

Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы)

Т.И. Лобанова, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4.

Контакты: Татьяна Игоревна Лобанова lobanova_tanya@yahoo.com

Пациенты с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) имеют высокий риск развития рецидива, и определение наличия остаточных опухолевых клеток в период ремиссии позволяет прогнозировать его наступление. С высокой вероятностью развития рецидива также ассоциировано медленное снижение количества бластных клеток после курсов индукции ремиссии. Для диагностики минимальной остаточной болезни (МОБ) используют два наиболее чувствительных метода: молекулярный (полимеразная цепная реакция – ПЦР, капельная цифровая ПЦР, секвенирование нового поколения) и иммунофенотипический (многоцветная проточная цитофлуориметрия – МПЦ), которые имеют как преимущества, так и недостатки. Молекулярный метод более чувствителен, однако для получения результата требуется больше времени (от нескольких дней). Определение МОБ методом ПЦР применимо у 40–50 % пациентов с ОМЛ, а методом МПЦ – у 90 %. Метод МПЦ основан на выявлении сочетания антигенов, характерного для опухолевых клеток и не обнаруживаемого на нормальных гемопоэтических клетках. К недостаткам данного метода можно отнести смену иммунофенотипа опухолевого клона в ходе лечения, недостаточное различие антигенных профилей опухолевых и нормальных клеток, а также трудности в оценке МОБ-статуса при низкой клеточности образца костного мозга или крови.

У пациентов с ОМЛ в ходе многочисленных исследований было доказано влияние МОБ, исследованной методом МПЦ, на долгосрочные результаты лечения. Определение МОБ-статуса на раннем сроке позволяет оценить химиочувствительность опухоли и эффективность проводимой терапии. Несмотря на различные подходы в детекции МОБ, ее пороги и сочетания моноклональных антител, отсутствие стандартизации, «положительные» значения на ранних или более поздних этапах терапии ухудшают безрецидивную и общую выживаемость) пациентов с ОМЛ. До сих пор не разработаны принципы МОБ-направленной терапии, однако имеются протоколы по применению таргетных препаратов в сочетании со стандартной химиотерапией, что позволяет существенно снизить показатели МОБ. Доказано, что интенсификация лечения не оказывает влияния на количественное значение МОБ и отдаленные результаты терапии. Необходимы новые проспективные исследования, направленные на поиск универсальных маркеров МОБ, создание стандартизированной панели моноклональных антител и разработку эффективной терапии в соответствии со значениями МОБ.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, гематология, химиотерапия, рецидив

Для цитирования: Лобанова Т.И., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы). Онкогематология 2018;13(1)83–102.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-83-102

Minimal residual disease assesment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry (literature review)

T.I. Lobanova, I.V. Galtseva, E.N. Parovichnikova

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia, 4 Noviy Zykovskiy proezd, Moscow 125167, Russia

Patients with acute myeloid leukemia (AML) have a high risk of relapse. Determination of the presence of residual tumor cells during the remission of AML allows predicting the onset of relapse. Slow decrease of blast cells after induction courses is associated with a high probability of relapse. There are two most sensitive methods for determining minimal residual disease (MRD): molecular (polymerase chain reaction – PCR, droplet digital PCR, next generation sequencing – NGS) and immunophenotypic (multicolor flow cytometry – MFC). Both methods have advantages and disadvantages. The molecular diagnostic method is more sensitive, but it takes more time to get the result (from several days). Measurement of MRD by PCR is applicable in 40–50 % of AML patients, and by MFC – in 90 % of patients. The MFC method is based on the identification of antigens combination that is characteristic of tumor cells and is not found on normal hematopoietic cells. There are several drawbacks of the MFC method: the change of tumor clone immunophenotype during treatment, the inadequate difference in the antigen profiles of tumor cells and normal cells, difficulties in evaluating the MRD status in low cellularity bone marrow or blood

sample. In AML patients the effect of MRD, measured by the MFC method, on long-term treatment outcomes was well-demonstrated. Evaluation of early MRD status shows tumor chemosensitivity and therapy efficacy. Despite the different approaches in MRD detection, thresholds and the combination of monoclonal antibodies, the lack of standardization, "positive" MRD values in early or later stages of therapy worsen the disease-free (DFS) and overall survival (OS) in AML patients. So far, the principles of MRD-directed therapy have not been developed, but protocols exist with the use of targeted drugs in combination with standard chemotherapy that help to reduce the MRD level. It is proved that the intensification of treatment does not affect the quantitative value of MRD and the long-term results of therapy. New prospective studies are needed to search for universal MRD markers, to create a standardized panel of monoclonal antibodies and to develop a specific therapy strategy in accordance with the MRD values.

Key words: Minimal residual disease, hematology, chemotherapy, relapse

For citation: Lobanova T.I., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. Minimal residual disease assesment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry (literature review). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1)83–102.

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — одно из наиболее тяжелых злокачественных заболеваний системы крови. За последние 20 лет результаты лечения его у взрослых принципиально не изменились — полную ремиссию (ПР) после интенсивной химиотерапии (ХТ) подтверждают у 70–80 % пациентов, а вероятность 5-летней безрецидивной выживаемости (БРВ) составляет 30–40 % [1, 2]. Эффективность ХТ острых лейкозов зависит от специфичности цитостатического воздействия и выбора сопроводительного лечения. Биологические особенности лейкоемического клона (молекулярные маркеры, химиочувствительность, цитогенетические аномалии), наличие гиперлейкоцитоза в дебюте заболевания, концентрация лактатдегидрогеназы определяют его прогноз. Достаточно часто возникает рецидив, который в большинстве случаев плохо поддается лечению [3]. Персистенция остаточных опухолевых клеток — минимальная остаточная болезнь (МОБ) — может стать причиной развития рецидива ОМЛ. В ПР заболевания лейкоэмические клетки возможно выявить с помощью высокочувствительных методов [4]. В ходе многочисленных исследований показано, что количественное определение МОБ служит независимым прогностическим фактором [5–9]. Пациенты с неопределяемой МОБ (МОБ-негативный статус) на ранних этапах терапии имеют благоприятный долгосрочный прогноз, а лицам с выявляемой МОБ (МОБ-позитивный статус) требуются интенсификация или смена лечения и новые терапевтические подходы. Предпосылками успешной трансплантации аллогенного костного мозга (аллоТКМ) являются минимальные значения МОБ до ТКМ и отсутствие МОБ после нее [10]. Поскольку исследование МОБ необходимо для контроля течения заболевания и его прогноза, а также способствует адекватному выбору наиболее эффективной и сопряженной с меньшим риском стратегии терапии [11], оно включено в многочисленные протоколы терапии взрослых пациентов и детей. Методы, используемые для определения МОБ, должны быть стандартизированными, специфичными, высокочувствительными и точными в плане измере-

ния количества остаточных опухолевых клеток с возможностью быстрого получения результата.

Методы диагностики минимальной остаточной болезни

Для диагностики МОБ используют методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и многоцветной проточной цитофлуориметрии (МПЦ) [4], их сравнительная характеристика представлена в табл. 1. Оба метода имеют преимущества и недостатки, однако применимость МПЦ у большинства больных ОМЛ, а также быстрое получение результата делают его более универсальным. Чувствительность детекции МОБ выражают величиной, обратной числу нормальных клеток, приходящихся на одну выявленную лейкозную клетку.

Молекулярные методы детекции минимальной остаточной болезни. В настоящее время высокочувствительные методы на основе определения дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот (ДНК и РНК) могут идентифицировать МОБ с высокой чувствительностью — одна опухолевая клетка на 1 млн нормальных. Опухолевая клетка может быть обнаружена путем определения нуклеотидных последовательностей генов, специфичных для конкретной опухоли. Наиболее часто МОБ определяют методом ПЦР, где в качестве мишени выступает ДНК. Если мишенью служит РНК, то требуется проведение дополнительного этапа — обратной транскрипции, когда на матрице РНК образуется комплементарная ей ДНК. Молекулярные мишени при ОМЛ подразделяют на следующие группы: химерные транскрипты, мутации в генах, гиперэкспрессия генов. Примеры использования различных молекулярных методов для определения МОБ приведены в табл. 2.

У больных ОМЛ наиболее часто встречаются хромосомные реаранжировки t(8;21) и inv(16)/t(16;16), которые ведут к появлению химерных генов *RUNX1/RUNX1T1 (AML1-ETO)* и *CBFβ-MYH11* соответственно. Частота их обнаружения составляет 15 %, все они ассоциированы с благоприятным прогнозом [12]. Исследования по мониторингу МОБ с использованием в качестве мишеней *RUNX1/RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11*

Таблица 1. Сравнительная характеристика методов определения минимальной остаточной болезни

Table 1. Comparative characteristics of MRD detection methods

Параметр сравнения Comparison parameter	Проточная цитометрия Flow cytometry	Полимеразная цепная реакция Polymerase chain reaction
Продолжительность исследования Detection duration	Результат в течение нескольких часов Result for several hours	Результат в течение нескольких дней Result for several days
Необходимость исследования в дебюте The need for detection in the disease onset	Необязательно, но желательно Optionally, but preferably	Обязательно Required
Чувствительность Sensitivity	Желательно наличие нескольких ЛАИФ и анализ минимум 200 000 событий для адекватной чувствительности (10 ⁻⁴) It is desirable to have several LAIF and analyze at least 200,000 events for adequate sensitivity (10 ⁻⁴)	Высокая чувствительность, более высокая, чем при МПЦ (от 10 ⁻⁴ до 10 ⁻⁶) High sensitivity, higher than by flow cytometry (from 10 ⁻⁴ to 10 ⁻⁶)
Стабильность исследуемых маркеров Stability of the investigated markers	ЛАИФ может изменяться в течение терапии LAIF can change during therapy	Большинство мишеней устойчивы и неизменны Most targets are stable and unchanged

Примечание: ЛАИФ – лейкоз-ассоциированный иммунофенотип; МПЦ – многоцветная проточная цитофлуориметрия.
Note: LAIF – leukemia-associated immunophenotype.

