

МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ И В-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ В-ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ, ЛЕЧЕННЫХ ПО ПРОТОКОЛУ «ОЛЛ-2016»

Гальцева И. В.^{*}, Давыдова Ю. О., Паровичникова Е. Н., Гаврилина О. А., Троицкая В. В., Капранов Н. М., Никифорова К. А., Исинова Г. А., Зарубина К. И., Соколов А. Н., Савченко В. Г.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. В рамках Российского многоцентрового исследования по терапии острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) у взрослых «ОЛЛ-2016» предусмотрено централизованное определение минимальной остаточной болезни (МОБ) на 70-й (конец индукции II), 133-й (конец консолидации III) и 190-й (конец консолидации V) дни.

Цель — оценить клиренс опухолевых клеток и динамику нормальных В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток.

Материалы и методы. С декабря 2016 г. по август 2019 г. в исследование было включено 59 больных В-ОЛЛ, в контрольную группу вошло 4 донора аллогенных стволовых клеток крови. Определение МОБ проводили в образцах костного мозга методом проточной цитометрии.

Результаты. В контрольных точках МОБ-негативного статуса достигало большинство больных: 60,4% — на 70-й день, 75,6% — на 133-й день, а на 190-й день — 91,2%. Не обнаружено зависимости величины МОБ от иммунофенотипа опухолевых клеток. В-клеточные предшественники не определялись у 54,4% больных на 70-й день, у 38,8% — на 133-й день и у 59,4% — на 190-й день. «Зрелых» В-клеток у больных было меньше на 133-й день, 190-й день по сравнению с донорами. Доля плазматических клеток значимо не изменялась на протяжении терапии и не отличалась у больных и доноров.

Заключение. Протокол «ОЛЛ-2016» позволяет добиться МОБ-негативного статуса у большинства больных, несмотря на снижение интенсивности цитостатического воздействия.

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

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Благодарности: Авторы выражают благодарность врачам-гематологам региональных центров участников многоцентрового исследования «ОЛЛ-2016»: О.С. Самойловой и М.Е. Гришуниной (ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко»), К.Д. Капранову (ГБУЗ «Волгоградский областной онкологический диспансер»), Е.А. Борисенковой (ГБУЗ КО «Калужская областная клиническая больница»), Е.С. Фокиной (ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»), О.Ю. Барановой и А.С. Антиповой (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», Москва), Е.Е. Зининой (БУ «Сургутская окружная клиническая больница»), В.А. Лапину (ГБУЗ Ярославской области «Областная клиническая больница»), Т.С. Константиновой (ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург), С.Н. Бондаренко («НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой», Санкт-Петербург), Е.В. Целиковой (ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», Санкт-Петербург), Ж.Л. Столыпиной (Санкт-Петербургское ГУЗ «Больница № 15»).

Для цитирования: Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Паровичникова Е.Н., Гаврилина О.А., Троицкая В.В., Капранов Н.М., Никифорова К.А., Исинова Г.А., Зарубина К.И., Соколов А.Н., Савченко В.Г. Мониторинг минимальной остаточной болезни и В-клеточных субпопуляций у больных острым В-лимфобластным лейкозом, леченных по протоколу «ОЛЛ-2016». Гематология и трансфузиология. 2021; 66 (2): 192–205. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-2-192-205>

MINIMAL RESIDUAL DISEASE AND B-CELL SUBPOPULATION MONITORING IN ACUTE B-LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA PATIENTS TREATED ON RALL-2016 PROTOCOL

Galtseva I. V.*, Davydova Y. O., Parovichnikova E. N., Gavrilina O. A., Troitskaya V. V., Kapranov N. M., Nikiforova K. A., Isinova G. A., Zarubina K. I., Sokolov A. N., Savchenko V. G.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. The Russian multicentre trial on treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL) in adults (RALL-2016) regulates a centralised detection of minimal residual disease (MRD) on days 70 (end of induction II), 133 (end of consolidation III) and 190 (end of consolidation V).

Aim — the assessment of tumour cell clearance and normal B-cell precursor, mature B-cell and plasma cell dynamics.

Materials and methods. The study period of December 2016 — August 2019 covered 59 B-ALL patients; the control cohort included four allogeneic blood stem cell donors. The MRD detection was performed with bone marrow samples in flow cytometry.

Results. The patient majority have reached MRD-negativity at control timepoints, 60.4, 75.6 and 91.2% on days 70, 133 and 190, respectively. No correlation was observed between MRD values and tumour cell immunophenotype. B-cell precursors were undetected in 54.4, 38.8 and 59.4% patients on days 70, 133 and 190, respectively. Mature B-cells were fewer compared to donors' on days 133 and 190. The relative plasma cell count did not differ significantly over therapy and between patients and donors.

Conclusion. The RALL-2016 protocol facilitates MRD-negativity in the patient majority despite reduced cytostatic intensity.

Keywords: acute lymphoblastic leukaemia, minimal residual disease, flow cytometry, immunophenotyping

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

Acknowledgments: The authors are grateful to the doctors-hematologists of the regional centers of the participants of the multicenter study ALL-2016: O. S. Samoilova and M. E. Grishunina (Regional Clinical Hospital named after N.A. Semashko, Nizhny Novgorod), K. D. Kaplanov (Regional Oncological Dispensary, Volgograd), E. A. Borisenkova (Regional Clinical Hospital, Kaluga), E. S. Fokina (Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency, Kirov), O. Yu. Baranova and A. S. Antipova (Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow), E. E. Zinina (District Clinical Hospital, Surgut), V. A. Lapin (Regional Clinical Hospital, Yaroslavl), T. S. Konstantinova (Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Yekaterinburg), S. N. Bondarenko (R. Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Saint Petersburg), E. V. Tselikova (Leningrad Regional Clinical Hospital, Saint Petersburg), Zh. L. Stolypina (Hospital N 15, Saint Petersburg).

For citation: Galtseva I.V., Davydova Y.O., Parovichnikova E.N., Gavrilina O.A., Troitskaya V.V., Kapranov N.M., Nikiforova K.A., Isinova G.A., Zarubina K.I., Sokolov A.N., Savchenko V.G. Minimal residual disease and b-cell subpopulation monitoring in acute b-lymphoblastic leukaemia patients treated on rall-2016 protocol. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2021; 66(2): 192–205 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-2-192-205>

Введение

Развитие рецидивов острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) может быть обусловлено персистенцией минимальной остаточной болезни (МОБ) или, по современной терминологии, измеримой остаточной болезни [1]. МОБ — это популяция остаточных опухолевых клеток, которую можно обнаружить в период полной ремиссии (ПР) высокочувствительными методами, такими как многоцветная проточная цитометрия (МПЦ), полимеразная цепная реакция (ПЦР) или секвенирование нового поколения. Раннее достижение МОБ-негативного статуса является благоприятным признаком и ассоциировано с низким риском развития рецидива. Мониторинг МОБ включен во многие протоколы терапии острых лейкозов. В протоколах лечения больных ОЛЛ детского возраста измерение МОБ проводят обычно на начальных этапах терапии, и в зависимости от количества обнаруженных опухолевых клеток проводят стратификацию больных на группы риска с последующим изменением лечения, например, корректировки доз препаратов [2–5]. В протоколах терапии ОЛЛ для взрослых больных исследование МОБ также проводится, но обычно на основании результатов исследования принимается решение о выполнении трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток [6, 7].

Существуют отличия между разными протоколами лечения ОЛЛ в вариантах химиотерапевтического воздействия, суммарных дозах и сроках введения цитостатических препаратов, и, соответственно, различаются контрольные точки исследования МОБ. Для каждого протокола терапии ОЛЛ установлены свои пороговые значения МОБ в определенных контрольных точках исследования. В зависимости от выявленного количества МОБ ряд учреждений проводит стратификацию терапии для каждого больного [8]. В протоколе терапии ОЛЛ у детей и подростков AIEOP-BFM (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and Berlin-Frankfurt-Munster) [9] используется два порога 0,1 % и 10 % МОБ на 15-й день протокола, пятилетняя кумулятивная вероятность рецидива у больных с количеством МОБ на 15-й день < 0,1 % составила 7,5 %; с МОБ от 0,1 до 10 % — 17,5 %, и с МОБ более 10 % — 47,2 % [3]. В протоколе терапии ОЛЛ для взрослых, используемом французской группой исследователей GRAAL (Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia), было показано, что при обнаружении МОБ $\leq 0,01$ % в конце индукционного лечения вероятность развития рецидива составила 22,9 %, а если МОБ была > 0,01 %, то вероятность развития рецидива составила 60,4 % [10]. Таким образом, доказано, что МОБ-позитивность ассоциирована с достоверно худшими долгосрочными результатами, и больных с МОБ-позитивностью включали в группу неблагоприятного прогноза, а с МОБ-негативностью — в группу благоприятного прогноза.

