения данных обеих точек наблюдения лишь ухудшала точность выделения группы с наиболее неблагоприятным прогнозом (см. рис. 3в). Представленное в табл. 7 сопоставление стратификации по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 и по данным МОБ на 15-й и 36-й дни терапии говорит о том, что эти 2 системы стратификации выделяют относительно разные группы пациентов и могут применяться совместно.

В повседневной практике наиболее удобно использовать для выделения всех групп риска одну точку наблюдения. Это может существенно снизить стоимость исследования, а также упростить стандартизацию его проведения в рамках многоцентровых групп. С этой точки зрения наиболее перспективным представляется определение МОБ на 15-й день, поскольку в остальных временных точках невозможно выделить пациентов с благоприятным прогнозом. Однако, несмотря на существенное количество работ, в которых показана роль именно 15-го дня как единственной точки определения МОБ, ограничиваться исследованием КМ только в данной точке весьма рискованно. На фоне характерных для данного этапа терапии выраженной аплазии кроветворения, часто низкой клеточности образца КМ и существенной примеси перифериче-

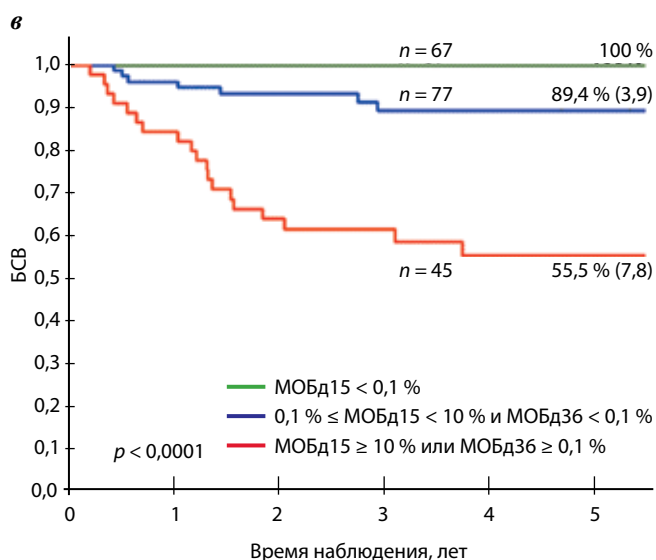
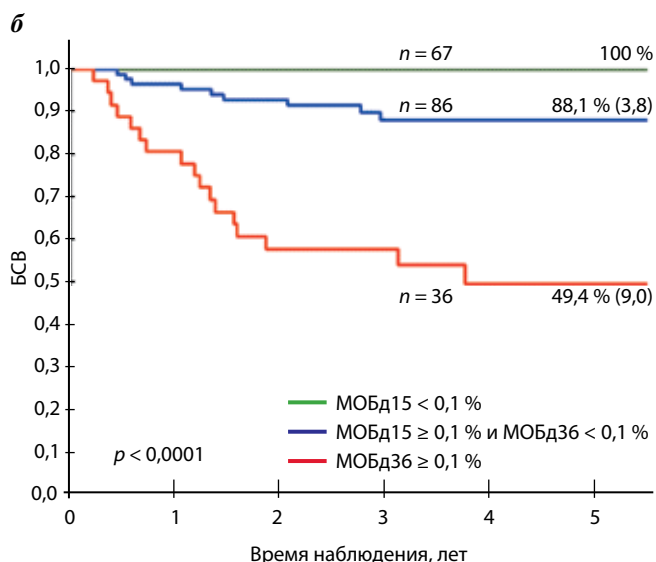
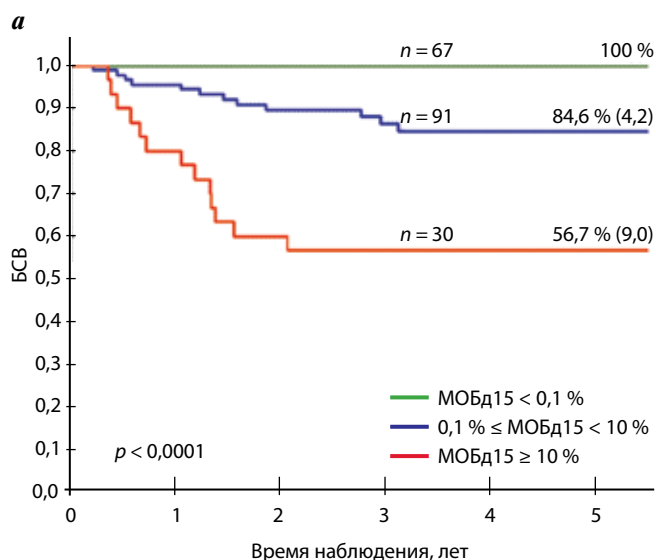