Таблица 2. Мишени для исследования минимальной остаточной болезни молекулярными методами [12]

Table 2. Targets for MRD detection by molecular methods [12]

Параметр Parameter	Химерные транскрипты Chimeric Transcripts	Внутренние мутации в генах Internal gene mutations	Гиперэкспрессия генов Genes hyperexpression
Примеры молекулярных маркеров Examples of molecular markers	<i>AML1-ETO, CBFB-MYH11, химерные гены с участием гена MLL: MLL(KMT2A)-AF9, MLL-ELL, MLL-AF6; PML-RARα</i> <i>AML1-ETO, CBFB-MYH11, chimeric genes involving the MLL gene: MLL(KMT2A)-AF9, MLL-ELL, MLL-AF6; PML-RARα</i>	<i>FLT3, NPM1, C/EBPα, N-RAS, K-RAS, JAK2, JAK3, PDGFR, p53, NF1, cKit</i>	<i>WT1, EVI1, PRAME</i>
Молекулярная мишень Molecular target	РНК (реакция ОТ-ПЦР) RNA (RT-PCR reaction)	ДНК DNA	РНК (реакция ОТ-ПЦР) RNA (RT-PCR reaction)
Недостатки метода Disadvantages of the method	Нестабильность РНК Различия в экспрессии РНК между клетками RNA instability Differences in RNA expression between cells	Нестабильность мутаций Instability of mutations	Нестабильность РНК Различия в экспрессии РНК между клетками RNA instability Differences in RNA expression between cells

Примечание: ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ОТ-ПЦР – метод ПЦР с обратной транскрипцией; РНК – рибонуклеиновая кислота.
Note: DNA – deoxyribonucleic acid; RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction; RNA – ribonucleic acid.

немногочисленны и включают относительно малое число пациентов, что, вероятно, связано с небольшим процентом встречаемости этих мутаций. Так, в исследовании J. Krauter и соавт. приняли участие 37 больных: 22 – с t(8,21) и 15 – с inv(16), которым проводили стандартную индукционную ХТ. В дальнейшем пациентов разделяли на группы: больным с ≥5 % бластных

клеток проводили консолидирующие курсы высокодозной ХТ, а у лиц с <5 % бластных клеток продолжали стандартную ХТ. В качестве контрольных точек исследования МОБ приняты период после 1-го и 2-го индукционных курсов, 1-го и 2-го консолидирующих курсов, а также момент рецидива. Пороговым значением была МОБ более 1 %; из 11 пациентов

с МОБ-позитивным статусом хотя бы в одной точке исследования у 10 констатировали рецидив ОМЛ (средняя продолжительность ремиссии — 10 мес) [13]. A. Guerasio и соавт. наблюдали 36 пациентов с *CBFβ/МУН11*. Контрольными точками в ПР служили периоды после индукции и после курсов консолидации, а также через 4–12 мес ПР. Оказалось, что практически у всех участников сохранялся аномальный транскрипт в ранние сроки после индукционной ХТ, а пороговое значение МОБ составило 0,01 %. У всех пациентов с положительными значениями МОБ констатировали рецидив [14]. S. Buonamici и соавт. включили в исследование 21 пациента с *inv(16)*, контрольные точки — окончание индукционного, консолидирующего курсов, а также период после выполненной аллоТКМ (наблюдение в течение 3 лет). Значения *CBF-МУН11/ABL* более 0,25 % ассоциировались с риском развития рецидива [15]. В ходе описанных выше исследований показано, что более высокие значения химерных транскриптов ассоциированы с более низкими показателями БРВ. В 2017 г. E. Jourdan и соавт. проанализировали образцы костного мозга (КМ) 198 пациентов, включенных в *CBF-2006 trial* в контрольные точки перед началом 1, 2 и 3 консолидации с пороговым значением МОБ 0,1 %. При этом пациенты были рандомизированы в группы стандартной и высокодозной ХТ. Показано, что оба направления протокола оказались одинаково эффективными. БРВ не отличалась в обеих группах, несмотря на более быстрое снижение МОБ в группе высокодозной ХТ в первых двух точках исследования. Точку МОБ-диагностики перед 2-й консолидацией использовали в качестве критерия стратификации пациентов на аллоТКМ при МОБ-редукции менее 3 логарифмов или $\geq 0,1$ % [16].

Химерные гены с участием *KMT2A (MLL)* возникают в результате реарранжировок региона 11q23, обнаруживаются в 10 % случаев и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Детекция МОБ с помощью этих маркеров — сложная задача, так как *KMT2A* может участвовать в более чем 50 различных транслокациях. Наиболее частые из них — *t(9;11)(p22;q23)*, *t(11;19)(q23; p13.3)* и *t(6;11)(q27; q23)* [17].

При остром промиелоцитарном лейкозе транслокация (15;17) приводит к образованию химерного гена *PML-RARα*, что является характерным признаком этого заболевания и «золотым стандартом» определения МОБ при данном варианте лейкоза [18].

Наиболее известным и изученным белком с мутациями в его гене, ассоциированным с ОМЛ, является рецепторная тирозинкиназа 3 (*FLT3*). Этот белок имеет функцию внутриклеточной тирозинкиназы и играет роль в росте и дифференцировке стволовых клеток [19]. В 30 % случаев ОМЛ выявляются мутации этого гена [20]. Наиболее часто встречаются внутренние tandemные дубликации (*FLT3-internal tandem duplication — ITD*), которые вызывают фактор-независимый рост клеток и ассоциированы с неблагоприятным прогно-

зом. У пациентов с выявленной мутацией *FLT3* чаще определяется нормальный кариотип, однако иногда отмечается сочетание *FLT3* и *t(6;9)(p23;q34)*, а также *t(15,17)(q22; q12)*. Мутации в киназном домене *FLT3 (FLT3/TKD)* встречаются у больных с нормальным кариотипом в 6–7 % случаев, однако прогностическое влияние на долгосрочные результаты терапии этих мутаций не доказано [21]. Ограничивает применение этой мутации в качестве мишени для мониторинга МОБ ее нестабильность в ходе терапии: мутации могут трансформироваться или исчезать [22].

Мутации в гене нуклеофосмина 1 также относят к прогностически значимым у лиц с ОМЛ. Ген *NPM1* располагается на хромосоме 5 и кодирует фосфопротеин, который участвует в поддержании стабильности генома, образовании рибосом, регуляции транскрипции и опухолевой супрессии [23]. У больных ОМЛ с нормальным кариотипом и отсутствием мутации *FLT3-ITD* мутации *NPM1* свидетельствуют о благоприятном прогнозе заболевания. В сравнении с мутациями гена *FLT3* мутации *NPM1*-гена стабильны и могут быть использованы для мониторинга МОБ [24].

Ген *C/EBPα* находится на хромосоме 19, и его продукт участвует в регуляции линейной дифференцировки клеток [25]. Мутации этого гена встречаются у 25 % пациентов с ОМЛ (чаще с М1- и М2-вариантами), при нормальном кариотипе — в 8–10 % случаев. Мутация в этом гене, особенно биаллельная, также ассоциирована с благоприятным прогнозом [23, 24]. В отличие от мутаций *FLT3*, пациенты с мутациями *C/EBPα* на момент первичной диагностики и в период рецидива имеют тот же тип мутации [26]. Существуют также герминальные (врожденные) мутации этого гена, они чаще всего биаллельные и встречаются до 15 % случаев ОМЛ, не влияют на результаты терапии и прогноз [27, 28]. В настоящее время исследований по применению *C/EBPα* для мониторинга МОБ не было [29].

Альтернативной мишенью для молекулярного мониторинга МОБ является исследование гиперэкспрессии генов, таких как *WT1*, *EVII* и *PRAME*. Эти гены экспрессируются в низких количествах в нормальных гемопоэтических клетках. *EVII* — протоонкоген, связанный с перестройками 3q26, встречается в 8 % случаев ОМЛ, и его высокая экспрессия в дебюте заболевания ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [30]. Ограничением исследования генов *WT1* и *PRAME* является то, что в нормальных регенерирующих клетках КМ эти гены могут быть гиперэкспрессированы, что приводит к ложноположительным результатам при оценке МОБ. Однако в случаях, когда на фоне постоянной экспрессии *WT1* в периоде ремиссии его экспрессия повышается, можно заподозрить признаки развития рецидива [31]. С другой стороны, недостатком исследования экспрессии генов является то, что РНК подвергается деградации (особенно при длительном хранении и на этапе выделения), которая становится причиной ложнонегативных результатов.

Для получения количественного результата исследования МОБ методом ПЦР требуется использование стандартов с известным числом ДНК-мишеней или контрольного гена (например, гена «домашнего хозяйства»). В настоящее время используют цифровую капельную ПЦР, которая позволяет получить количественный результат напрямую, без использования калибраторов. Принцип этого метода основан на дроблении реакционной смеси на капли, в каждой из которой проходит реакция ПЦР. ПЦР-положительные и ПЦР-отрицательные капли затем подсчитывают и определяют абсолютное количество ДНК-мишеней в образце. С помощью этого метода исследуют многочисленные генетические маркеры при ОМЛ (гиперэкспрессии генов *STMN1*, *KITLG*, *CDK6*, *MCM5*, *ABL1*, *ANXA3*, *KRAS*, *CEBPA*, *MYC*, *ANGPT1*, *SRGN*, *RPLP0*, *ENO1*, *SET*, *STMN1*, *CAT*) [32, 33]. Появление технологий секвенирования нового поколения (СНП) ускорило открытие новых генетических повреждений у больных ОМЛ и позволило идентифицировать полный диапазон геномных изменений: точечные мутации, изменения количества копий и структурные перестройки, включая транслокации, критические перестановки, инверсии и сложные перегруппировки во всем геноме. У пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом СНП позволило обнаружить нескольких новых мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1* и др. Их прогностическое значение было недавно изучено как изолированно, так и в сочетании с другими известными молекулярными аномалиями [34].

Молекулярные маркеры для мониторинга МОБ при ОМЛ имеются у 40–60 % пациентов [11]. В частности, ПЦР-диагностику МОБ нельзя применить для мониторинга лейкозов с числовыми аномалиями кариотипа, а также с некоторыми делециями и транслокациями без расшифрованных молекулярных перестроек.

Многоцветная проточная цитофлуориметрия. Мониторинг МОБ методом МПЦ основан на детекции лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа (ЛАИФ) [11]. ЛАИФ – это сочетание антигенов, характерное для опухолевых клеток и не обнаруживаемое (или обнаруживаемое в небольшом количестве) на нормальных гемопоэтических клетках [35]. Наиболее точные количественные результаты МОБ получают при одновременном анализе коэкспрессии 10 и более антигенов, меченных разными флуорохромами, что позволяет с большей достоверностью определить популяцию опухолевых клеток по их ЛАИФ [36]. Чувствительность метода определяется числом проанализированных клеток, т. е. зависит от количества клеток в образце КМ или крови. Теоретически чувствительность метода может достигать 10^{-4} – 10^{-6} , но на практике не всегда возможно выделить достаточное для анализа количество клеток, особенно после высокодозных курсов лечения [37]. По данным зарубежных авторов, аномальный лейкозный иммунофенотип можно выявить у 73–94 % пациентов с *de novo* ОМЛ [34, 35].