Даже при достижении ПР у больных ОЛЛ риск развития рецидива остается высоким. Пятилетняя безрецидивная выживаемость больных ОЛЛ, включенных в российский многоцентровой протокол «ОЛЛ-2009», составила 69,3 % [11, 12]. В протоколе «ОЛЛ-2009» (NCT01193933) не было предусмотрено определение МОБ методом МПЦ [13].

В 2016 г. был составлен новый протокол многоцентрового исследования по лечению Ph-негативных (Ph — сокращение от англ. Philadelphia chromosome, филадельфийская хромосома) ОЛЛ с этапом рандомизации для Т-клеточных ОЛЛ/лимфом «ОЛЛ-2016» (NCT03462095) [14]. Одной из целей протокола «ОЛЛ-2016» является оценить кинетику МОБ в первые полгода терапии у больных впервые диагностированными Ph-негативными ОЛЛ/лимфомами (за исключением лимфомы Беркитта).

Существует два методических подхода к детекции МОБ методом МПЦ. Первый подход основан на выявлении популяции клеток с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ), обнаруженной в дебюте заболевания, и рекомендует подбор индивидуальной панели моноклональных антител для каждого больного, которая затем используется для мониторинга МОБ в течение терапии. ЛАИФ — это сочетание экспрессии антигенов, которое не выявляется или выявляется в небольших количествах среди нормальных гемопоэтических клеток [15]. Недостатком этого метода является то, что иммунофенотип бластных клеток может меняться при проведении химиотерапии, и возможно получение ложнонегативных результатов исследования МОБ.

Второй подход определения МОБ методом МПЦ носит название «метод пустых мест» или «отличие от нормального». В основе этого метода лежат представления о нормальном созревании клеток, определение стадий созревания и их антигенных свойств. Идентификация лейкемических клеток проводится по их иммунофенотипическому отклонению от паттернов антигенной экспрессии нормальных гемопоэтических клеток определенной клеточной линии и стадии зрелости. Этот метод позволяет избежать ошибок, связанных с изменением ЛАИФ в течение терапии, а также позволяет обнаруживать МОБ, даже если первичный иммунофенотип неизвестен. Однако данный метод требует экспертного знания нормальных паттернов созревания клеток и использования широкой панели моноклональных антител [16, 17]. Учитывая возможности двух подходов выявления МОБ, оптимальным является комбинирование обоих методов.

Поскольку созревание В-клеточных предшественников происходит в костном мозге, важным для определения МОБ является знание динамики количества В-клеточных предшественников в процессе терапии. В основе протоколов «ОЛЛ-2009» и «ОЛЛ-2016» лежит

принцип непрерывности лечения с модификацией доз цитостатических препаратов. Вследствие непрерывности проводимого цитостатического воздействия на опухолевые клетки представляет интерес также изучение динамики нормальных В-клеток и плазматических клеток, так как эти клетки являются важным звеном иммунной системы. От количества этих клеток зависит возможность осуществления антиген-ассоциированного иммунного ответа на инфекции, которые часто возникают в процессе терапии, а также контроль над опухолевым клоном клеток.

Мониторинг МОБ методом МПЦ характеризуется сложностями в стандартизации, субъективностью оценки информации и требует специальной профессиональной подготовки персонала лаборатории. Субъективным также является и определение иммунофенотипа выявленных опухолевых клеток. В руководстве 2016 г. по проведению иммунофенотипирования методом МПЦ при ОЛЛ в рамках многоцентрового протокола AIEOP-BFM [18] предлагается не использовать порог позитивности каждого исследуемого антигена (например, если 20 % бластных клеток или 10 % для внутриклеточных маркеров экспрессируют исследуемый маркер, то популяция клеток считается положительной по этому маркеру), и отказаться от предложенной ранее схемы характеристики иммунофенотипа в процентном выражении экспрессии антигена. Авторы предлагают определять иммунофенотип бластных клеток в дебюте заболевания по отношению к контролям, в качестве которых выступают нормальные клетки костного мозга самого больного, и использовать следующие категории экспрессии антигенов: негативная, слабая, средняя, частичная, высокая и др. Для определения экспрессии лимфоидных антигенов на бластной популяции в качестве контроля выступают лимфоциты, для миелоидных антигенов — остаточные клетки миелоидного ряда (нейтрофилы, моноциты). Такой подход может нивелировать различия в используемых приборах, реагентах, наборах моноклональных антител в лабораториях, входящих в многоцентровое исследование, и сделать результаты сопоставимыми [18]. Поэтому, учитывая преимущества такого метода, в планируемом исследовании было решено использовать аналогичный подход для описания иммунофенотипа остаточных опухолевых клеток.

Цель настоящего исследования — оценить клиренс опухолевых клеток и динамику нормальных В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток.

Больные и методы

Больные

В многоцентровой российский протокол «ОЛЛ-2016» (NCT01193933) [14] были включены больные ОЛЛ, госпитализированные в гематологические отделения лю-

бых регионов Российской Федерации, принимающих участие в совместной работе по оптимизации терапии острых лейкозов. С декабря 2016 г. по август 2019 г. в исследование «ОЛЛ-2016» было включено 164 больных ОЛЛ, из них у 70 человек был Т-вариант ОЛЛ, у 4 — смешанноклеточный Т/миелоидный вариант острого лейкоза и у 90 — В-вариант ОЛЛ. У 59 из 90 больных В-ОЛЛ проводили мониторинг МОБ, у 31 — исследование МОБ не выполняли: 15 больных умерли до первой точки мониторинга МОБ; 4 больным прекращена терапия по протоколу до достижения первой контрольной точки; материал от 2 больных в лабораторию не отправляли ни в одной из точек исследования МОБ; 10 больных живы, находятся на ранних этапах терапии.

Таким образом, в настоящее исследование включены 59 больных В-ОЛЛ (медиана возраста — 31 год, соотношение мужчины : женщины = 1 : 1). Из них терапию по протоколу «ОЛЛ-2016» проводили в ФГБУ «НМИЦ гематологии» (Москва) 27 больным, в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» (Москва) — 2 больным, в ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н. А. Семашко» — 9 больным, в ГБУЗ «Волгоградский областной онкологический диспансер» — 6 больным, в ГБУЗ КО «Калужская областная клиническая больница» — 4 больным, в ГБУЗ Ярославской области «Областная клиническая больница» — 4 больным, в ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» — 2 больным, в БУ «Сургутская окружная клиническая больница» — 2 больным, в Санкт-Петербургском ГУЗ «Больница № 15» — 1 больному, в ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница» — 1 больному и в ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» — 1 больному.

Исследование МОБ в рамках протокола предусмотрено на 70-й (конец индукции II), 133-й (конец консолидации III) и 190-й (конец консолидации V) дни. У некоторых больных МОБ дополнительно оценивали в течение поддерживающей терапии каждые 3 месяца. В контрольную группу вошло 4 донора аллогенных стволовых клеток крови. Аспирацию костного мозга для исследования выполняли после подписания больными и донорами информированного согласия.