Рис. 3. Варианты разделения пациентов на группы по результатам определения МОБ на 15-й и 36-й дни терапии (пояснения в тексте)

Таблица 7. Распределение пациентов по группам риска, выделенным по системе стратификации протокола ОЛЛ-МБ-2008 и по величине МОБ на 15-й и 36-й дни терапии (пояснения в тексте). В скобках указано количество неблагоприятных событий

Группа риска	МОБ на 15-й день < 0,1 %	МОБ на 15-й день ≥ 0,1 % и МОБ на 36-й день < 0,1 %	МОБ на 36-й день ≥ 0,1 %	Итого
Группа стандартного риска	29 (0)	38 (3)	8 (2)	75 (5)
Группа промежуточного риска	36 (0)	46 (7)	18 (7)	100 (14)
Группа высокого риска	2 (0)	2 (0)	10 (7)	14 (7)
Итого	67 (0)	86 (10)	36 (16)	189 (26)

ской крови могут возникать сложности с определением МОБ, особенно при не очень большом опыте оператора цитометра. Возможными путями решения этих проблем являются обязательное использование ДНК-тропных флуоресцентных красителей, анализ большого количества клеток (не менее 100 000) и применение маркеров, которые позволяют оценить степень разведения КМ кровью [35]. Однако в любом случае более надежным является мониторинг МОБ в нескольких последовательных точках. Именно такой подход применяется в нескольких крупных исследовательских группах [36]. И хотя результаты определения МОБ на 36-й день напрямую связаны с уровнем МОБ на 15-й день, говорить об их 100 % зависимости не приходится [37, 38].

На протяжении последних лет в европейских кооперативных группах по лечению ОЛЛ в качестве «золотого стандарта» определения МОБ принималось определение клоносpezifических перестроек генов тяжелых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов [39–42]. Основными преимуществами данного метода перед проточной цитометрией являются более высокая чувствительность и лучше отработанная система стандартизации [10, 40]. Однако результаты нашего исследования показали, что на 15-й и 36-й дни терапии для получения прогностически важной информации высокая чувствительность вовсе не обязательна, так как пороговым уровнем выделения групп низкого и высокого риска в этих 2 точках являлась величина МОБ 0,1 %. Кроме того, в настоящее время быстро развивается стандартизация определения МОБ методом проточной цитометрии в рамках различных кооперативных групп по лечению ОЛЛ [30, 43–45].

В целом результаты мониторинга МОБ являются одним из факторов риска ОЛЛ и в перспективе могут быть интегрированы в систему стратификации в протоколах группы МБ. Однако, учитывая большое количество терапевтических «рукавов» в современных протоколах терапии ОЛЛ, рекомендовать использование

результатов определения МОБ при выявлении групп риска можно будет только после подтверждения прогностического значения МОБ в рамках более мощного многоцентрового исследования.

Выводы

1. Определение МОБ методом проточной цитометрии у детей с ОЛЛ, получающих терапию по протоколу ОЛЛ-МБ-2008, позволяет четко выделять пациентов с разным прогнозом.