Существует два подхода для детекции МОБ методом МПЦ. Первый заключается в определении ЛАИФ в дебюте заболевания и последующего подбора пациент-специфичной панели моноклональных антител (МКА), которую затем используют для мониторинга МОБ в ходе терапии. Выделяют следующие типы ЛАИФ [36]:

- 1) коэкспрессия лимфоидных маркеров на миелобластах (CD2, CD22, CD5, CD19, CD56, CD7) – наиболее часто встречающийся вариант аберраций – до 41 % (рис. 1);
- 2) гиперэкспрессия антигена (например, CD33, CD34, CD99) на бластных клетках; встречается у 27 % пациентов с ОМЛ;
- 3) сниженная экспрессия или аномальное отсутствие антигена (CD33, CD13, CD38, HLA-DR, CD45) может также характеризовать фенотипически аберрантные миелоидные бластные клетки (до 35 % случаев);
- 4) асинхронная коэкспрессия «ранних» (CD34 или CD117) и «поздних» антигенов (CD15, CD11c, CD65) на миелоидных клетках (21 %) (рис. 2).

Следует учитывать, что на нормальных гемопоэтических клетках, особенно при регенерации КМ, может наблюдаться аномальная экспрессия ряда антигенов. К примеру, экспрессия CD7, CD56, 11b на CD34+ клетках, а также сочетание CD34+HLA-DR- встречается и у здоровых доноров [38].

Выявление комплексных ЛАИФ в дебюте заболевания повышает чувствительность и специфичность исследования МОБ. Однако этот подход имеет недостатки. Во-первых, иммунофенотип бластных клеток может меняться либо вследствие проведенной ХТ, либо в связи с селекцией минорного опухолевого клона, во-вторых, для использования этого подхода необходимо знать иммунофенотип опухолевых клеток в дебюте заболевания.

Второй подход определения МОБ («отличный от нормального», или «метод пустых мест») возможно применять даже при отсутствии данных инициального иммунофенотипирования. Этот подход основан на использовании стандартной панели антител на всех этапах химиотерапевтического воздействия. У здоровых доноров нормальное созревание и дифференцировка гемопоэтических клеточных линий ассоциированы с последовательной экспрессией антигенов [37]. Лейкемические клетки могут быть выявлены по их иммунофенотипическому отклонению от паттернов антигенной экспрессии нормальных гемопоэтических клеток определенной клеточной линии и стадии зрелости (рис. 3). Этот подход позволяет «обойти» проблему иммунофенотипических изменений в ходе химиотерапевтического воздействия. Выявление лейкозных клеток в данном случае основывается на сравнении паттернов антигенной экспрессии клеток в образце КМ донора и пациента с ОМЛ. Для такого анализа необходимы определенная квалификация и знание процесса нормального созревания клеток КМ на всех

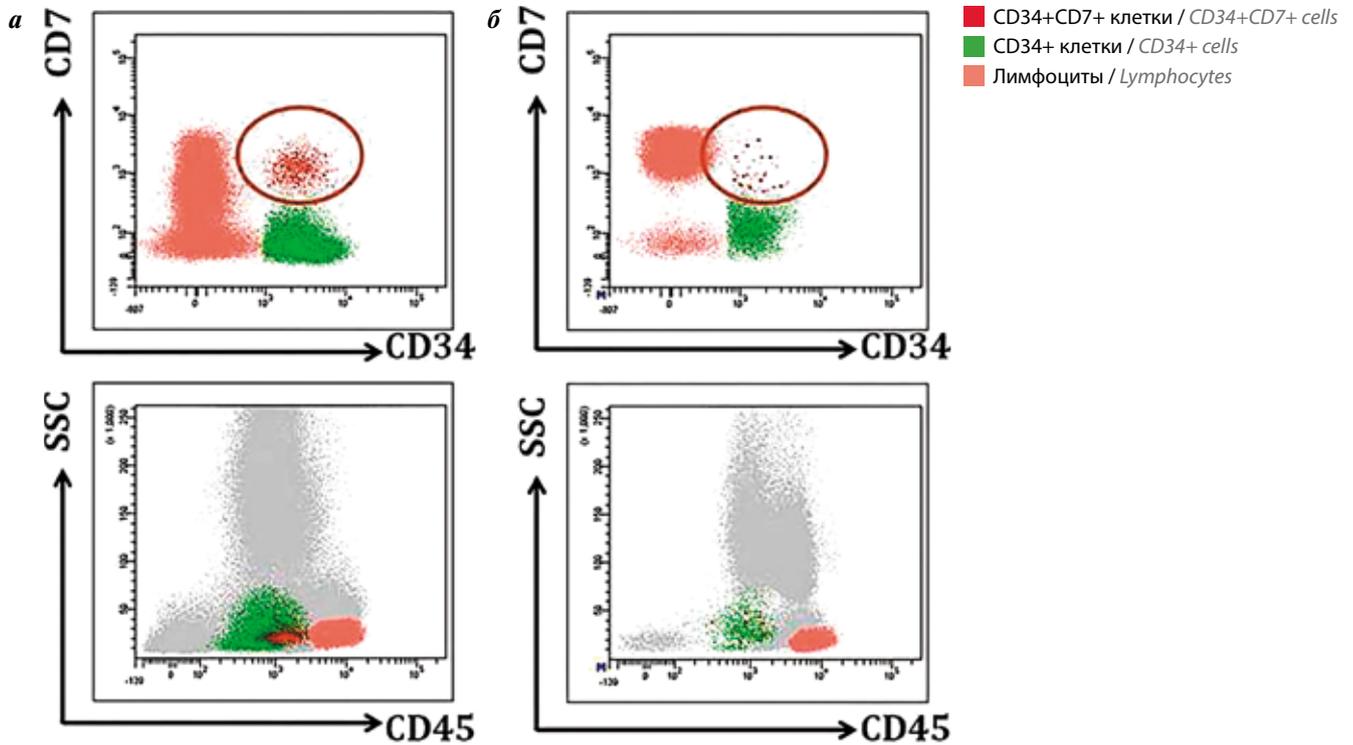


Рис. 1. Пример обнаружения $CD34+$ бластных клеток у пациента с ОМЛ (а) с нелинейной коэкспрессией лимфоидного маркера $CD7$. Для сравнения показаны точечные диаграммы клеточных субпопуляций здорового донора (б). Фото авторов
 Fig. 1. An example of $CD34+$ blast cells detection in AML patient (a) with nonlinear co-expression of $CD7$ lymphoid marker. For comparison, the dot diagrams of healthy donor cell subpopulations (b) are shown. Photo submitted by the authors

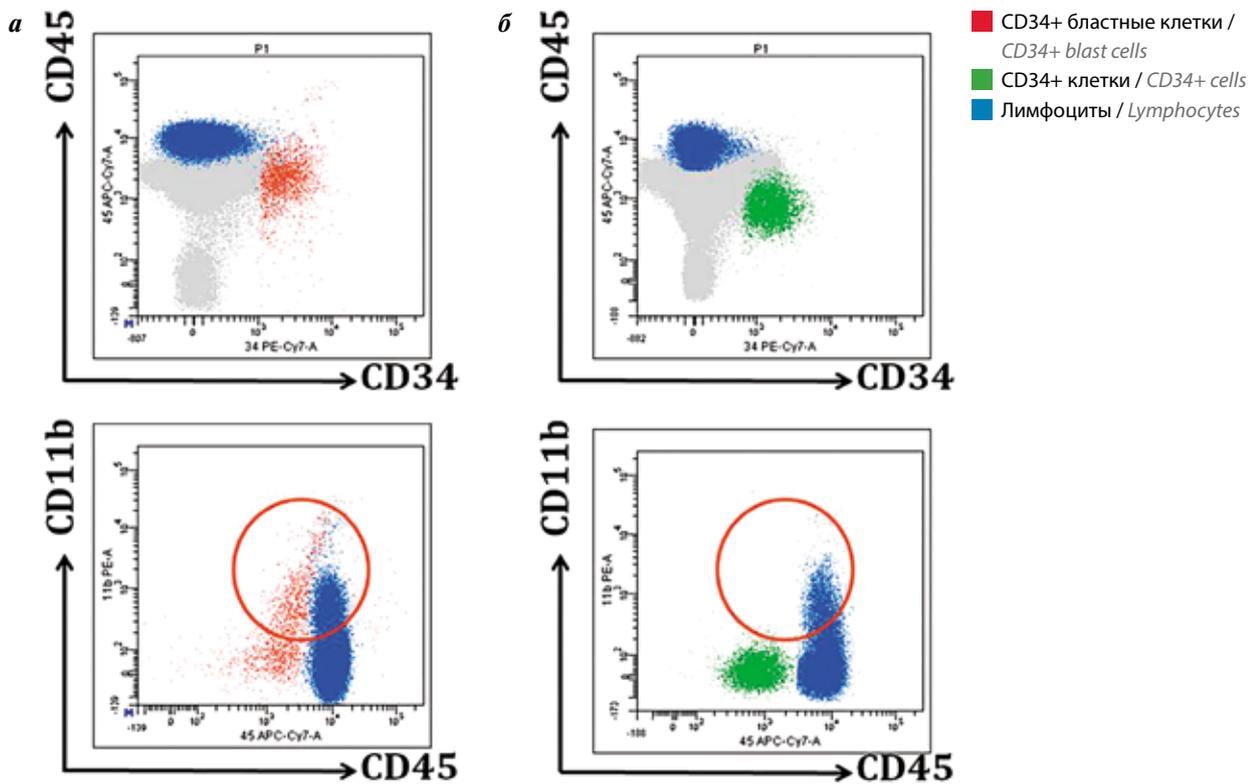


Рис. 2. Пример обнаружения части $CD34+$ бластных клеток у пациента с ОМЛ (а) с асинхронной коэкспрессией «зрелого» маркера $CD11b$. Для сравнения показаны точечные диаграммы клеточных субпопуляций здорового донора (б). Фото авторов
 Fig. 2. An example of a portion of $CD34+$ blast cells detection in a patient with AML (a) with asynchronous co-expression of the «mature» $CD11b$ marker. For comparison, the dot diagrams of healthy donor cell subpopulations (b) are shown. Photo submitted by the authors