Проточная цитометрия

Определение МОБ в рамках протокола «ОЛЛ-2016» проводили централизованно методом МПЦ в научно-клинической лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Поиск популяции опухолевых клеток осуществляли «методом пустых мест» в соответствии с рекомендациями, предложенными А. М. Поповым и соавт. [19], М. N. Dworzak и соавт. [20] и М. J. Borowitz и соавт. [21]. Материалом для исследования служил аспират костного мозга объемом 0,5–

Таблица 1. Набор моноклональных антител, использовавшийся для анализа минимальной остаточной болезни**Table 1.** Monoclonal antibody kit used for minimal residual disease analysis

Антигенная принадлежность <i>Antigenicity</i>	Клон <i>Clone</i>	Флуорохром <i>Fluorochrome</i>
CD38	HIT2	флуоресцеина изотиоцианат <i>fluorescein isothiocyanate</i>
CD58	AICD58	флуоресцеина изотиоцианат <i>fluorescein isothiocyanate</i>
CD58	1C3	флуоресцеина изотиоцианат <i>fluorescein isothiocyanate</i>
CD10	HI10a	фикоэритрин <i>phycoerythrin</i>
CD19	SJ25C1	алофикоцианин <i>allophycocyanin</i>
CD45	2D1	перидинин-хлорофилл <i>peridinin-chlorophyll</i>
CD45	2D1	перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5 <i>peridinin-chlorophyll-protein complex — cyanin 5.5</i>
CD38	HIT2	перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5 <i>peridinin-chlorophyll-protein complex — cyanin 5.5</i>
CD34	8G12	фикоэритрин-цианин 7 <i>phycoerythrin-cyanin 7</i>
CD20	L27	алофикоцианин-H7 <i>allophycocyanin -H7</i>

1 мл, стабилизированный антикоагулянтом этилендиаминтетрауксусной кислотой. Эритроциты образцов костного мозга лизировали с помощью раствора BD Pharm Lyse (BD Biosciences), затем дважды отмывали в растворе CellWASH (BD Biosciences). К выделенным ядродержащим клеткам добавляли моноклональные антитела (табл. 1), инкубировали при комнатной температуре в темноте и отмывали от несвязавшихся антител с помощью CellWASH. Образцы анализировали на шестицветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences).

Анализ цитометрических данных

Анализ данных проводили с помощью программы BD FACSDiva Software Version 6.1.3. На первом этапе гейтирования исключали из анализа дебрис, то есть разрушившиеся нежизнеспособные клетки, на диаграмме «FSC против SSC» (FSC — сокращение от англ. forward scatter, прямое светорассеяние; SSC — сокращение от англ. side scatter, боковое светорассеяние). На диаграмме «SSC против CD19» ограничивали CD19⁺ клетки. На втором этапе на основе анализа экспрессии CD19, CD10, CD45, CD34, CD20, CD38, CD58 дифференцировали CD19⁺ клетки на В-клеточные предшественники, «зрелые» В-клетки, ПК и опухолевые клетки. Только у одного больного экспрессия CD19 на бластных клетках отсутствовала в дебюте заболевания, поэтому гейтирование у него начинали с выделения CD10-положительных клеток с низким показателем бокового светорассеяния. Поскольку в протоколе «ОЛЛ-2016» не предусмотрено централизованное иммунофенотипическое исследо-

вание бластных клеток в дебюте заболевания, поиск МОБ осуществлялся «методом пустых мест». Однако больным, которым проводили лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии», устанавливали линейную принадлежность и ЛАИФ бластных клеток в дебюте заболевания. В этих случаях ЛАИФ, определенный в дебюте, использовали как отправную точку в поиске МОБ, но, несмотря на aberrантный иммунофенотип в дебюте, обязательно сравнивали все клеточные популяции с нормальными стадиями созревания гемопоэтических клеток в контрольных точках протокола. Если опухолевая популяция (кластер состоял не менее чем из 20 клеток) выявлялась, то определяли ее иммунофенотип. Экспрессию антигенов оценивали по сравнению с нормальными гемопоэтическими клетками. Было выделено 6 вариантов экспрессии антигенов:

- 1) отсутствие экспрессии (–);
- 2) частично положительная экспрессия (–/+);
- 3) слабая экспрессия (dim, от англ. dimly — тусклый);
- 4) частично негативная (+/–);
- 5) наличие экспрессии (+);
- 6) высокая плотность экспрессии (high, от англ. high — высокий).

Экспрессию CD19, CD10, CD34, CD38 и CD20 опухолевыми клетками оценивали по сравнению с нормальными CD19⁺ клетками (рис. 1, рис. 2 А). Экспрессию CD45 и CD58 оценивали по отношению к гранулоцитам, моноцитам и лимфоцитам (рис. 2 Б и В). В случаях, когда опухолевая популяция не обнаруживалась, рассчитывали чувствительность метода как отношение 20 (минимального количества событий, составляющих популяцию) к общему числу проанализи-

зированных клеток костного мозга после исключения из анализа дебриса. Достаточной чувствительностью считали 0,01 %, поэтому анализировали как минимум 200 тысяч событий.

Статистический анализ. Анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6 и R 3.4.4. Проверку нормальности распределения выполняли с помощью критерия Шапиро — Уилка. Распределение большинства изучаемых показателей было ненормальным, поэтому использовали непараметрические критерии. Для сравнения доли клеток у больных на разных этапах терапии и у доноров использовали критерий Краскела — Уоллиса с поправкой на множественные сравнения Данна. Для непарных одиночных сравнений применяли критерий Манна — Уитни или парный непараметрический критерий Вилкоксона. Количественные данные представлены в виде: медиана [интерквартильный размах]. Звездочками на рисунках указывали наличие достоверных отличий между группами больных (** — $p \leq 0,01$; * — $p < 0,05$). Кластерный анализ выполнен с помощью метода «ward.D» пакета «dendextend» в R 3.4.4.

Результаты

Определение доли опухолевых клеток методом МПЦ на 70-й день протокола проведено у 57 больных, однако у 4 из этих больных ПР не подтвердилась и количество опухолевых клеток составило 21,5 %, 8,24 %, 7,76 % и 0,138 % по результатам МПЦ. Качество всех образцов костного мозга было удовлетворительным. Из 53 больных с ПР МОБ-негативный статус был определен у 32 больных (60,4 %), а МОБ-положительный статус — у 21 (39,6 %) (табл. 2). Медиана МОБ в группе «МОБ-положительных» больных составила 0,07 % (0,018–0,661 %) (рис. 3). У 31 из 32 больных, у которых опухолевые клетки не выявлялись, чувствительность анализа была достаточной и составила $\leq 0,01$ % и у 1 — 0,014 %. Из 53 больных в ПР, которым оценивали МОБ на 70-й день, на 133-й день МПЦ выполнили 44 больным, у 8 больных продолжается химиотерапия, у 1 больного развился острый миелоидный лейкоз.

На 133-й день протокола МОБ исследовали у 46 больных, однако в одном случае качество аспирата костного мозга было неудовлетворительным, отмечалось значительное разведение образца периферической кровью, поэтому МОБ оценивали только у 45. Из них у 34 больных (75,6 %) был МОБ-негативный статус (25 были «МОБ-негативны» на 70-й день, 7 — «МОБ-положительны» на 70-й день и 2 больным МОБ не исследовалась на 70-й день). У 11 (24,4 %) больных на 133-й день определялись остаточные опухолевые клетки, медиана количества которых составила 0,007 % (0,002–0,071 %) (табл. 2). У 10 из этих больных на 70-й день МОБ выявлялась и у 1 не выявлялась. Однако у всех 45 больных доля опухолевых клеток к 133-му дню достоверно

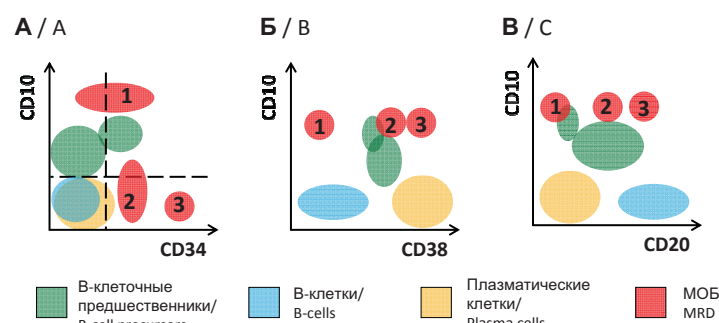


Рисунок 1. Типичное расположение CD19⁺ клеток, среди которых выделены В-клеточные предшественники, зрелые В-клетки и плазматические клетки, а также варианты расположения популяции опухолевых клеток с характеристиками ее иммунофенотипа: **А** — на диаграмме «CD34 против CD10» популяция МОБ № 1 имеет иммунофенотип CD34⁺CD10^{high}, МОБ № 2 — CD34⁺CD10⁺, МОБ № 3 — CD34^{high}CD10⁺; **Б** — на диаграмме «CD38 против CD10» популяция МОБ № 1 имеет иммунофенотип CD38⁺CD10⁺, МОБ № 2 — CD38⁺CD10⁺, МОБ № 3 — CD38^{high}CD10⁺; **В** — на диаграмме «CD20 против CD10» популяция МОБ № 1 имеет иммунофенотип CD20⁺CD10^{high}, МОБ № 2 — CD20^{dim}CD10^{high}, МОБ № 3 — CD20⁺CD10^{high} (МОБ — минимальная остаточная болезнь)