2. Критерием благоприятного прогноза является низкий уровень МОБ ($< 0,1\%$) на 15-й день терапии.

3. Неблагоприятными факторами являются крайне высокий уровень МОБ ($> 10\%$) на 15-й день терапии, $> 0,1\%$ опухолевых клеток на 36-й день терапии и сохранение МОБ в КМ ($> 0,01\%$) на 85-й день терапии.

4. Данные, полученные на момент окончания индукционной терапии, позволяют наиболее четко выделять пациентов с высокой вероятностью развития рецидива.

5. Комбинирование данных, полученных на 15-й и 36-й дни терапии, позволяет разделять пациентов на 3 группы с различным прогнозом.

6. Результаты определения МОБ методом проточной цитометрии могут с успехом использоваться совместно с другими прогностическими факторами в рамках системы стратификации протоколов терапии ОЛЛ группы МБ как в общей группе, так и в различных подгруппах пациентов.

7. Результаты моноцентрового исследования должны быть уточнены в рамках многоцентровой группы терапии ОЛЛ с включением большего числа больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stanula M., Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009;46(1):52–63.
2. Pui C.H. Toward a total cure for acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5121–3.
3. Mörike A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265–84.
4. Pui C.H., Pei D., Sandlund D.T. et al. Long-term results of St. Jude Total therapy studies 11, 12, 13A, 13B and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(2):371–82.
5. Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29(5):551–65.
6. Pui C.H., Mullighan C.G., Evans W.E., Relling M.V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120(6):1165–74.
7. Moppett J., Burke G.A., Steward C.G. et al. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003;56(4):249–53.
8. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:7–12.
9. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:137–42.
10. 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(3):521–35.
11. Campana D., Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Clin Res Haematol* 2002;15(1):1–19.
12. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691–6.
13. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2002;100(1):52–8.
14. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952–8.
15. Björklund E., Mazur J., Söderhäll S., Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003;17(1):138–48.
16. Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477–85.
17. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168–74.
18. Karachunskiy A., Herold R., von Stackelberg A. et al. Results of the first randomized multicentre trial on childhood acute lymphoblastic leukaemia in Russia. *Leukemia* 2008;22(6):1144–53.
19. Румянцев Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;(4):19–27. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Rumyantsev A.G. Treatment optimization of children acute lymphoblastic leukemia in Russia. *Pediatriya = Pediatrics* 2009;(4):19–27. (In Russ.)].
20. Румянцев Ю.В., Карачунский А.И., Алейникова О.В. Эффективность протокола ALL-МБ-2002 у детей с острым лимфобластным лейкозом. *Терапевтический архив* 2010;(7):11–20. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Aleynikova O.V. et al. Efficacy of ALL-MB-2002 protocol in children with acute lymphoblastic leukemia. *Terapevticheskiy archive = Therapeutic Archives* 2010;(7):11–20. (In Russ.)].
21. Литвинов Д.В., Карелин А.Ф., Романова К.И. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. *Доктор. Ру* 2015;(10):30–7. [Litvinov D.V., Karelin A.F., Romanova K.I. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: current possibilities and unsolved problems. *Doctor.ru* 2015;(10):30–7. (In Russ.)].
22. Попов А.М., Вержибская Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Изменения иммунофенотипа опухолевых бластов при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-МБ-2008. *Иммунология* 2010;(2):60–4. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsauro G.A. et al. Changes in blasts immunophenotype in CD10-positive children acute lymphoblastic leukemia