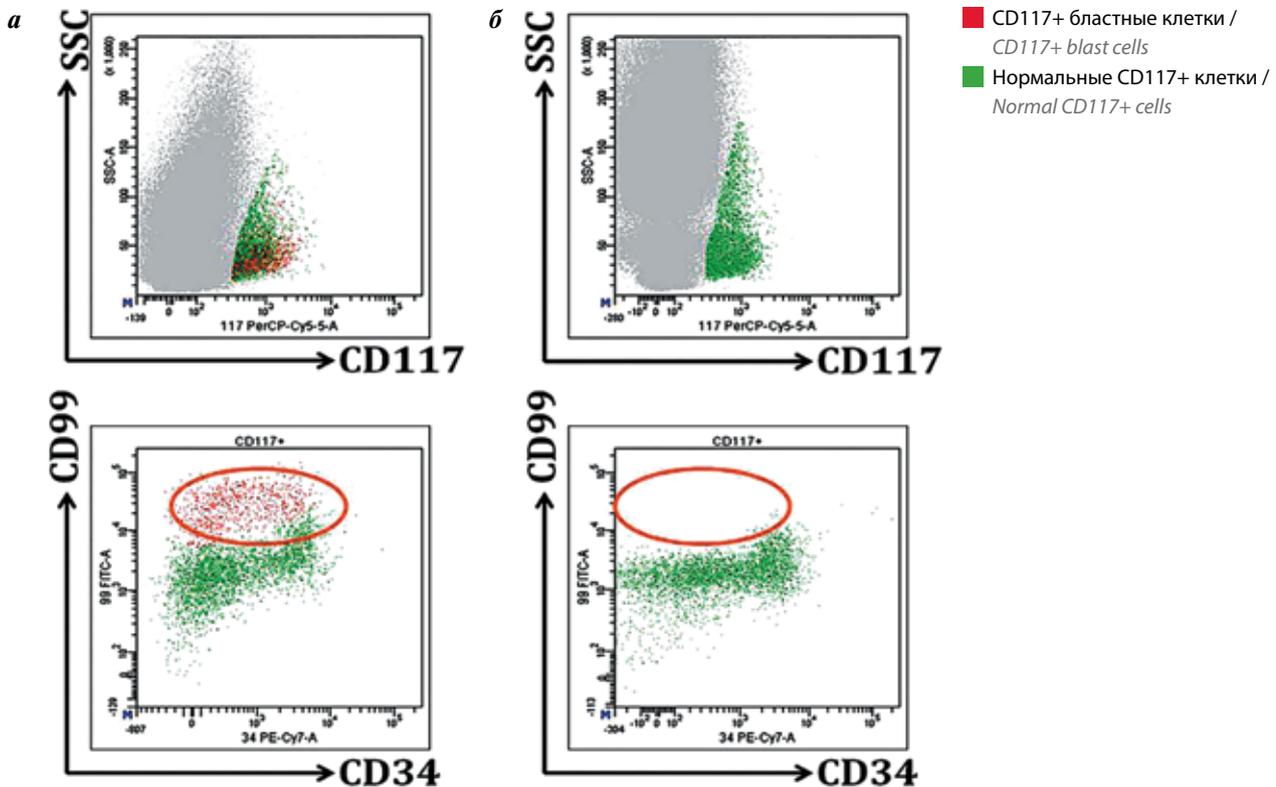


Рис. 3. Пример обнаружения CD117+ бластных клеток у пациента с ОМЛ (а) с аномальным паттерном CD34 vs CD99. Для сравнения показаны точечные диаграммы клеточных субпопуляций здорового донора (б). Фото авторов
 Fig. 3. An example of CD117+ blast cells detection in a patient with AML (a) with an abnormal CD34 vs CD99 pattern. For comparison, the dot diagrams of healthy donor cell subpopulations (b) are shown. Photo submitted by the authors

этапах. Также этот подход требует наличия стандартизированной панели антител. Учитывая достоинства и недостатки двух методов, на практике часто прибегают к их сочетанию для более полного анализа МОБ [39].

Количественным результатом исследования МОБ является доля опухолевых клеток от всех ядросодержащих клеток или лейкоцитов. При этом опухолевые клетки должны составлять гомогенную популяцию клеток со схожими характеристиками экспрессии антигенов и показателей светорассеяния. Минимальное количество клеток, составляющее популяцию, устанавливается внутрилабораторно и в разных протоколах может отличаться (обычно это количество варьирует в пределах от 20 до 100 клеток). Если такая популяция не найдена, то делают заключение о том, что МОБ не выявлена [35, 36].

Чувствительность метода МПЦ устанавливается при каждом анализе и напрямую зависит от количества проанализированных клеток. Для ее расчета необходимо установить минимальное количество клеток, которое составляет популяцию. Если минимальной была принята популяция, состоящая из 20 клеток, то чувствительность определяется таким образом: 20, деленное на количество подсчитанных клеток и умноженное на 100 %. Если среди всех клеток не обнаружено 20 лейкоэмических клеток, то делается заключение,

что МОБ не выявлена при достигнутой чувствительности анализа. При этом имеется вероятность наличия МОБ, но ниже, чем достигнутый порог чувствительности. Таким образом, когда найдены опухолевые клетки, формирующие популяцию, то в заключении указывается количественное значение МОБ. Если опухолевые клетки не найдены, то в заключении необходимо указать чувствительность анализа и количество проанализированных ядросодержащих клеток или лейкоцитов.

Есть несколько факторов, снижающих чувствительность и специфичность метода МПЦ. Во-первых, после ХТ развивается глубокая панцитопения и КМ характеризуется низкой клеточностью, поэтому проанализировать достаточное количество клеток проблематично. Во-вторых, известен феномен «иммунофенотипического сдвига» — изменения фенотипа лейкоэмических клеток в течение терапии, что затрудняет их поиск и нередко приводит к ложноотрицательным результатам [37, 40].

«Имунофенотипический сдвиг» и «универсальный» маркер минимальной остаточной болезни

Согласно результатам исследований изменения в иммунофенотипе лейкозных клеток обнаруживаются как на фоне лечения, так и в момент рецидива. В литературе очень мало данных о феномене смены ЛАИФ в период индукции и консолидации ОМЛ. Основные

исследования посвящены изучению иммунофенотипа лейкозных клеток в рецидиве и при рефрактерном течении ОМЛ [38, 39].

По данным разных авторов, в период рецидива «дебютный» ЛАИФ может измениться у 16–91 % пациентов. М. Ваег и соавт. показали, что у 91 % пациентов с ОМЛ в рецидиве заболевания иммунофенотип бластных клеток изменяется, но это не было связано с прогнозом заболевания. При этом оценивались как полное изменение опухолевой популяции, так и приобретение/потеря каждого из антигенов на прежней популяции бластных клеток. Только у 9 % больных выявлялся абсолютно идентичный первичному ЛАИФ в рецидиве заболевания [41]. D. Voskova и соавт. описали смену иммунофенотипа опухолевой популяции и молекулярных маркеров у 49 пациентов с рецидивом ОМЛ. На основании изменений лейкоэмического иммунофенотипа больные были разделены на группы: 1-я группа – без изменения первичного ЛАИФ в момент развития рецидива (у 55 %), 2-я – с сохранением хотя бы одного дебютного аномально экспрессирующегося антигена в рецидиве (20 %) и 3-я группа – с полной сменой дебютного иммунофенотипа (25 %). Между группами наблюдались различия в изменении молекулярных маркеров (18 %, 0 % и 86 %, $p = 0,002$), но не в цитогенетических аномалиях (15 %, 20 % и 25 %, незначимо) [42].

Смена антигенного профиля также была продемонстрирована при рефрактерных ОМЛ. В 2013 г. W. Cui и соавт. исследовали 47 пациентов с рефрактерными ОМЛ и их рецидивами. В дебюте заболевания среднее количество аномально экспрессирующихся антигенов составило 2–3 для каждого пациента. Наиболее часто встречались отсутствие линейно-ассоциированного антигена (CD13, CD33 – у 22 % больных), а также асинхронная экспрессия CD117 и CD11b, CD34 и CD11b – у 18 % и 16 % больных соответственно. В рефрактерных ОМЛ наиболее часто наблюдались aberrantная экспрессия CD7 и CD56 (20 % и 9 % соответственно) на миелобластных клетках, асинхронная CD11b на CD34+ либо CD117+. В большинстве случаев рефрактерных ОМЛ и их рецидивов имелись различные модификации иммунофенотипа (от изменения экспрессии одного маркера до полной смены иммунофенотипа). При этом каждый маркер учитывали в анализе. У небольшого процента больных (27 % рефрактерных и 16 % с рецидивом ОМЛ) полностью сохранялся первичный иммунофенотип. А наиболее часто изменяющимися маркерами были CD13 (19 %), CD33 (16 %), CD7 (12 %). Среди рефрактерных больных только в 14 % случаев обнаруживались изменения цитогенетических перестроек [43]. В ходе исследования ОМЛ у детей было отмечено, что в рецидиве заболевания иммунофенотип лейкозных клеток становится незрелым («теряется» CD14, CD11b, CD15) [44].

Чтобы охватить все потенциальные изменения иммунофенотипа, необходимо использовать комплексную

стандартизированную панель антител, позволяющую определить как можно больше aberrantно экспрессирующихся антигенов, составляющих ЛАИФ в дебюте заболевания.

На сегодняшний день трудности в определении МОБ при ОМЛ определяют поиск «универсального» маркера МОБ или «универсального» сочетания МКА. Миелоидный ингибиторный С-лектин CLL-1 экспрессируется в 90 % случаев ОМЛ в его дебюте и считается достаточно стабильным маркером. CD123 также часто наблюдается в дебюте, но не является строго специфичным для ОМЛ. Сочетание CLL-1+/CD123+ на бластных клетках CD34+/CD117+ не меняется в ходе терапии, остается после индукционных курсов ХТ и в момент рецидива. Доля CLL-1+/CD123+ клеток после индукции и консолидации выше медианы доли этой популяции в регенерирующем КМ и была ассоциирована с риском возникновения рецидива [45, 46]. Другим полезным для диагностики МОБ маркером может быть CD87 (урокиназный рецептор активации плазминогена), выявляемый в 80 % CD34+ ОМЛ. Среди нормальных гемопоэтических клеток КМ CD87 экспрессируется на некоторых миелоидных предшественниках, моноцитах и до 0,2 % CD34+ клеток. M. Graf и соавт. описали взаимосвязь гиперэкспрессии CD87 на бластных клетках с более короткой БРВ и низкой частотой достижения ремиссии у таких больных [47], однако не во всех клинических исследованиях по изучению CD87 доказана его роль прогностического маркера [47, 48].