Figure 1. Typical CD19⁺ cell pattern including B-cell precursors, mature B-cells and plasma cells, as well as leukaemia cell population pattern variants with immunophenotype: A. In "CD34 vs. CD10", MRD 1 population has immunophenotype CD34⁺CD10^{high}, MRD 2 — CD34⁺CD10⁺, MRD 3 — CD34^{high}CD10⁺; B. In "CD38 vs. CD10", MRD 1 population has immunophenotype CD38⁺CD10⁺, MRD 2 — CD38⁺CD10⁺, MRD 3 — CD38^{high}CD10⁺; B. In "CD20 vs. CD10", MRD 1 population has immunophenotype CD20⁺CD10^{high}, MRD 2 — CD20^{dim}CD10^{high}, MRD 3 — CD20⁺CD10^{high} (MRD — minimal residual disease)

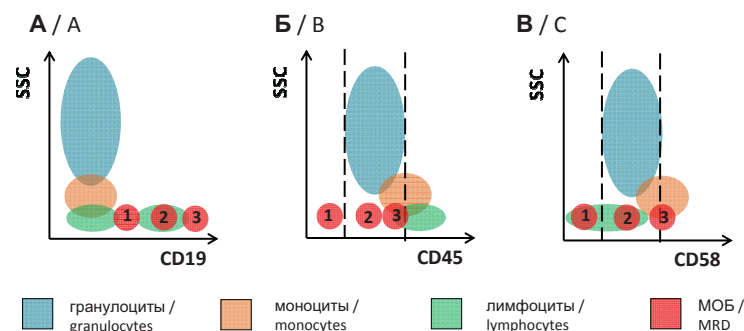


Рисунок 2. Типичное расположение гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов, а также варианты расположения популяции опухолевых клеток и характеристика ее иммунофенотипа: **А** — на диаграмме «SSC против CD19» популяция МОБ № 1 имеет иммунофенотип CD19^{dim}, МОБ № 2 — CD19⁺, МОБ № 3 — CD19^{high}; **Б** — на диаграмме «SSC против CD45» популяция МОБ № 1 имеет иммунофенотип CD45⁺, МОБ № 2 — CD45^{dim}, МОБ № 3 — CD45⁺; **В** — на диаграмме «SSC против CD58» популяция МОБ № 1 имеет иммунофенотип CD58⁺, МОБ № 2 — CD58⁺, МОБ № 3 — CD58^{high} (МОБ — минимальная остаточная болезнь)

Figure 2. Typical granulocyte, monocyte and lymphocyte pattern, as well as leukaemia cell population pattern variants with immunophenotype: A — In "SSC vs. CD19", MRD 1 population has immunophenotype CD19^{dim}, MRD 2 — CD19⁺, MRD 3 — CD19^{high}; A — In "SSC vs. CD45", MRD 1 population has immunophenotype CD45⁺, MRD 2 — CD45^{dim}, MRD 3 — CD45⁺; B — In "SSC vs. CD58", MRD 1 has immunophenotype CD58⁺, MRD 2 — CD58⁺, MRD 3 — CD58^{high} (MRD — minimal residual disease)

уменьшилась ($p = 0,0004$) (рис. 3). У 31 из 34 больных с МОБ-негативным статусом чувствительность была $\leq 0,01$ %, а у 3 составила 0,012 %, 0,012 % и 0,02 % соответственно. Из 46 больных, которым исследовали МОБ на +133-й день, у 34 выполнили анализ МОБ на 190-й день протокола, 10 больных продолжают получать терапию в соответствии с протоколом.

Таблица 2. Количество больных В-ОЛЛ с МОБ-положительным и МОБ-негативным статусами
Table 2. Numbers of MRD-positive and negative B-ALL patients

Контрольные точки/ центры Control points/healthcare centres	Индукция II: 70-й день Induction II: day 70		Консолидация III: 133-й день Consolidation III: day 133		Консолидация V: 190-й день Consolidation V: day 190	
	МОБ «+» MRD «+»	МОБ «-» MRD «-»	МОБ «+» MRD «+»	МОБ «-» MRD «-»	МОБ «+» MRD «+»	МОБ «-» MRD «-»
НМИЦ гематологии, n (%) National Research Center for Hematology, n (%)	8 (34,8%)	15 (65,2%)	4 (25,0%)	12 (75,0%)	1 (9,1%)	10 (90,9%)
Другие центры, n (%) Other centers, n (%)	13 (43,3%)	17 (56,7%)	7 (24,1%)	22 (75,9%)	2 (8,7%)	21 (91,3%)
Всего, n (%) Total, n (%)	21 (39,6%)	32 (60,4%)	11 (24,4%)	34 (75,6%)	3 (8,8%)	31 (91,2%)

Примечание. МОБ — минимальная остаточная болезнь.
Note. MRD — minimal residual disease.

На 190-й день МОБ исследовали у 34 больных, у 31 (91,2%) был подтвержден МОБ-негативный статус (4 из них приобрели «МОБ-негативность», т.е. на 133-й день у этих больных был МОБ-положительный статус) (табл. 2). У 3 больных выявили МОБ-положительный статус на 190-й день, у которых на 133-й день также был МОБ-положительный статус. У 2 из этих больных МОБ исследовали на 9-м месяце поддерживающей терапии, на этом этапе опухолевые клетки уже не выявлялись. Статистически значимых изменений в доле опухолевых клеток с 133-го до 190-го дней не было выявлено ($p = 0,109$) (рис. 3).

В течение поддерживающей терапии провели исследование МОБ у 9 больных на 9-м месяце, у 8 — на 12-м месяце, у 9 — на 15-м месяце, у 6 — на 18-м месяце и у 3 больных — на 21-м месяце терапии по протоколу

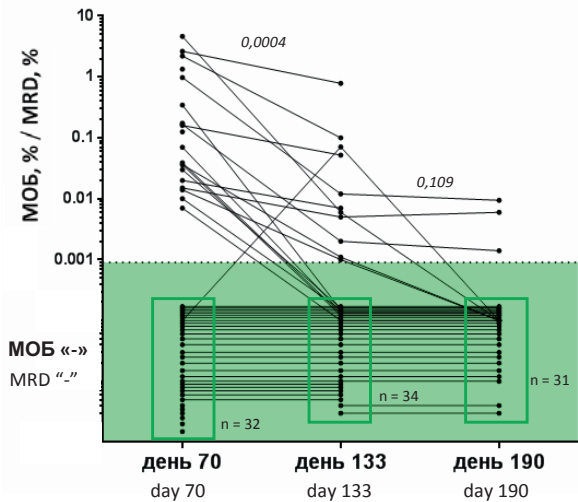


Рисунок 3. Динамика опухолевых клеток у больных В-ОЛЛ, проходящих терапию в рамках протокола «ОЛЛ-2016», в контрольные точки (70-й, 133-й, 190-й дни) (В-ОЛЛ — В-острый лимфобластный лейкоз)
Figure 3. Leukaemia cell dynamics in B-ALL patients at control points of RALL-2016 treatment (days 70, 133 and 190) (B-ALL — acute lymphoblastic leukaemia)

«ОЛЛ-2016». Все результаты в этих точках (35 исследований) были МОБ-негативные.

Опухолевые клетки на 70-й день были выявлены у 25 больных (4 — без ПР, 21 — с ПР). Иммунофенотипы выявленных остаточных опухолевых клеток отличались. Экспрессия антигенов CD19, CD20, CD45, CD58 была менее вариабельна, чем экспрессия CD10, CD34 и CD38 на остаточных лейкоэмических клетках.

