

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕТЕКЦИИ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

Гальцева И.В.^{*}, Смирнова С.Ю., Паровичникова Е.Н.

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

РЕЗЮМЕ

Введение. Исследование минимальной остаточной болезни (МОБ) является необходимым при выполнении многих протоколов терапии острых лейкозов. Для оценки МОБ применяются методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и многоцветной проточной цитометрии (МПЦ).

Цель — охарактеризовать основные технологии обнаружения остаточных опухолевых клеток при острых лейкозах.

Основные сведения. Описываются различные подходы к обнаружению МОБ: ПЦР с пациент-специфическими праймерами для реаранжировок генов иммуноглобулина и/или Т-клеточных рецепторов, ПЦР с обратной транскрипцией для обнаружения химерных транскриптов и оценки экспрессии гиперэкспрессированных генов, а также основы детекции МОБ методом МПЦ. Обсуждаются достоинства, недостатки и ограничения различных методов определения МОБ.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, многоцветная проточная цитометрия, полимеразная цепная реакция, острые лимфобластные лейкозы, острые миелоидные лейкозы

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Гальцева И.В., Смирнова С.Ю., Паровичникова Е.Н. Методические аспекты детекции минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами. Гематология и трансфузиология. 2022; 67(1): 108–120. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-1-108-120>

METHODOLOGICAL ASPECTS OF THE DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

Galtseva I.V.^{*}, Smirnova S.Y., Parovichnikova E.N.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russia

ABSTRACT

Introduction. The study of minimal residual disease (MRD) has become an integral part of various treatment protocols for acute leukemia. Methods of polymerase chain reaction (PCR) and multicolor flow cytometry (MFC) are most widely used to assess MRD.

Aim — to characterize the main technologies for the detection of residual tumor cells in acute leukemia

Main findings. Various approaches for detecting MRD are described: PCR with patient-specific primers for rearranged genes of immunoglobulin and/or T-cell receptors, reverse transcription PCR for detecting chimeric transcripts and assessing the expression of overexpressed genes, as well as the basics of detecting MRD by MFC. Each of these approaches has its own advantages, disadvantages, and limitations of use.

Keywords: minimal residual disease, multicolor flow cytometry, polymerase chain reaction, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia

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

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Galtseva I.V., Smirnova S.Y., Parovichnikova E.N. Methodological aspects of the detection of minimal residual disease in patients with acute leukemia. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2022; 67(1): 108–120 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-1-108-120>

Введение

Исследование минимальной остаточной болезни (МОБ) при острых лейкозах широко применяется в клинической практике. Наличие МОБ на определенных этапах терапии является прогностическим фактором и ассоциировано с высоким риском развития рецидива [1]. Исследование МОБ позволяет проводить стратификацию больных на группы риска и изменять терапию. Кроме того, эффективность новых препаратов, например моноклональных антител, в настоящее время оценивается с помощью исследования МОБ в рамках клинических испытаний. Таким образом, измерение МОБ является суррогатной конечной точкой и позволяет сократить период наблюдения [2, 3].

Методы исследования МОБ должны быть чувствительными, точными, надежными, быстрыми и доступными. В настоящее время широко применяются два метода — полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия (МПЦ).

Цель настоящей работы — охарактеризовать основные технологии обнаружения остаточных опухолевых клеток при острых лейкозах.

Контроль МОБ методом ПЦР

Количественная ПЦР в реальном времени с подбором клоно-специфичных (пациент-специфичных) праймеров к реаранжировкам генов иммуноглобулина и/или Т-клеточного рецептора. При дифференцировке Т- и В-клеток происходит перестройка (или реаранжировка) генов Т-клеточного рецептора (ТКР) и иммуноглобулина (ИГ). Каждая зрелая В- или Т-клетка имеет собственный уникальный реаранжированный ген ИГ или ТКР, соответственно. При лимфоидных новообразованиях обнаруживается опухолевый клон лимфоцитов (или лимфоидных предшественников), и все клетки этого клона имеют одинаковый ген ИГ или ТКР. Этот клон может быть обнаружен методом ПЦР с фрагментным анализом ПЦР-продуктов. В норме, если клетки по-

ликлональны по ИГ и ТКР, все ПЦР-продукты будут различаться по нуклеотидному составу и длине. При обнаружении клона (при лимфоидных новообразованиях, в том числе ОЛЛ) будет доминировать определенный ПЦР-продукт.