Пороговые значения, прогностическая значимость и клиническое применение исследования минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии

Необходимо отметить, что пороговые величины чувствительности детекции МОБ и ее пороговые значения – различные понятия. Пороговое значение чувствительности представляет собой лабораторный показатель того, какую минимальную величину МОБ возможно определить в ходе конкретного анализа у конкретного пациента. В разных протоколах лечения приняты различные пороговые значения МОБ в зависимости от контрольной точки исследования (определяемые конкретным протоколом терапии), а также применяемого метода (МПЦ или ПЦР). Эти значения позволяют разделить пациентов на группы риска. Чтобы оценить влияние показателя МОБ на частоту возникновения рецидивов, используют анализ выживаемости и рассчитывают значения МОБ, по которым можно выделить больных с разными рисками развития рецидива. В табл. 3 суммированы данные по пороговым значениям МОБ, использованным в различных исследованиях. Кинетика редукции опухолевого клона служит важным независимым прогностическим фактором на ранних и поздних этапах ХТ, а также в период поддерживающего лечения в определенном

Таблица 3. Сравнительный анализ исследования МОР в различных исследованиях протоколов ОМЛ взрослых и детей
 Table 3. Comparative analysis of the MRD study by MFC in various research adults and children AML protocols

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогнозное значение МОР MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследования МОР в педиатрических протоколах лечения ОМЛ Comparative analysis of the MRD study in pediatric AML protocols							
Coustan-Smith et al. (2003) [67]	46	КМ BM	После индукции 1+2 After induction 1+2	Да Yes	Цитогенетика, число лейкоцитов Cytogenetics, leukocytes number	2-летняя ОВ после 1 индукции 33,1 vs 72 %, 31,7 % vs 80 % после 2 индукции 2-year OS after 1 st induction 33.1 vs 72 %; after 2 nd induction 31.7 % vs 80 %	0,1 % 0.1 %
Sievers et al. (2003) [66]	252	КМ BM	После консолидации After consolidation	Да Yes	Возраст, пол, этническая принадлежность, гепатоспленомегалия, число лейкоцитов Age, gender, ethnicity, hepatosplenomegaly, leukocytes number	3-летняя ОВ 41% vs 69% после окончания консолидации 3-year OS 41 % vs 69 % after the end of consolidation	0,5 % 0.5 %
Langbrake et al. (2006) [68]	150	КМ BM	28-й день после индукции 1 28 day after 1 st induction	Нет No	Вариант по FAB, цитогенетика, процент бластов на 15-й день FAB variant, cytogenetics, percentage of blast cells on day 15	3-летняя БРВ 71 % vs 48 % 3-year RFS 71 % vs 48%	0,1 % 0.1 %
Rubnitz et al. (2010) [52]	230	КМ BM	После индукции 1+2 After induction 1+2	Да Yes	Благоприятный цитогенетический риск, возраст, FLT3-ITD Favorable cytogenetic risk, age, FLT3-ITD	3-летняя БРВ (73,6 % vs 43,1 % после 1-й индукции, 71,2 % vs 35,8 % после 2-й индукции) 3-year EFS (73.6 % vs 43.1 % after 1 st induction, 71.2 % vs 35.8 % after 2 nd induction)	0,1 % 0.1 %
Loken et al. (2012) [65]	340	КМ BM	После индукции 1+2, после консолидации After induction 1+2, after consolidation	Только для БРВ Only for RFS	Молекулярный риск, цитогенетический риск, число лейкоцитов Molecular risk, cytogenetic risk, leukocytes number	После 1-й индукции БРВ 24 % для МОР 0-1 % vs 36 % для МОР ≥1 % и 65 % для МОР-негативного значения, БРВ 29 % vs 65 % после 2-й индукции, БРВ 17 % vs 62 % в консолидации After 1 st induction, the RFS 24 % for MRD 0-1 % vs 36 % for MRD ≥1 % and 65 % for MRD negative. RFS 29 % vs 65 % after 2 nd induction, RFS 17 % vs 62 % for consolidation	0-1 %, ≥1 % 0-1 %, ≥1 %
Tierens et al. (2015) [64]	101	КМ BM	После индукции 1 и 2 After 1 st and 2 nd induction	Да Yes	Возраст, пол, число лейкоцитов, молекулярный риск Age, gender, leukocytes number, molecular risk	БРВ: 22 % vs 65 %, ОВ 51 % vs 77 % После 2-й индукции: БРВ 11 % vs 57 %, ОВ 28 % vs 78 % RFS: 22 % vs 65 %, OS 51 % vs 77 % After 2 nd induction RFS 11 % vs 57 %, OS 28 % vs 78 %	0,1 % 0.1 %

Продолжение таблицы 3
Continuation of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогноза значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследования МОБ в педиатрических протоколах лечения ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in pediatric AML protocols</i>							
Buldini et al. (2017) [55]	142	КМ BM	После индукции 1-й и 2-й After 1 st and 2 nd induction	Да Yes	Возраст, пол, вариант ОМЛ по FAB-классификации, инициальное число лейкоцитов, цитогенетическая группа риска Age, gender, AML variant according to FAB classification, initial number of leukocytes, cytogenetic risk group	<0,1 %; 0,1-1 % и ≥1 %; 8-летняя БРВ составила 73 ± 5,6%, 37,8 ± 12,1% и 34 ± 8,8%; ОВ при МОБ <0,1 % и ≥0,1 %: 82,2 и 51,6 % После 2-й индукции: БРВ 68,4 ± 7,9 %; 20,1 ± 2 % и 23,8 ± 1,2 %; ОВ 77,1 % и 55,5 % <0,1 %; 0,1-1 % и ≥1 %; 8-years RFS 73 ± 5,6 %, 37,8 ± 12,1 % and 34 ± 8,8 %; OS with MRD < 0.1 % and ≥0.1 %: 82.2 % and 51.6 % After 2 nd induction: RFS – 68.4 ± 7.9 %; 20.1 ± 2 % and 23.8 ± 1.2 %; OS 77.1 % and 55.5 %	0,1 % 0,1 %
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
Гальцева И.В. (1997) [61]	37	КМ BM	Индукция 2 или консолидация 1 в зависимости от достижения ремиссии Induction 2 or consolidation 1 depending on the remission achievement	Да Yes	Вариант ОМЛ, вариант терапии, возраст, пол, достижение ремиссии AML variant, treatment option, age, gender, remission achievement	БРВ более 6 мес у пациентов с МРБ негативным статусом (короткий период наблюдения) RFS more than 6 months in patients with MRD negative status (short observation period)	0,12 % 0,12 %
San Miguel et al. (1997) [8]	53	КМ BM	Окончание индукции и интенсификации терапии End of induction and intensification therapy	Да Yes	Число лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобин, число бластов, возраст, иммунофенотип Number of leukocytes, platelets, hemoglobin, number of blasts, age, immunophenotype	БРВ после индукции 17 мес vs не достигли, интенсификация: 16 мес vs не достигли, ОВ 25 мес vs не достигли RFS after induction – 17 months vs did not achieved, intensification: 16 months vs did not achieved, OS 25 months vs did not achieved	0,5 %; индукция, 0,2 % консолидации induction, 0,2 % consolidation

Продолжение таблицы 3
Continuation of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогноза значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
San Miguel et al. (2001) [69]	126	КМ BM	Окончание индукции End of induction	Да Yes	Цитогенетика, число курсов до ПР, число лейкоцитов Cytogenetics, the number of courses before CR, leukocytes number	3-летняя БРВ 14, 50 и 84 % в группах МОБ более 1 %, от 0,01-1 и менее 0,01 %, ОВ – 29, 62 и 90 % 3-years RFS of 14 %, 50% and 84 % in MRD groups “more than 1 %”, “0,01-1” and “less than 0,01 %”, OS 29 %, 62 % and 90 %	0,01-1 % 0,01-1 %
Bussicano et al. (2006) [5]	100	КМ BM	Окончание индукции и консолидации End of induction and consolidation	Только после консолидации Only after consolidation	Цитогенетика, иммунофенотип, возраст, число лейкоцитов Cytogenetics, immunophenotype, age, leukocytes number	БРВ 71 % vs 13 %, ОВ 64 % vs 16 % после консолидации RFS 71 % vs 13 %, OS 64 % vs 16 % after consolidation	0,035 % 0.035 %
Maurillo et al. (2008) [6]	142	КМ BM	После индукции 1 и после консолидации After 1 st induction and after consolidation	Только после консолидации Only after consolidation	Цитогенетика, иммунофенотип Cytogenetics, immunophenotype	5-летняя БРВ 60 % vs 16 %, ОВ 62 % vs 23 % 5-year RFS 60 % vs 16 %, OS 62 % vs 23 %	0,035 % 0.035 %
Vendetti et al. (2000) [51]	56	КМ BM	После индукции 1 и после консолидации After 1 st induction and after consolidation	Только после консолидации Only after consolidation	Цитогенетика, иммунофенотип Cytogenetics, immunophenotype	77 % vs 17 % развитие рецидивов, ОВ более 10 мес vs не достигли Relapses – 77 % vs 17 %, OS more than 10 months vs did not achieved	0,035 % 0.035 %
Terwijn et al. (2013) [9]	517	КМ BM	После 1-го, 2-го курсов индукции, после консолидации After 1 st and 2 nd induction, after consolidation	Важность после 2-го курса индукции Importance after 2 nd course of induction	Цитогенетика, вариант ОМЛ, достижение ПР, число лейкоцитов, возраст, вариант консолидации Cytogenetics, AML variant, CR achievement, leukocytes number, age, variant of consolidation	БРВ 45 vs 70 % RFS 45 vs 70 %	0,1 % 0.1 %

Продолжение таблицы 3
Continuation of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогностическое значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
Kern et al. (2004) [62]	1054	КМ BM	После консолидации After consolidation	После индукции и консолидации для БРВ After induction and consolidation for RFS	Цитогенетика, число лейкоцитов, число бластов Cytogenetics, number of leukocytes, number of blasts	БРВ 83,3 % vs 25,7 %, ОВ 87,5 % vs 51,4 %, RFS 83.3 % vs 25.7 %; OS 87.5 % vs 51.4 %	75-й перцентиль от логарифмической разницы The 75 th percentile of the logarithmic difference
Kern et al. (2004) [49]	106	КМ BM	День 16 (индукция) Day 16 (induction)	Да Yes	Цитогенетика, наличие FLT3, вторичный ОМЛ Cytogenetics, presence of FLT3, secondary AML	2-летняя БРВ 65 % vs 30 %, ОВ 58 % vs 43 % 2-years RFS 65% vs 30 %; OS 58 % vs 43 %	Логарифмическая разница = 2,11 Logarithmic difference = 2.11
Al-Mawali et al. (2009) [7]	54	КМ BM	После индукции и консолидации After induction and consolidation	Только после индукции Only after induction	Число лейкоцитов, вариант по FAB Leukocytes number, FAB variant	Количественные значения не приведены Quantitative values are not available	0,15 % 0,15 %
Maurillo et al. (2007) [58]	50	КМ и ПК BM and PB	После индукции и консолидации After induction and consolidation	После консолидации для развития рецидивов After consolidation for development of relapses	Число лейкоцитов, иммунофенотип Leukocytes number, immunophenotype	77 % рецидивов с МОБ-позитивным статусом после индукции vs 0; 82 % рецидивов после консолидации vs 0 77 % relapses with MRD-positive status after induction vs 0; 82 % relapse after consolidation vs 0	0,015 % 0,015 %
Chen et al. (2015) [63]	245	КМ BM	После индукции After induction	Корреляция ответа на терапию и значения МОБ Correlation of therapy response and MRD value	Цитогенетика, молекулярные маркеры Cytogenetics, molecular markers	71 % в PR имели меньшие значения МОБ, в сравнении 19,6 % с PR и полным восстановлением тромбоцитов и 9,4 % в PR без восстановления нейтрофилов 71 % in CR had smaller MRD values, compared to 19.6% with PR and incomplete platelet recovery and 9.4 % in PR without neutrophils recovery	Любое положительное значение Any positive value