Экспрессия CD19 была положительная в 13 (52%) случаях, высокая — в 9 (36%) случаях, слабая — в 2 (8%) случаях и отсутствовала у 1 (4%) больного. CD20 в 19 (76%) случаях не экспрессировался, в 5 (20%) случаях экспрессировался слабо и в 1 (4%) случае отмечена частично позитивная экспрессия. CD45 не экспрессировался в 4 (16%) случаях, экспрессировался слабо в 19 (76%) случаях, в 1 (4%) случае опухолевая популяция была частично позитивна и в 1 (4%) случае — позитивна. Экспрессия CD58 была высокая в 6 (24%) случаях, положительная — в 16 (64%) случаях и негативной — в 3 (12%) случаях (табл. 3).

Маркер CD10 на опухолевой популяции не экспрессировался в 6 (24%) случаях, частично экспрессировался — в 7 (28%), экспрессировался слабо — в 1 (4%), частично не экспрессировался — в 2 (8%), экспрессировался — в 5 (20%) и экспрессировался с высокой плотностью в 4 (16%) случаях. Экспрессия CD34 отсутствовала в 2 (8%) случаях, частично присутствовала — в 3 (12%), частично отсутствовала — в 3 (12%), была положительной — в 9 (36%) и была высокой в 8 (32%) случаях. Антиген CD38 не экспрессировался в 12 (48%) случаях, экспрессировался слабо — в 8 (32%), экспрессировался — в 8 (32%) и экспрессировался с высокой плотностью в 1 (4%) случае (табл. 3).

С учетом экспрессии всех изучаемых антигенов была проведена кластеризация, и построена дендрограмма кластеров опухолевых популяций, выявленных

Таблица 3. Частота встречаемости вариантов экспрессии антигенов на остаточных опухолевых клетках, обнаруженных на 70-й день протокола «ОЛЛ-2016»**Table 3.** Antigen expression variant frequency of residual leukaemia cells on day 70 of RALL-2016 protocol

Антиген/экспрессия Antigen/expression	Отсутствие «-» Absence «-»	Частично положительная «-/+» Partially positive «-/+»	Слабая «dim» Dimly «dim»	Частично негативная «+/-» Partially negative «+/-»	Наличие «+» Presence «+»	Высокая «high» High «high»
CD19, n (%)	1 (4%)	0	2 (8%)	0	13 (52%)	9 (36%)
CD10, n (%)	6 (24%)	7 (28%)	1 (4%)	2 (8%)	5 (20%)	4 (16%)
CD34, n (%)	2 (8%)	3 (12%)	0	3 (12%)	9 (36%)	8 (32%)
CD38, n (%)	12 (48%)	0	8 (32%)	0	8 (32%)	1 (4%)
CD20, n (%)	19 (76%)	0	5 (20%)	1 (4%)	0	0
CD45, n (%)	4 (16%)	1 (4%)	19 (76%)	0	1 (4%)	0
CD58, n (%)	3 (12%)	0	0	0	16 (64%)	6 (24%)

на 70-й день терапии. Преимущественно по экспрессии CD10 выделено два кластера. В кластере I (10 случаев), в котором опухолевые клетки экспрессировали CD10, сформировали две подгруппы — в одной CD34 не экспрессировался или экспрессировался слабо, а CD58 экспрессировался с высокой плотностью (4 случая), во второй — CD34 экспрессировался, а CD38 не экспрессировался или экспрессировался слабо (6 случаев). Кластер II (15 случаев) включал преимущественно клетки со слабой или отсутствующей экспрессией CD10 и наличием экспрессии CD34 (рис. 4 А). Доля опухолевых клеток в кластере I на 70-й день составила 0,081 % (0,01–0,976 %), а в кластере II — 0,165 % (0,036–2,639 %), значимых отличий не выявлено ($p = 0,164$) (рис. 4 Б).

Помимо определения МОБ у всех больных во всех точках исследования оценивали относительное количество В-клеточных предшественников, «зрелых» В-клеток и плазматических клеток. Количество этих клеток определялось по отношению ко всем клеткам костного мозга. Перечисленные клеточные популяции были подсчитаны у 4 здоровых доноров.

В-клеточные предшественники не определялись у 31 (54,4%) из 57 больных на 70-й день, у 17 (38,8%) из 45 — на 133-й день и у 19 (59,4%) из 32 — на 190-й день. Динамика В-клеточных предшественников составила: на 133-й день по сравнению с 70-м днем доля В-клеточных предшественников нарастала (0 % [0–0,009 %] против 0,006 % [0–0,03 %], $p = 0,0009$); далее к 190-му дню снижалась (0 % [0–0,004 %], $p = 0,0065$); затем к 9-му месяцу вновь нарастала (0,049 % [0,012–0,225 %], $p = 0,0117$), а затем значимо не изменялась. Доля В-клеточных предшественников была меньше у больных на 70-й, 133-й и 190-й дни терапии по сравнению с донорами (1,479 % [0,855–2,090 %], $p < 0,05$) (рис. 5 А).

«Зрелые» В-клетки не определялись только у одного больного на 70-й, 133-й и 190-й дни. Доля «зрелых» В-клеток уменьшалась от 70-го к 133-му дню (0,097 % [0,0–0,172 %] против 0,038 % [0,02–0,108 %], $p = 0,004$). «Зрелых» В-клеток у больных было меньше на 133-й

день, 190-й день (0,073 % [0,022–0,117 %]), 9-й месяц (0,031 % [0,018–0,053 %]), 12-й месяц (0,030 % [0,016–0,052 %]), 15-й месяц (0,014 % [0,011–0,071 %]), 18-й месяц (0,039 % [0,007–0,091 %]) по сравнению с донорами (1,246 % [0,817–2,516 %]) (рис. 5 Б). Доля плазматических клеток значимо не изменялась на протяжении всего времени проведения терапии и не отличалась у больных и доноров (рис. 5 В).

Обсуждение

Определение МОБ у взрослых больных ОЛЛ внедрено в протоколы терапии. Большинство европейских исследовательских групп в качестве метода исследования МОБ применяют ПЦР с пациент-специфичными праймерами к реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов, и лишь небольшое количество учреждений используют метод МПЦ [7, 10, 22–24].

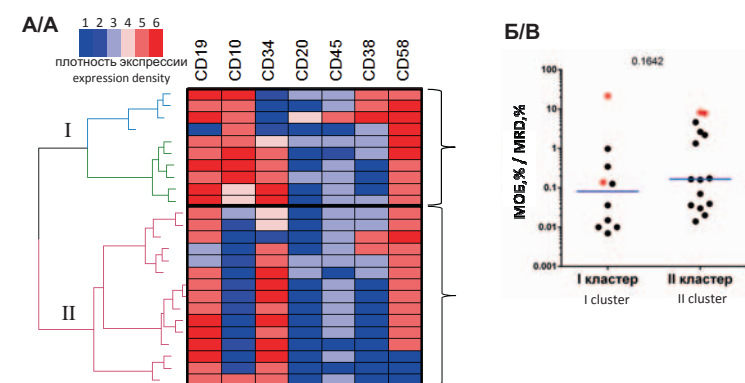


Рисунок 4. Характеристика опухолевых клеток, выявленных на 70-й день терапии по протоколу «ОЛЛ-2016»: А — дендрограмма и тепловая карта, построенные на основе иммунофенотипа опухолевых клеток (плотность экспрессии преобразована в числовой эквивалент: 1 — «-», 2 — «-/+», 3 — «dim», 4 — «+/-», 5 — «+», 6 — «high»); Б — доля опухолевых клеток на 70-й день в зависимости от принадлежности к кластеру полученной дендрограммы (красными точками показана доля опухолевых клеток у больных, у которых не была достигнута полная ремиссия)

Figure 4. Leukaemia cell properties on day 70 of RALL-2016 treatment: А — dendrogram and heatmap of tumor cell immunophenotype (expression density reflected in numerical equivalent: 1 — “-”, 2 — “-/+”, 3 — “dim”, 4 — “+/-”, 5 — “+”, 6 — “high”); Б — tumor cell relative count on day 70 by dendrogram node (red dots correspond to patients without complete remission)