Более 90 % В-клеточных ОЛЛ имеют клональные реаранжировки генов ТКР, и около 30 % Т-клеточных ОЛЛ имеют клональные реаранжировки генов ИГ [4]. Клональные реаранжировки генов ИГ либо ТКР выявляют суммарно у 98 % больных В-ОЛЛ и у 95 % больных Т-ОЛЛ [5]. При ОЛЛ это объясняется повышенной и сохраняющейся активностью рекомбинантного комплекса в клетках-предшественниках. При ОЛЛ само по себе выявление Т- или В-клеточной клональности не является критерием для установления диагноза или определения прогноза заболевания и не позволяет судить о линейной принадлежности опухоли, а также не является способом определения МОБ, так как чувствительность этого метода близка к чувствительности морфологического метода. Определение клональности при ОЛЛ до начала лечения является необходимым, поскольку позволяет определить опухоль-специфичные (пациент-специфичные) мишени и контролировать МОБ на протяжении всех этапов терапии [6]. Оценка МОБ при ОЛЛ при помощи подбора пациент-специфичных праймеров состоит из следующих этапов:

1. Определение Т- и В-клеточной клональности по генам дельта-, гамма-, бета-цепей ТКР, перестроек тяжелой и легкой цепи ИГ в дебюте заболевания.

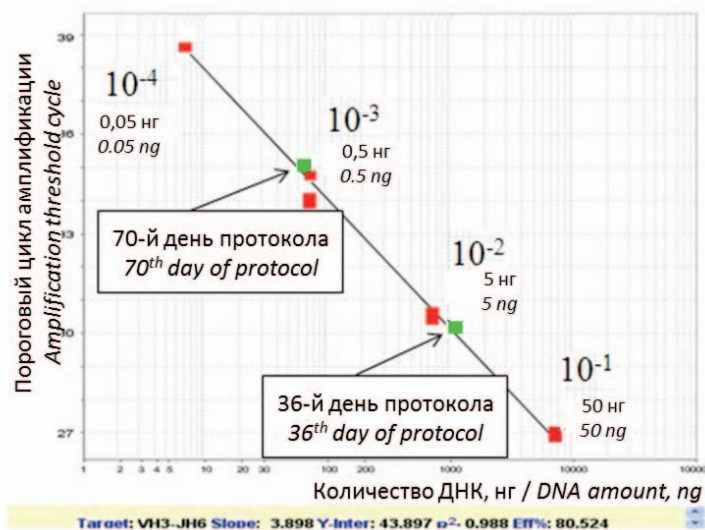


Рисунок 1. Стандартная кривая, построенная по серии разведений моноклональной опухолевой ДНК. Стрелками показан результат определения МОБ на 36-й и 70-й дни терапии по протоколу «ОЛЛ-2009». На 36-й день количество опухолевых клеток составило $2,80 \times 10^{-2}$. На 70-й день терапии определяется МОБ без подсчета количества опухолевых клеток

Figure 1. Standard curve constructed from a series of dilutions of monoclonal tumor DNA. The arrows show the results of the minimal residual disease on the 36th and 70th days of therapy according to the «ALL-2009» protocol. On the 36th day the number of tumor cells was 2.80×10^{-2} . On the 70th day of therapy, the minimum residual disease is determined without counting the number of tumor cells

Определение нуклеотидной последовательности клональных продуктов. Подбор и тестирование пациент-специфичных праймеров.

2. Исследование костного мозга (КМ) в контрольных точках в зависимости от протокола лечения с подобранными пациент-специфичными праймерами [6, 7].

Таким образом, без исследования КМ в дебюте ОЛЛ оценка МОБ в контрольных точках невозможна.

Поскольку для каждого больного и для каждой клональной реаранжировки подбирается индивидуальный праймер, то условия ПЦР реакции и чувствительность метода будут различными [6, 7].

Для оценки МОБ и определения чувствительности метода проводят построение стандартной (калибровочной) кривой с известным количеством опухолевой ДНК. Для этого моноклональную опухолевую ДНК больного, полученную в дебюте заболевания, разводят в поликлональной смеси ДНК, выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови как минимум 6 здоровых доноров. Определение МОБ с подбором пациент-специфичных праймеров является количественным методом и имеет подсчетную чувствительность, в пределах которой может быть определено точное количество опухолевых клеток по отношению к нормальным клеткам, и общую чувствительность, которая не позволяет определить количество, но позволяет определить наличие опухолевых клеток, в том случае если их количество выходит за пределы подсчетной чувствительности [6, 7].

Рассмотрим, что означают данные ответы на конкретном примере (рис. 1). После построения стандартной (калибровочной) кривой у больного К., страдающего В-ОЛЛ, определена подсчетная чувствительность равная 10^{-3} . Это означает, что после начала лечения определить точное количество опухолевых клеток будет возможно, только если в образце их будет более одной опухолевой клетки на 1000 нормальных клеток. У данного больного на 36-й день терапии (рис. 1) по протоколу «ОЛЛ-2009» (NCT01193933) [8] определялось большое количество опухолевых клеток – $2,8 \times 10^{-2}$. Также у метода определена общая чувствительность равная 10^{-4} , это означает, что если в образце после лечения опухолевых клеток меньше, чем количество, определенное подсчетной чувствительностью (в данном случае 10^{-3}), но больше чем 1 клетка на 10 000 нормальных, то можно сделать вывод о наличии опухолевых клеток. Однако подсчитать их количество невозможно. На 70-й день от начала терапии у больного К. количество опухолевых клеток в образце было меньше подсчетной чувствительности, но больше общей чувствительности, то есть МОБ определялась без подсчета количества опухолевых клеток (рис. 1).