Окончание таблицы 3
End of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогностическое значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
Vidriales et al. (2015) [50]	306	КМ BM	После индукции After induction	Да Yes	Цитогенетика, возраст, число лейкоцитов Cytogenetics, age, leukocytes number	БРВ: 38, 50 и 71 % RFS 38 %, 50 % and 71 %	≥0,1 %; ≥0,01–0,1 %; и <0,01 % ≥0,1 %; ≥0,01–0,1 % and <0,01 %
Lacombe et al. (2017) [54]	276	КМ BM	После индукции, перед 2-й консолидацией After induction, before 2 nd consolidation	Да Yes	Возраст, цитогенетика Age, cytogenetics	БРВ: 68 % vs 20 %, ОВ: 70 % vs 32 % RFS: 68 % vs 20 % OS: 70 % vs 32 %	0,05 % 0,05 %
Minetto et al. (2018) [56]	120	КМ BM	После индукции After induction	Да Yes	Возраст, число лейкоцитов, тромбоцитов, цитогенетика, вариант ОМЛ Age, number of leukocytes, platelets, cytogenetics, AML variant	5-летняя БРВ: 71 % <0,01 % vs 38 % (≥0,1 %) 5-years RFS: 71 % – <0,01 % vs 38 % – ≥0,1 %	0,1 % и 0,01 % 0,1 % and 0,01 %

Примечание: БРВ – безрецидивная выживаемость; МОБ – минимальная остаточная болезнь; ОВ – общая выживаемость; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ПР – полная ремиссия; КМ – костный мозг; ПК – периферическая кровь.
Note: RFS – relapse-free survival; MRD – minimal residual disease; OS – overall survival; AML – acute myeloid leukemia; CR – complete remission; BM – bone marrow; PB – peripheral blood.

протоколе терапии. В многочисленных исследованиях показаны важность достижения МОБ-негативного статуса на ранних этапах терапии и ассоциация МОБ с долгосрочными результатами — БРВ и ОВ. В работе W. Kern и соавт. в участии 106 пациентов с ОМЛ в ранние сроки после индукции (на 16-й день) показано, что значения МОБ влияют на длительность 2-летней ОВ (58 % против 43 %, $p = 0,0133$), БРВ (53 против 2,8 мес, $p < 0,0001$) и вероятность сохранения ремиссии (81 % против 51 %, $p = 0,002$). При этом пороговым уровнем МОБ считалось 2-кратное логарифмическое снижение количества опухолевых клеток в сравнении с дебютом [49]. Коллектив испанских ученых в 2015 г. исследовал МОБ-статус у 306 больных ОМЛ в ПР, которым проводили одинаковые курсы ХТ. Группы прогноза для благоприятного, промежуточного и плохого цитогенетического риска — 12 %, 72 % и 16 % соответственно. Пороговым значением была МОБ $< 0,1$ % и исследовалась после 1-го курса индукции. Показано, что ранняя оценка МОБ-статуса позволяет разделить больных на дополнительные группы в плане прогноза. Пятилетняя БРВ при значениях МОБ $< 0,01$ %, от 0,01 % до 0,1 % и $\geq 0,1$ % составляла 71 %, 50 % и 38 % соответственно. Также оказалось, что МОБ-положительный статус ухудшал долгосрочные результаты в благоприятной цитогенетической группе (ЦГ), а МОБ-отрицательный в неблагоприятной ЦГ их улучшал [50]. Количественное значение МОБ после курсов консолидации также прогностически значимо. В ряде исследований пациенты, у которых не была выявлена МОБ после курсов консолидации, имели меньший риск развития рецидива и лучшие показатели ОВ и БРВ по сравнению с имеющими детектируемую МОБ после индукции [5, 6, 51]. В работе A. Venditti и соавт. с участием 56 пациентов с ОМЛ 34 из них (моложе 60 лет) лечили согласно протоколу AML-10, а лиц старше 60 лет ($n = 22$) — по протоколу AML-13. Исследования МОБ проводили после индукционного и после каждого консолидирующего курсов, перед аллоТКМ, а также на протяжении последующих 2 лет каждые 3 мес. У пациентов с МОБ-положительными и МОБ-негативными результатами после индукции различий в вероятности развития рецидива ОВ и БРВ не было. Для последующей оценки МОБ после консолидации использовался порог 0,035 %, в зависимости от которого риск развития рецидива у пациентов составил 77 и 17 % ($p = 0,001$). Интересно, что частота МОБ-положительных результатов после консолидации была выше в группе цитогенетически неблагоприятного и промежуточного рисков. Длительность БРВ и ОВ строго коррелировала с МОБ-статусом после консолидации (7 мес против «медиана не достигнута», и 10 мес против «медиана не достигнута» соответственно). У 70 % пациентов с выявленной МОБ перед аллоТКМ констатировали рецидив после трансплантации, а в группе без МОБ — лишь у 28 % участников ($p = 0,031$) [51]. В работе F. Bussicano с участием 100

первичных больных с ОМЛ также исследовали кинетику редукции опухолевой популяции, при этом задача исследования заключалась в том, чтобы установить оптимальную точку исследования МОБ и ее пороговое значение. Оказалось, что МОБ $\geq 0,035$ % наиболее прогностически значима в период после окончания курсов консолидации, а не после индукции. Пациенты, которые достигали МОБ-негативности только после консолидации, имели те же БРВ и ОВ, что и сразу достигшие отрицательных значений МОБ после 1-го курса. После консолидации 61 % больных были МОБ-положительны, из них в 84 % случаев в течение 15 мес диагностирован рецидив ОМЛ, а у пациентов с МОБ-негативным статусом — только в 25 % случаев ($p < 0,001$). БРВ и ОВ составили 71 % и 64 % в группе МОБ-негативных больных после консолидации и 13 % и 16 % в группе МОБ-положительных ($p < 0,0001$) [5]. При исследовании МОБ при ОМЛ в педиатрической группе после 1-го и 2-го курсов индукции также показано влияние размера опухолевого клона на прогноз заболевания, но только после 2-го индукционного курса: долгосрочные результаты (ОВ, БРВ) у пациентов со значением МОБ $< 0,1$ % после второй индукции и с МОБ-негативным статусом не различались. Пациенты с МОБ более 1 % после 1-го курса индукции имели значимо худшие показатели ОВ и БРВ независимо от степени цитогенетического риска [52]. В 2010 г. при ретроспективном анализе данных 143 взрослых больных ОМЛ выявлено, что положительный результат МОБ, определенный методом МПЦ, на момент окончания консолидации имеет большую прогностическую значимость, чем исходные цитогенетический и молекулярный риски. Так, у пациентов группы благоприятного цитогенетического риска — $t(8,21)$ и $inv(16)$ — с МОБ-положительным статусом после курсов консолидации 4-летняя БРВ составила 15 %, а у больных группы промежуточного риска с МОБ-негативным статусом — 70 % ($p < 0,001$). В этом исследовании показана роль дополнительной стратификации пациентов на группы риска: благоприятного и промежуточного цитогенетического прогноза, включающая МОБ-негативных лиц, а также группа высокого риска, куда вошли больные с благоприятным, промежуточным, плохим цитогенетическим прогнозом и МОБ-положительностью [53]. Проблему МОБ у взрослых пациентов с ОМЛ изучают голландские исследователи, опубликовавшие в 2013 г. результаты первого мультицентрового проспективного исследования HOVON/SAAK [9]. У взрослых больных ОМЛ (18–60 лет) из 31 лечебного центра были исследованы образцы КМ в момент постановки диагноза, после 1-го и 2-го курсов индукции и после 2-й консолидации. Всем участникам проводили лечение согласно стандартному протоколу. Пациенты, у которых в контрольной точке 2 (после второй индукции) МОБ составила более 0,1 %, имели худшие показатели ОВ и БРВ ($p < 0,001$ %). Основная идея этого исследования состояла в предложении относить пациентов

из промежуточной группы риска с МОБ-положительными результатами в группу плохого прогноза и проводить им аллоТКМ [9]. В относительно недавно опубликованном крупном проспективном исследовании F. Lacombe и соавт. также изучалась прогностическая значимость МОБ методом МПЦ у 276 пациентов в ПР (из них 23 – дети младше 16 лет). В этом исследовании, проводившемся с 2006 по 2011 г., участвовали 17 клинических центров Франции, была разработана единая панель МКА (10 пробирок 5-цветной комбинации), а точками определения МОБ были окончание индукции, начало 2-й консолидации и окончание лечения. Все данные анализировали централизованно, что исключало различные интерпретации полученных результатов. Чтобы достичь чувствительности анализа 5×10^{-5} , у каждого пациента «собирали» как минимум 250 000 событий. Оказалось, что уровень МОБ $<0,05$ % прогностически значим (для ОВ и БРВ, $p = 0,0001$) в каждой точке его определения независимо от проводимого курса ХТ. Интересно, что из 184 пациентов, которым был выполнен цитогенетический анализ (из них 15 % благоприятного прогноза, 74 % – промежуточного и 11 % – неблагоприятного), МОБ-статус в группе неблагоприятного прогноза оказывал влияние на долгосрочные результаты. Несмотря на то что 148 (54 %) больных в ходе исследования во всех точках имели отрицательные значения МОБ, у 31 (21 %) из них диагностирован рецидив заболевания [54]. Исходя из данных нескольких исследований, можно сделать вывод, что МОБ-диагностика – независимый фактор прогноза и, возможно, более важный маркер долгосрочного прогноза, чем ЦГ группы риска.