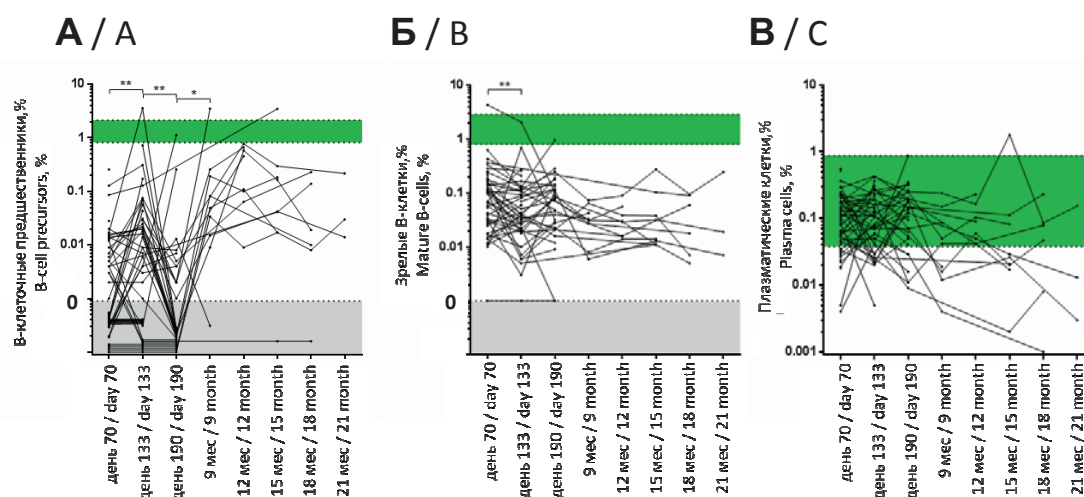


Рисунок 5. Динамика CD19⁺ клеток в течение терапии по протоколу «ОЛЛ-2016»: **А** — В-клеточных предшественников, **Б** — «зрелых» В-клеток, **В** — плазматических клеток. Зеленым выделена область значений показателей, определенная у здоровых доноров (от минимального до максимального значений). Серым цветом выделена область отрицательных значений

Figure 5. CD19⁺ cell dynamics over RALL-2016 treatment: **A** — B-cell precursors, **B** — mature B-cells, **C** — plasma cells. Green band highlights values in healthy donors (ranging minimal to maximal). Negative values highlighted in gray

Кинетика МОБ отражает биологические свойства лейкоэмических клеток, их чувствительность к применяемым цитостатическим и биологическим препаратам и зависит от интенсивности терапии. В настоящем исследовании наиболее часто МОБ определялась на 70-й день протокола (43,9%). Не выявлено взаимосвязи между величиной МОБ и определяемым иммунофенотипом бластных клеток, т. е. не обнаружено зависимости скорости клиренса МОБ от иммунофенотипа опухолевой популяции. К началу поддерживающей терапии большинство больных, включенных в протокол «ОЛЛ-2016», находилось в МОБ-негативном статусе (31 (91,2%) из 34 больных).

В настоящем исследовании сопоставили частоты достижения МОБ-негативности с данными международных протоколов терапии ОЛЛ (рис. 6). Индукционный этап терапии по протоколу «GMALL» (German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia) [7] немецкой группы исследователей сравним по интенсивности цитостатического воздействия с протоколом «ОЛЛ-2016», и к концу индукции (71-й день) доля МОБ-негативных больных В-ОЛЛ, включенных в протокол «GMALL», составила 66% [7], а в «ОЛЛ-2016» (70-й день) — 60,4%. При лечении же импульсными высокодозными курсами по программе «hyperCVAD» (hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin (Adriamycin), dexamethasone) [25], применяемой в MD Anderson Cancer Center, к 90-му дню терапии у 93% больных была достигнута МОБ-негативная ремиссия заболевания [25]. Протокол «GMALL» включает высокодозные курсы консолидации, но доля больных с МОБ-негативным статусом в этом периоде сопоставима с результатами, получен-

ными при использовании протокола «ОЛЛ-2016» (доля МОБ-негативных больных В-ОЛЛ после консолидации по протоколу «GMALL» составила 78%, а по протоколу «ОЛЛ-2016» — 75,6%) [7]. Однако результаты определения МОБ зависят не только от протокола лечения, но и от метода детекции остаточных опухолевых клеток, его чувствительности и специфичности. Только в исследованиях «PETHEMA ALL-AR-03 Trial» (The Programa Español de Tratamientos en Hematología) [22] и «hyperCVAD» [25] использовался метод МПЦ, а в остальных — ПЦР (рис. 6). При сравнении показателей МОБ, определяемой только методом МПЦ, к 16–19-й неделе терапии доля МОБ-негативных больных, леченных по протоколу «ОЛЛ-2016», была сопоставима с результатами лечения по протоколам испанской группы «PETHEMA ALL-AR-03 Trial» (75,6 и 86%) [22] и на 24–27-й неделе — с программой «hyperCVAD» (91,2 и 96% соответственно) [25], несмотря на отсутствие блоков высокодозной консолидации. В настоящем исследовании оценили вероятность развития рецидива у больных в зависимости от выявления или невыявления МОБ. Точкой отсчета этого показателя были 70-й день, 133-й день и 190-й день. При этих сроках наблюдения не выявили отличий в вероятности развития рецидива.

У больных ОЛЛ регенерация В-клеточных предшественников и субпопуляций «зрелых» В-лимфоцитов периферической крови необходима для восстановления гуморального иммунитета после цитотоксического воздействия. Ранее проводимые исследования показали, что в результате химиотерапии уменьшается количество В-клеточных предшественников, но их регенерация происходит между курсами и в конце химиотерапии [26, 27].

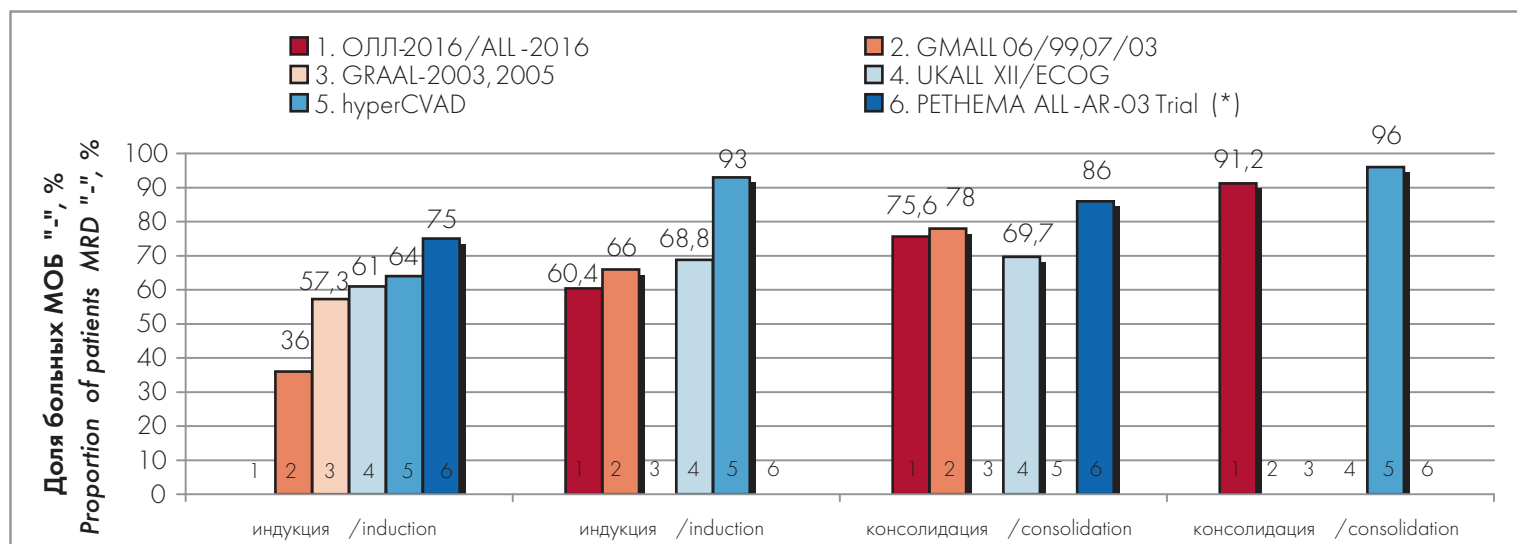


Рисунок 6. Группы клинических исследований и частоты достижения МОБ-негативного статуса у взрослых больных В-острым лимфобластным лейкозом. * — в исследовании PETHEMA ALL-AR-03 Trial показаны результаты по определению МОБ у больных В- и Т-острым лимфобластным лейкозом (МОБ — минимальная остаточная болезнь; GMALL — German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia [7]; GRAAL — Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia [10]; UKALL XII/ECOG — United Kingdom arm of the international ALL trial XII/Eastern Cooperative Oncology Group [24], PETHEMA — The Programa Español de Tratamientos en Hematología [6])