- by 15th day of induction therapy according ALL-MB-2008 protocol. *Immunologiya = Immunology* 2010;(2):60–4. (In Russ.).
23. Попов А.М., Вержибская Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Иммунология* 2010;(6):299–304. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Immunophenotype aberrations used for minimal residual disease monitoring by flow cytometry in CD10-positive acute lymphoblastic leukemia from B-cell precursors. *Immunologiya = Immunology* 2010;(6):299–304. (In Russ.).]
24. Мовчан Л.В., Шман Т.В., Белевцев М.В. и др. Изменение иммунофенотипа лейкоэмических клеток на этапах индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2011;(1):21–6. [Movchan L.V., Shman T.V., Belevtsev M.V. et al. The immunophenotype changes of leukemic cells during induction therapy of acute lymphoblastic leukemia from B-cell precursors in children. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2011;(1):21–6. (In Russ.).]
25. Попов А.М., Вержибская Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2012;(5):31–5. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Flow cytometry algorithm for minimal residual disease monitoring in CD10-negative acute lymphoblastic leukemia from B-cells precursor. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostics in Pediatrics* 2012;(5):31–5. (In Russ.).]
26. Мовчан Л.В. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов. *Онкогематология* 2012;(1):22–8. [Movchan L.V. Leukemia-associated immunophenotype of tumor cells in children with acute lymphoblastic leukemia from B-cell precursors. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2012;(1):22–8. (In Russ.).]
27. Савва Н.Н., Краско О.В., Белевцев М.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ). *Онкогематология* 2009;(2):17–21. [Savva N.N., Kras'ko O.V., Belevtsev M.V. et al. Prognostic value of minimal residual disease for relapse-free survival in children with acute lymphoblastic leukemia treating according ALL-MB-2002 protocol (univariate and multivariate analysis). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2009;(2):17–21. (In Russ.).]
28. Meleshko A.N., Savva N.N., Fedasenko U.U. et al. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk Res* 2011;35(10):1312–20.
29. Мигаль Н.В., Белевцев М.В., Мовчан Л.В. и др. Прогностическое значение минимальной резидуальной болезни у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;(1):50–7. [Migal' N.V., Belevtsev M.V., Movchan L.V. et al. The prognostic value of minimal residual disease in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015;(1):50–7. (In Russ.).]
30. Dworzak M.N., 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(6):331–40.
31. Kaplan E. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–81.
32. Cox D.R. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc B* 1972;34:187–220.
33. Dworzak M.N., Fritsch G., Fleisher C. et al. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. *Leukemia* 1997;11(8):1266–73.
34. Попов А.М., Вержибская Т.Ю., Цаур Г.А. 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. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Limited possibility of using a simplified approach to determine the minimal residual disease by flow cytometry in children with acute lymphoblastic leukemia from the B-cell precursors. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2011;(3):25–9. (In Russ.).]
35. Loken M.R., Chu S.C., Fritschle W. et al. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76(1):27–36.
36. Pui C.H., Pei D., Coustan-Smith E. et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. *Lancet Oncol* 2015;16(4):465–74.
37. Ratei R., Basso G., Dworzak M. et al. 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(3):528–34.
38. Попов А.М., Цаур Г.А., Солодовников А.Г. и др. Связь результата определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом по окончании индукционной терапии протокола ALL-MB-2008 с различными прогностическими факторами. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2012;(4):20–7. [Popov A.M., Tsaur G.A., Solodovnikov A.G. et al. Relations of minimal residual disease determination at the end of induction therapy with different prognostic factors in children with acute lymphoblastic leukemia treating according to ALL-MB-2008 protocol. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2012;(4):20–7. (In Russ.).]
39. van Dongen J.J., Seriu T., Panzer-Grumayer E.R. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352(9142):1731–8.
40. van der Velden V.J., Panzer-Grumayer E.R., Cazzaniga G. et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007;21(4):706–13.
41. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G. et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22(4):771–82.
42. Conter V., Bartram C.R., Valsecchi M.G. 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(16):3206–14.
43. Irwing J., Jesson J., Virgo P. et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870–4.
44. Björklund E., Matinlahti I., Tierens A. et al. Quality control of flow cytometry data analysis for evaluation of minimal residual disease in bone marrow from acute leukemia patients during treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(6):406–15.
45. van Dongen J.J., van der Velden V.J., Brüeggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015;125(26):3996–4009.