Проводя сравнение по изучению МОБ-статуса методом МПЦ у взрослых и детей, необходимо упомянуть исследование В. Buldini и соавт., результаты которого опубликованы в 2017 г. Итальянские ученые ретроспективно анализировали МОБ у 142 детей с ОМЛ, леченных в соответствии с протоколом AIEOP-AML 2002/01 (2003–2011 гг.). Пороговое клинически значимое значение МОБ составляло 0,1 %, а точками исследования были период после 1-й и 2-й индукций. Оказалось, что при разделении пациентов на группы по МОБ-статусу после 1-го индукционного курса ХТ $<0,1$ %; $0,1-1$ % и ≥ 1 %, 8-летняя БРВ составила $73 \pm 5,6$ %, $37,8 \pm 12,1$ % и $34 \pm 8,8$ % соответственно ($p < 0,01$). При выявлении МОБ $\geq 0,1$ % после 1-го и 2-го курсов БРВ пациентов равнялась $22,8 \pm 8,9$ %; у больных с МОБ $<0,1$ % после 2-го курса БРВ была выше – $45,4 \pm 16,7$ %, $p = 0,037$. Восемилетняя ОВ для пациентов с МОБ $<0,1$ % и $\geq 0,1$ % после 1-го курса составила $82,2$ % и $51,6$ % соответственно ($p = 0,0005$). При анализе тех же данных после 2-го индукционного курса БРВ в трех группах составила $68,4 \pm 7,9$; $20,1 \pm 2$ и $23,8 \pm 1,2$ % соответственно ($p < 0,01$), ОВ – $77,1$ % и $55,5$ % соответственно ($p = 0,0275$). В связи с тем, что доля больных с МОБ-положительным статусом после индукционного курса высока (до 49 %), исследователи

на сегодняшний день изучают влияние интенсификации первого курса ХТ на редукцию значений МОБ, в частности у больных благоприятной группы риска [55].

P. Minetto и соавт. в публикации 2018 г. исследовали МОБ у 120 пациентов с ОМЛ после интенсивного 1-го индукционного курса с высокими дозами цитарабина и применением флударабина. МОБ после этого курса ХТ расценивали как наиболее прогностически значимую, показывая, что курсы с применением флударабина, вероятнее всего, имеют больший антилейкемический эффект. При этом пороговое значение МОБ составило 0,025 %, а 3-летняя вероятность развития рецидива – 65 % и 10,6 % для МОБ-положительных и МОБ-негативных пациентов. Кроме того, авторы отмечают, что именно ранняя оценка МОБ позволяет вовремя изменить тактику лечения, а пациентов из группы промежуточного прогноза при МОБ-негативности причислить к группе благоприятного риска и не выполнять аллоТКМ в первой ПР [56].

Таким образом, суммируя данные многочисленных исследовательских групп, приведенные в табл. 3, необходимо отметить, что исследование МОБ методом МПЦ в комбинации с другими общеизвестными факторами прогноза у больных ОМЛ дает возможность более точно разделить больных на группы риска. Особенно важно выполнение этого исследования у пациентов группы промежуточного цитогенетического риска, не имеющих молекулярных маркеров-мишеней. Несмотря на различные протоколы терапии, точки исследования, пороги обнаружения и различную чувствительность, МОБ-статус остается важным критерием химиочувствительности, а его определенные значения ассоциированы с вероятностью наступления рецидива заболевания. МОБ сохраняет свою значимость и в различных ЦГ и при разных химиотерапевтических подходах, а также в период посткурсовой аплазии КМ [57]. Для улучшения долгосрочных результатов у пациентов с ОМЛ и положительным МОБ-статусом необходимы новые исследования и терапевтические подходы для редукции остаточного опухолевого клона.

Пока принципы терапии, основанной на оценке МОБ методом МПЦ, для взрослых больных ОМЛ не разработаны (как, например, для острых лимфобластных лейкозов). До сих пор нет абсолютной уверенности в том, нужна ли такая терапия пациентам с ОМЛ. В ходе исследования L. Maurillo показано, что использование высокодозной ХТ никак не влияет на скорость редукции МОБ, а также приводит к ее повышенным количественным значениям в сравнении с МОБ пациентов, получавших стандартные дозы химиопрепаратов. Пятилетняя ОВ у больных с МРБ-негативным статусом, принимающих стандартные и высокие дозы цитарабина, составляла 60 % и 30 % соответственно ($p = 0,007$) [58]. Терапевтическая тактика интенсификации терапии в зависимости от результатов МОБ не подтверждена у взрослых больных ОМЛ

и, следовательно, не улучшает прогноз заболевания. Кроме того, такая терапия высокотоксична и увеличивает риск развития тяжелых грибковых осложнений [52]. Введение высоких доз цитарабина у взрослых и детей никак не отразилось на уменьшении значения МОБ после курсов ХТ (PEDIATRIC CLINICAL TRIAL 2002–2008 гг.). В каждом конкретном случае необходимо разрабатывать индивидуальную тактику ведения больного. Например, риск-адаптивная терапия для детей с ОМЛ заключалась в раннем (на 22-й день терапии) выявлении МОБ (при $\text{МОБ} \geq 1\%$) и сопряженным с этим ранним началом следующего курса ХТ в сочетании с таргетными препаратами (гемтузумаб озогамидин), что позволило снизить частоту развития рецидивов в данном исследовании [52].

Корреляция методов определения минимальной остаточной болезни

Одновременное использование методов ПЦР и МПЦ для мониторинга МОБ помогает понять клиническую значимость каждого метода. В процессе педиатрического исследования было показано, что среди пациентов группы благоприятного цитогенетического риска (*RUNX1-RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11*) только 10,7 % были МОБ-позитивными по результату МПЦ, а среди пациентов с *FLT3-ITD* – до 78 % [52]. В ходе мультицентрового исследования AML02 выяснилось, что у 99 % пациентов с отрицательными значениями МОБ, определенной методом МПЦ, не выявлены химерные транскрипты *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *KMT2A*. Девятнадцать из 197 (9,6 %) ПЦР-позитивных по *AML1-ETO* и *CBFβ-MYH11* образцов были позитивными методом МПЦ и в 8 из 13 *KMT2A*-позитивных образцов МОБ определялась и методом МПЦ [59]. J. Ouyang и соавт. провели исследование МОБ у пациентов с ОМЛ после первой индукции методом МПЦ и методом ПЦР с обратной транскрипцией по химерным транскриптам *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11*. В данной работе показано, что при разделении больных на группы по количественному значению МОБ методом ПЦР в группах со значениями от 0,1–1 % и от 1–10 % вероятность развития рецидива была одинаковой. При этом отмечено, что в группе со значением МОБ от 0,01 до 0,1 % риск развития рецидива минимален, а при количестве транскрипта более 10 % возник рецидив в 50 % случаев. Среди пациентов со значением транскрипта от 0,1 до 10 % вероятность развития рецидива была выше при положительном результате МОБ методом МПЦ, $p = 0,006$ [60].

Таким образом, количественное определение МОБ методом МПЦ у лиц с *CBFβ*-лейкозами дает возможность более четко делить больных на группы по вероятности развития рецидива и избегать назначения необоснованных повторных высокоинтенсивных курсов ХТ.

Заключение

На сегодняшний день исследование МОБ – это суррогатный маркер для быстрой оценки химиочувствительности и, соответственно, эффективности ХТ. У пациентов с ОМЛ с МОБ-позитивным статусом на различных этапах ХТ высока вероятность рецидива заболевания. Однако и при отрицательных значениях МОБ не исключается его развитие, что связано с несколькими причинами: гетерогенностью опухолевого клона, его изменчивостью, а также с недостаточно высокой чувствительностью метода. Мониторинг МОБ в настоящее время служит для оценки эффективности лечения, сравнения различных видов терапии, стратификации пациентов на группы риска, контроля за сохранением ремиссии и максимально раннего обнаружения рецидива. Мониторинг МОБ с помощью методов ПЦР и МПЦ внедрен в современные протоколы лечения больных ОМЛ. Около 60 % пациентов с ОМЛ не имеют молекулярной «метки» для ПЦР-диагностики, поэтому в подобных случаях оптимально использование метода МПЦ. Необходимо выделить наиболее значимые аномально экспрессируемые антигены бластных клеток в дебюте заболевания и отслеживать их при мониторинге МОБ. Однако, учитывая феномен «иммунофенотипического сдвига», важно оценить антигенные паттерны созревания и их соответствие нормальным (т. е. применение «метода пустых мест»). В ходе многочисленных исследований показано, что количественное значение МОБ в период индукции и консолидации ассоциировано с ОВ и БРВ, что позволяет разделить пациентов на группы риска. Остается главный вопрос: способна ли МОБ-направленная терапия улучшать прогноз заболевания? Принципы такой терапии до сих пор не разработаны. Дальнейшие исследования должны быть направлены на стандартизацию панели МКА для исследования МОБ при ОМЛ методом МПЦ, четкое определение сроков проведения мониторинга и пороговых значений в этих точках. При этом не следует недооценивать уровень квалификации и опыта сотрудников, занимающихся изучением проблемы МОБ при ОМЛ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Büchner T., Hiddemann W., Wörmann B. et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93(12):4116–24. PMID: 10361108.
- Rai K.R., Holland J.F., Glidewell O.J. et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: A study by Cancer and Leukemia Group B. *Blood* 1981;58(6):1203–12. PMID: 6946847.
- Ravandi F. Relapsed acute myeloid leukemia: Why is there no standard of care? *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26(3):253–59. DOI:10.1016/j.beha.2013.10.005. PMID: 24309527.
- Hokland P., Ommen H.B., Nyvold C.G., Roug A.S. Sensitivity of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia in first remission – Methodologies in relation to their clinical situation. *Br J Haematol* 2012;158(5):569–80. DOI:10.1111/j.1365-2141.2012.09203.x. PMID: 22738609.
- Buccisano F., Maurillo L., Gattei V. et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20(10):1783–89. DOI:10.1038/sj.leu.2404313. PMID: 16838027.
- Maurillo L., Buccisano F., Del Principe M.I. et al. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26(30):4944–51. DOI:10.1200/JCO.2007.15.9814. PMID: 18606980.
- Al-Mawali A., Gillis D., Lewis I. The use of receiver operating characteristic analysis for detection of minimal residual disease using five-color multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76(2):91–101. DOI:10.1002/cyto.b.20444. PMID: 18727068.
- San Miguel J.F., Martínez A., Macedo A. et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90(6):2465–70. PMID: 9310499.
- Terwijn M., Kelder A., Huijgens P.C. et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3889–97. DOI:10.1200/JCO.2012.45.9628. PMID: 24062400.
- Buckley S.A., Wood B.L., Othus M. et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Haematologica* 2017;102(5):865–73. DOI:10.3324/haematol.2016.159343. PMID: 28126965.
- Hourigan C.S., Karp J.E. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(8):460–71. DOI:10.1038/nrclinonc.2013.100. PMID: 23799371.
- Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354–65. DOI:10.1182/blood-2009-11-254441. PMID: 20385793.
- Krauter J., Gorlich K., Ottmann O. et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4413–22. DOI: 10.1200/JCO.2003.03.166. PMID: 14645432.
- Guerrasio A., Pilatrinio C., De Micheli D. et al. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia* 2002;16(6):1176–81. DOI: 10.1038/sj.leu.2402478. PMID: 12040450.
- Buonamici S., Ottaviani E., Testoni N. et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002;99(2):443–9. PMID: 11781223.
- Jourdan E., Boissel N., Chevret S. et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(12):2213–24. DOI: 10.1182/blood-2012-10-462879. PMID: 23321257.
- Scholl C., Breiting H., Schlenk R.F. et al. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22; q23) in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 2003;38(3):274–80. DOI:10.1002/gcc.10284. PMID: 14506704.
- Chendamarai E., Balasubramanian P., George B. et al. Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. *Blood* 2012;119(15):3413–9. DOI:10.1182/blood-2011-11-393264. PMID: 22374701.
- Gilliland G.D., Griffin J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100(5):1532–42. DOI:10.1182/blood-2002-02-0492. PMID: 12176867.
- Hayakawa F., Towatari M., Kiyoi H. et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19(5):624–31. DOI:10.1038/sj.onc.1203354. PMID: 10698507.
- Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L. et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(23):2209–21. DOI:10.1056/NEJMoa1516192. PMID: 27276561.
- Kottaridis P.D., Gale R.E., Langabeer S.E. et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: Implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002;100(7):2393–8. DOI:10.1182/blood-2002-02-0420. PMID: 12239147.
- Lindström M.S. NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem Res Int* 2011;2011:195–209. DOI:10.1155/2011/195209. PMID: 21152184.
- Schnittger S., Kern W., Tschulik C. et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood* 2009;114(11):2220–31. DOI:10.1182/blood-2009-03-213389. PMID: 19587375.
- Radomska H.S., Huettner C.S., Zhang P. et al. CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha Is a Regulatory Switch Sufficient for Induction of Granulocytic Development from Bipotential Myeloid Progenitors. *Mol Cell Biol* 1998;18(7):4301–14. PMID: 9632814.