Figure 6. Clinical trial cohorts and MRD-negativity frequencies in adult patients with B-acute lymphoblastic leukaemia. * PETHEMA ALL-AR-03 Trial shows data on B- and T-acute lymphoblastic leukaemia patients (MRD — minimal residual disease; GMALL — German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia [7]; GRAAL — Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia [10]; UKALL XII/ECOG — United Kingdom arm of the international ALL trial XII/Eastern Cooperative Oncology Group [24]; PETHEMA — Programa Español de Tratamientos en Hematología [6])

В настоящем исследовании у больных В-ОЛЛ практически на всех этапах терапии доля В-клеточных предшественников и «зрелых» В-клеток была ниже, чем у доноров. На ранних этапах терапии (70-й, 133-й, 190-й дни) у половины больных В-клеточные предшественники отсутствовали, и только во время поддерживающей терапии количество этих клеток постепенно нарастало, но не достигало нормальных значений. Также выявлена необычная динамика В-клеточных предшественников: нарастание данной популяции клеток к 133-му дню с последующим снижением — к 190-му. Вероятно, это связано со специфической терапией, проводимой в этот период. Например, согласно схеме протокола «ОЛЛ-2016», промежуток от последнего введения дексаметазона до 70-го дня составляет 30 дней, от последнего введения дексаметазона до 133-го — 43 дня и от последнего введения дексаметазона до 190-го — 27 дней.

В исследование Р.М. J. Theunissen и соавт. [28] был включен 81 больной В-ОЛЛ (1–18 лет), которым проводилась терапия по протоколу DCOG (Dutch Childhood Oncology Group) ALL10 или ALL1 (ключевые препараты: преднизолон, дексаметазон, метотрексат, винкристин, даунорубин, аспарагиназа, циклофосфамид, цитарабин, меркаптопурин, доксорубин). В указанном исследовании на 15-й и 33-й дни терапии В-клеточные предшественники не выявлялись, а на 79-й день и 5-й месяц терапии происходила регенерация В-клеточных предшественников вследствие наличия интервалов в терапии, однако перерывы были короткими для полной В-клеточной дифференциров-

ки [28]. Как и в настоящем исследовании, в работе Р.М. J. Theunissen и соавт. уменьшение количества нормальных плазматических клеток не происходило, что указывает на резистентность данной популяции клеток к проводимой химиотерапии [28].

В исследовании Н. Liao и соавт., включившем 113 больных В-ОЛЛ, которым проводилась индукционная терапия по программе VDCLP (vincristine, daunorubicin, cyclophosphane, L-asparaginase, prednisone) [25], у 78 (69%) больных В-клеточные предшественники выявлялись в конце индукционной терапии (28-й день). Безрецидивная выживаемость была лучше у больных с МОБ-негативным статусом, когда В-клеточных предшественников было не менее 0,1% ($p = 0,001$) [29]. Тем самым было показано, что не только МОБ, но также сохранение и восстановление В-клеточных предшественников имеет прогностическую значимость.

Взаимосвязь между гуморальным иммунитетом, частотой инфекционных осложнений и количеством «зрелых» В-клеток и плазматических клеток предстоит выяснить в последующих исследованиях.

Таким образом, несмотря на различия между протоколом «ОЛЛ-2016» (не интенсивное, но постоянное цитостатическое воздействие) и другими международными протоколами терапии ОЛЛ, скорость достижения МОБ-негативного статуса сопоставима. Только программа «hyperCVAD» отличалась от всех протоколов терапии по частоте и скорости достижения МОБ-негативного статуса к 10-й неделе лечения (рис. 6). На всем протяжении лечения количество В-клеточных предшественников было меньше, чем

у доноров, но количество нормальных плазматических клеток оставалось в пределах нормы. Полученные данные указывают на то, что цитостатическое воздействие на дифференцированные В-клетки, применяемое в протоколе, было минимальным. Таким образом, стабильное количество наиболее дифференцированных В-клеток может способствовать сохранению гуморального иммунитета больных. Необходимо продолжить исследование по мониторингу МОБ в рамках протокола «ОЛЛ-2016» для того, чтобы определить

прогностическую значимость МОБ, установить клинически значимый порог минимального количества опухолевых клеток на 70-й, 133-й и 190-й дни, определить необходимость мониторинга МОБ на этапах поддерживающей терапии по протоколу «ОЛЛ-2016». Если будет доказано, что мониторинг МОБ в рамках протокола «ОЛЛ-2016» имеет прогностическую ценность, то в перспективе целесообразно будет рассматривать переход от централизованного определения МОБ к многоцентровому.

Литература

1. Schuurhuis G.J., Heuser M., Freeman S., et al. Minimal/measurable residual disease in AML: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018; 131(12): 1275–1291. DOI: 10.1182/blood-2017-09-801498.
2. 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): 771–782. DOI: 10.1038/leu.2008.5.
3. 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): 5168–5174. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8934.
4. Borowitz M.J., Pullen D.J., Shuster J.J., et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: Relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia*. 2003; 17(8): 1566–1572. DOI: 10.1038/sj.leu.2403001.
5. 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): 138–148. DOI: 10.1038/sj.leu.2402736.
6. Treatment of High Risk Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (LAL-AR/2003). ClinicalTrials.gov (database of privately and publicly funded clinical studies), 2009. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00853008>
7. Gökbüget N., Kneba M., Raff T., et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012; 120(9): 1868–1876. DOI: 10.1182/blood-2011-09-377713.
8. Brüggemann M., Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: Technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2017; 2017(1): 13–21. DOI: 10.1182/asheducation-2017.1.13.
9. Clinical trials AIEOP-BFM ALL 2009 (2007-004270-43). EU Clinical Trials Register, 2010. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>
10. Beldjord K., Chevret S., Asnafi V., et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014; 123(24): 3739–3749. DOI: 10.1182/blood-2014-01-547695.
11. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Промежуточные результаты по лечению острых Ph-негативных лимфобластных лейкозов у взрослых больных (итоги Российской исследовательской группы по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL)). *Онкогематология*. 2014; 3(9): 6–15. DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-3-6-15.

References

1. Schuurhuis G.J., Heuser M., Freeman S., et al. Minimal/measurable residual disease in AML: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018; 131(12): 1275–1291. DOI: 10.1182/blood-2017-09-801498.
2. 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): 771–782. DOI: 10.1038/leu.2008.5.
3. 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): 5168–5174. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8934.
4. Borowitz M.J., Pullen D.J., Shuster J.J., et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: Relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia*. 2003; 17(8): 1566–1572. DOI: 10.1038/sj.leu.2403001.
5. 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): 138–148. DOI: 10.1038/sj.leu.2402736.
6. Treatment of High Risk Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (LAL-AR/2003). ClinicalTrials.gov (database of privately and publicly funded clinical studies), 2009. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00853008>
7. Gökbüget N., Kneba M., Raff T., et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012; 120(9): 1868–1876. DOI: 10.1182/blood-2011-09-377713.
8. Brüggemann M., Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: Technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2017; 2017(1): 13–21. DOI: 10.1182/asheducation-2017.1.13.
9. Clinical trials AIEOP-BFM ALL 2009 (2007-004270-43). EU Clinical Trials Register, 2010. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>
10. Beldjord K., Chevret S., Asnafi V., et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014; 123(24): 3739–3749. DOI: 10.1182/blood-2014-01-547695.
11. Parovichnikova E.N., Troitskaya V.V., Sokolov A.N., et al. Interim results of the Ph-negative acute lymphoblastic leukemia treatment in adult patients (results of Russian research group of ALL treatment (RALL)). *Onkogematologiya*. 2014; 3(9): 6–15. DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-3-6-15. (In Russian).

12. Паровичникова Е.Н., Соколов А.Н., Троицкая В.В. и др. Острые Ph-негативные лимфобластные лейкозы взрослых: факторы риска при использовании протокола ОЛЛ-2009. *Терапевтический архив*. 2016; 88(7): 15–24. DOI: 10.17116/terarkh201688715-24.
13. Multicenter Clinical Trial for Adult Ph-negative ALL. Non-intensive But Non-interruptive Treatment. ClinicalTrials.gov (database of privately and publicly funded clinical studies), 2010. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01193933>
14. De-escalated Treatment Approach for Adult Ph-negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). ClinicalTrials.gov (database of privately and publicly funded clinical studies), 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03462095>
15. Wood B.L. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016; 90(1): 47–53. DOI: 10.1002/cyto.b.21239.
16. Wood B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol*. 2004; 75: 559–576. DOI: 10.1016/S0091-679X(04)75023-2.
17. Wood B.L. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton N.J.). 2013; 999: 123–136. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_8.
18. Dworzak M.N., Buldini B., Gaipa G., et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B*. 2018; 94B: 82–93. DOI: 10.1002/cyto.b.21518.
19. Попов А.М., Верзбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология*. 2016; 9(3): 302–313. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-302-313.
20. 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 Part B*. 2008; 74B: 331–340. DOI: 10.1002/cyto.b.20430.
21. 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): 5477–5485. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837.
22. Ribera J.-M., Oriol A., Morgades M., et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32(15): 1595–1604. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.2425.
23. Bassan R., Spinelli O., Oldani E., et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009; 113(18): 4153–4162. DOI: 10.1182/blood-2008-11-185132.
24. Patel B., Rai L., Buck G., et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: Final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *Br J Haematol*. 2010; 148(1): 80–89. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07941.x.
25. Ravandi F., Jorgensen J.L., O'Brien S.M., et al. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2016; 172(3): 392–400. DOI: 10.1111/bjh.13834.
26. van Lochem E.G., Wiegers Y.M., van den Beemd R., et al. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia*. 2000; 14(4): 688–695. DOI: 10.1038/sj.leu.2401749.
12. Parovichnikova E.N., Sokolov A.N., Troitskaya V.V., et al. Acute Ph-negative lymphoblastic leukemias in adults: Risk factors in the use of the ALL-2009 protocol. *Terapevticheskii arkhiv*. 2016; 88(7): 15–24. DOI: 10.17116/terarkh201688715-24. (In Russian).
13. Multicenter Clinical Trial for Adult Ph-negative ALL. Non-intensive But Non-interruptive Treatment. ClinicalTrials.gov (database of privately and publicly funded clinical studies), 2010. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01193933>
14. De-escalated Treatment Approach for Adult Ph-negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). ClinicalTrials.gov (database of privately and publicly funded clinical studies), 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03462095>
15. Wood B.L. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016; 90(1): 47–53. DOI: 10.1002/cyto.b.21239.
16. Wood B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol*. 2004; 75: 559–576. DOI: 10.1016/S0091-679X(04)75023-2.
17. Wood B.L. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton N.J.). 2013; 999: 123–136. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_8.
18. Dworzak M.N., Buldini B., Gaipa G., et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B*. 2018; 94B: 82–93. DOI: 10.1002/cyto.b.21518.
19. Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Fechina L.G., et al. Acute leukemias: Immunophenotypic differences between blast cells and their nonneoplastic analogues in bone marrow. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2016; 9(3): 302–313. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-302-313. (In Russian).
20. 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 Part B*. 2008; 74B: 331–340. DOI: 10.1002/cyto.b.20430.
21. 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): 5477–5485. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837.
22. Ribera J.-M., Oriol A., Morgades M., et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32(15): 1595–1604. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.2425.
23. Bassan R., Spinelli O., Oldani E., et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009; 113(18): 4153–4162. DOI: 10.1182/blood-2008-11-185132.
24. Patel B., Rai L., Buck G., et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: Final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *Br J Haematol*. 2010; 148(1): 80–89. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07941.x.
25. Ravandi F., Jorgensen J.L., O'Brien S.M., et al. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2016; 172(3): 392–400. DOI: 10.1111/bjh.13834.
26. van Lochem E.G., Wiegers Y.M., van den Beemd R., et al. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia*. 2000; 14(4): 688–695. DOI: 10.1038/sj.leu.2401749.

27. van Wering E.R., van der Linden-Schrevel B.E., Szczepański T., et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: Implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol.* 2000; 110(1): 139–146. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.02143.x.
28. Theunissen P.M.J., van den Branden A., van der Sluijs-Gelling A., et al. Understanding the reconstitution of the B-cell compartment in bone marrow and blood after treatment for B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2017; 178(2): 267–278. DOI: 10.1111/bjh.14685.
29. Liao H., Zheng Q., Jin Y., et al. The prognostic significance of hematogones and CD34+ myeloblasts in bone marrow for adult B-cell lymphoblastic leukemia without minimal residual disease. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 19722. DOI: 10.1038/s41598-019-56126-2.

Информация об авторах

Гальцева Ирина Владимировна*, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: irinagaltseva@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

Давыдова Юлия Олеговна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: davydova.y@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

Паровичникова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: parovichnikova.e@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Гаврилина Ольга Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: dr.gavrilina@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9969-8482>

Троицкая Вера Витальевна, кандидат медицинских наук, заместитель генерального директора по лечебной работе, заведующая отделением интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: troitskaya.v@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4827-8947>

27. van Wering E.R., van der Linden-Schrevel B.E., Szczepański T., et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: Implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol.* 2000; 110(1): 139–146. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.02143.x.
28. Theunissen P.M.J., van den Branden A., van der Sluijs-Gelling A., et al. Understanding the reconstitution of the B-cell compartment in bone marrow and blood after treatment for B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2017; 178(2): 267–278. DOI: 10.1111/bjh.14685.
29. Liao H., Zheng Q., Jin Y., et al. The prognostic significance of hematogones and CD34+ myeloblasts in bone marrow for adult B-cell lymphoblastic leukemia without minimal residual disease. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 19722. DOI: 10.1038/s41598-019-56126-2.

Information about the authors

Irina V. Galtseva*, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Blood and Bone Marrow Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, e-mail: irinagaltseva@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

Yulia O. Davydova, Cand. Sci. (Med.) Physician (clinical diagnostics), Laboratory of Blood and Bone Marrow Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, e-mail: davydova.y@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy for Hemoblastoses, Hematopoietic Depressions and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology, e-mail: parovichnikova.e@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Olga A. Gavrilina, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology, e-mail: dr.gavrilina@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9969-8482>

Vera V. Troitskaya, Cand. Sci. (Med.), Deputy Director General for Therapy, Head of the Department of Intensive High-Dose Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology, e-mail: troitskaya.v@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4827-8947>

Капранов Николай Михайлович, кандидат биологических наук, медицинский физик лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: kapranov.n@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6512-910X>

Никифорова Ксения Александровна, биолог лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: nikiforova.k@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4119-7175>

Исинова Галина Александровна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: rara4v1s@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2763-5391>

Зарубина Ксения Игоревна, врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: ksenijazarubina@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2947-6398>

Соколов Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: sokolov.a@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1494-7978>

Савченко Валерий Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: svg@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 29.05.2021

Принята в печать: 17.06.2021

Nikolay M. Kapranov, Cand. Sci. (Biol.) Medical Physicist, Laboratory of Blood and Bone Marrow Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, e-mail: kapranov.n@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6512-910X>

Ksenia A. Nikiforova, Biologist, Laboratory of Blood and Bone Marrow Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, e-mail: nikiforova.k@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4119-7175>

Galina A. Isinova, Cand. Sci. (Med.), Physician (haematology), Department of Intensive High-Dose Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology, e-mail: rara4v1s@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2763-5391>

Ksenia I. Zarubina, Physician (haematology), Department of Intensive High-Dose Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology, e-mail: ksenijazarubina@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2947-6398>

Andrey N. Sokolov, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology, e-mail: sokolov.a@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1494-7978>

Valery G. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Full Member of the Russian Academy of Sciences, Director General, National Research Center for Hematology, e-mail: svg@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

*** Corresponding author**

Received 29.05.2021

Accepted 17.06.2021