26. Kirstetter P., Schuster M.B., Bereshchenko O. et al. Modeling of C/EBP α Mutant Acute Myeloid Leukemia Reveals a Common Expression Signature of Committed Myeloid Leukemia-Initiating Cells. *Cancer Cell* 2008;13(4):299–310. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.02.008. PMID: 18394553.
27. Su L., Gao S.J., Li W. et al. NPM1, FLT3-ITD, CEBPA, and c-kit mutations in 312 Chinese patients with *de novo* acute myeloid leukemia. *Hematology* 2014;19(6):324–8. DOI: 10.1179/1607845413Y.000000132. PMID: 24164801.
28. Fos J., Pabst T., Petkovic V. et al. Deficient CEBPA DNA binding function in normal karyotype AML patients is associated with favorable prognosis. *Blood* 2011;117(18):4881–84. DOI: 10.1182/blood-2010-11-320747. PMID: 21389317.
29. Zeijlemaker W., Schuurhuis G.J. Minimal Residual Disease and Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. In: *Leukemia*. Ed.: M. Guenova, G. Balatzenko. 2013. InTech. DOI: 10.5772/52080.
30. Lugthart S., van Drunen E., van Norden Y. et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: Prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008;111(8):4329–37. DOI: 10.1182/blood-2007-10-119230. PMID: 18272813.
31. Hämäläinen M.M., Kairisto V., Juvonen V. et al. Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2008;80(3):201–7. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.01009.x. PMID: 18081724.
32. Handschuh L., Kaźmierczak M., Milewski M.C. et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *Int J Oncol* 2017; [Epub ahead of print]. DOI: 10.3892/ijo.2017.4233. PMID: 29286103.
33. Wang J., Zhao Y., Li J. et al. IDH1 mutation detection by droplet digital PCR in glioma. *Oncotarget* 2015;6(37):39651–60. DOI: 10.18632/oncotarget.5630. PMID: 26485760.
34. Ilyas A.M., Ahmad S., Faheem M. et al. Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis. *BMC Genomics* 2015;16(Suppl.1):S5. DOI: 10.1186/1471-2164-16-S1-S5. PMID: 25924101.
35. Al-Mawali A., Gillis D., Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;131(1):16–26. DOI: 10.1309/AJCP5TSD3DZXFLCX. PMID: 19095561.
36. Kern W., Schnittger S. Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Curr Oncol Rep* 2003;5(5):405–12. DOI: 10.1007/s11912-003-0027-5. PMID: 12895393.
37. Hauwel M., Matthes T. Minimal residual disease monitoring: The new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? *Swiss Med Wkly* 2014;144:w13907. DOI: 10.4414/sm.w.2014.13907. PMID: 24452390.
38. Zeijlemaker W., Kelder A., Oussoren-Brockhoff Y.J. et al. Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30(3):708–15. DOI: 10.1038/leu.2015.255. PMID: 26373238.
39. Al-Mawali A., Gillis D., Hissaria P., Lewis I. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008;129(6):934–45. DOI: 10.1309/FY0UMAMM91VPMR2W. PMID: 18480011.
40. Buccisano F., Maurillo L., Ilaria M. et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119(2):332–41. DOI: 10.1182/blood-2011-08-363291. PMID: 22039260.
41. Baer M.R., Stewart C.C., Dodge R.K. et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001;97(11):3574–80. DOI: 10.1182/blood.V97.11.3574. PMID: 11369653.
42. Voskova D., Schoch C., Schnittger S. et al. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;62(1):25–38. DOI: 10.1002/cyto.b.20025. PMID: 15468339.
43. Cui W., Zhang D., Cunningham M.T., Tilzer L. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: Changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *Int J Lab Hematol* 2014;36(6):636–49. DOI: 10.1111/ijlh.12193.
44. Van Der Velden V.H.J., van Der Sluijs-Geling A., Gibson B.E.S. et al. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia* 2010;24(9):1599–606. DOI:10.1038/leu.2010.153. PMID: 20668473.
45. Roug A.S., Larsen H.O., Nederby L. et al. HMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone – a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2014;164(2):212–22. DOI:10.1111/bjh.12614. PMID: 24152218.
46. Eissa D.S., Kandeel E.Z., Ghareeb M. Human myeloid inhibitory C-lectin: a highly specific and stable acute myeloid leukemia marker. *Hematol Oncol* 2017;35(4):814–20. DOI: 10.1002/hon.2352. PMID: 27734526.
47. Graf M., Reif S., Hecht K. et al. High expression of urokinase plasminogen activator receptor (UPA-R) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with worse prognosis. *Am J Hematol* 2005;79(1):26–35. DOI:10.1002/ajh.20337. PMID: 15849776.
48. Ceran F., Ozet G., Dagdas S. et al. Clinical Significance of CD87 Expression in Acute Myeloblastic Leukemia. *Int J Hematol Oncol* 2016;26(1):1–7. DOI:10.4999/uhod.16900.
49. Kern W., Voskova D., Schoch C. et al. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89(5):528–40. PMID: 15136215.
50. Vidriales M., Pérez-López E., Pegenaut C. et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2016;40:1–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.10.002. PMID: 26598032.
51. Venditti A., Buccisano F., Del Poeta G. et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(12):3948–52. PMID: 11090082.
52. Rubnitz J.E., Inaba H., Dahl G. et al. Minimal Residual Disease-Directed Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukemia: Results of the AML02 Multicenter Trial. *Lancet Oncol* 2010;11(6):543–52. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70090-5. PMID: 20451454.

53. Buccisano F, Maurillo L., Spagnoli A. et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116(13):2295–303. DOI: 10.1182/blood-2009-12-258178. PMID: 20548095.
54. Lacombe F, Campos L., Allou K. et al. Prognostic value of multicenter flow cytometry harmonized assessment of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Hematol Oncol* 2017; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/hon.2488. PMID: 29218734.
55. Buldini B., Rizzati F., Masetti R et al. Prognostic significance of flow-cytometry evaluation of minimal residual disease in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP-AML 2002/01 study protocol. *Br J Haematol* 2017;177(1):116–26. DOI: 10.1111/bjh.14523. PMID: 28240765.
56. Minetto P., Guolo F., Clavio M. et al. Early minimal residual disease assessment after AML induction with fludarabine, cytarabine and idarubicin (FLAI) provides the most useful prognostic information. *Br J Haematol* 2018; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1111/bjh.15106. PMID: 29359798.
57. Köhnke T., Sauter D., Ringel K. et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia* 2015;29(2):377–86. DOI: 10.1038/leu.2014.186. PMID: 24912430.
58. Maurillo L., Buccisano F., Piciocchi A. et al. Minimal residual disease as biomarker for optimal biologic dosing of ARA-C in patients with acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2015;90(2): 125–31. DOI: 10.1002/ajh.23893. PMID: 25377359.
59. Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X. et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30(29):3625–32. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.5323. PMID: 22965955.
60. Ouyang J., Goswami M., Peng J. et al. Comparison of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotypic Analysis and Quantitative RT-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2016;145(6):769–77. DOI: 10.1093/ajcp/aqw038. PMID: 27298396.
61. Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Минимальная остаточная популяция лейкемических клеток у больных острыми миелоидными лейкозами. *Терапевтический архив* 1997;67(7):74–9. [Galtseva I.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. The minimal residual population of leukemic cells in patients with acute myeloid leukemia. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive* 1997;67(7):74–9 (In Russ.)].
62. Kern W., Voskova D., Schoch C. et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;104(10):3078–85. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1036. PMID: 15284114.
63. Chen X., Xie H., Wood B.L. et al. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2015;33(11):1258–64. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.3518. PMID: 25732155.
64. Tierens A., Bjørklund E., Siitonen S. et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study. *Br J Haematol* 2016;174(4): 600–9. DOI: 10.1111/bjh.14093. PMID: 27072379.
65. Loken M.R., Alonzo T., Pardo L. et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children’s Oncology Group. *Blood* 2012;20(8):1581–8. DOI: 10.1182/blood-2012-02-408336. PMID: 22649108.
66. Sievers E.L., Lange B.J., Alonzo T. et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children’s Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003;101(9):3398–406. DOI: 10.1182/blood-2002-10-3064. PMID: 12506020.
67. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Rubnitz J.E. et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123(2):243–52. PMID: 14531905.
68. Langebrake C., Creutzig U., Dworzak M. et al. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: The MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3686–92. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.4312. PMID: 16877738.
69. San Miguel J., Vidriales M., Lopez-Berges C. et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction. *Blood* 2001;98(6):1746–51. DOI: 10.1182/blood.V98.6.1746. PMID: 11535507.

Вклад авторов

Т.И. Лобанова: концепция, дизайн, написание статьи, сбор и анализ данных литературы;

И.В. Гальцева: интерпретация данных, участие в написании статьи;

Е.Н. Паровичникова: участие в написании статьи, концепция, окончательное одобрение статьи.

Authors’ contributions

T.I. Lobanova: concept, design and article writing, data collection;

I.V. Galtseva: interpretation of data, article writing;

E.N. Parovichnikova: article writing, concept, final approval of the article.

ORCID авторов

Т.И. Лобанова: <http://orcid.org/0000-0001-6407-0428>

ORCID of authors

T.I. Lobanova: <http://orcid.org/0000-0001-6407-0428>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.