Клональный состав опухолевой популяции нестабилен и клональные реаранжировки могут меняться с течением заболевания, что усложняет процесс контроля

МОБ по установленным в дебюте заболевания мишеням. У части больных это может приводить к ложноотрицательным результатам [4, 9]. Однако речь идет именно о частичной смене клональных реаранжировок, и использование нескольких клональных мишеней в процессе контроля МОБ позволяет избежать такой проблемы.

Анализ транскриптов химерных генов методом количественной ПЦР с реакцией обратной транскрипции. При переносе генетического материала с одной хромосомы на другую происходит образование химерного гена. Ген транскрибируется с образованием матричной РНК (мРНК), с которой транслируется аномальный белок. Некоторые хромосомные транслокации специфичны для лейкозов определенного типа и имеют прогностическую значимость, поэтому их определяют до проведения терапии в дебюте заболевания, что можно использовать для проведения мониторинга МОБ. Анализ транскриптов химерных генов при помощи ПЦР является простым и недорогим методом, обладающим высокой чувствительностью, однако этот метод имеет существенное ограничение ввиду того, что слитные гены у больных ОЛЛ встречаются нечасто [10, 11]. Суммарная частота $t(9;22)/bcr-abl$, $t(1;19)/E2A-PBX1$, $t(4;11)/MLL-AF4$, $t(12;21)/ETV6-RUNX1$ ($TEL-AML1$) при В-ОЛЛ составляет 40–45 %. Химерные транскрипты с участием гена *MLL* возникают в результате реаранжировок 11q23, обнаруживаются и при ОЛЛ, и при ОМЛ и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Детекция МОБ с помощью этих транскриптов представляется трудной задачей, так как химерные гены *KMT2A (MLL)* могут возникать вследствие 50 различных транслокаций [12].

Контроль МОБ при ОЛЛ при помощи оценки экспрессии химерного гена проводится методом количественной ПЦР в реальном времени с предварительным проведением реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) [13]. В случае ОТ-ПЦР химерных транскриптов для получения количественного значения МОБ в контрольных точках используют стандарты или калибраторы с известным числом молекул [10]. Возможно также использование подхода, в котором количественную оценку транскрипта оценивают по отношению к экспрессии гена «домашнего хозяйства» [13]. Гены «домашнего хозяйства» — гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне.

На практике широко проводится мониторинг МОБ по анализу транскрипта химерного гена *BCR-ABL*. Этот аномальный ген образуется в результате реципрокной транслокации $t(9;22)$, которая также называется филадельфийской хромосомой (или Ph-хромосомой, где Ph — сокращение от англ. «Philadelphia chromosome»,

филадельфийская хромосома). Установлено, что разрывы гена *ABL* при данной транслокации происходят всегда в одном месте, а разрывы гена *BCR* могут возникнуть в разных участках. В зависимости от места разрыва возможно образование нескольких типов транскрипта (p190, p210 и p230). Разные по длине BCR-варианты белка BCR-ABL характерны для разных заболеваний: p210 (реже p230) чаще обнаруживаются при хроническом миелолейкозе (ХМЛ), а p190 — при В-клеточном ОЛЛ с Ph-хромосомой (Ph-позитивном ОЛЛ). Однако при Ph-позитивном ОЛЛ все-таки может выявляться вариант p210 или встречаться одновременно p190 и p210. Поэтому в дебюте заболевания необходимо установить тип транскрипта, а затем отслеживать его количество методом ОТ-ПЦР в контрольных точках. Такой способ мониторинга МОБ предусмотрен в протоколе лечения Ph-позитивных ОЛЛ взрослых «Ph+ ALL-2012m» [14].

У больных ОМЛ контроль МОБ молекулярно-генетическим методом представляется сложной задачей, так как нет унифицированных маркеров. Некоторые генетические мутации и транскрипты слитных генов могут быть использованы для определения прогноза заболевания и мониторинга МОБ [15]. Примером варианта ОМЛ, при котором мониторинг МОБ успешно осуществляется по анализу химерного транскрипта, является острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ). Для ОПЛ характерна транслокация (15;17), которая приводит к образованию химерного гена *PML-RAR* [16]. В российском протоколе терапии ОПЛ по модифицированной программе AIDA (mAIDA) предусмотрен постоянный мониторинг МОБ по оценке экспрессии *PML-RAR* для своевременного изменения терапевтического воздействия в случае развития молекулярного рецидива. МОБ у больных ОПЛ другими методами (в т. ч. МПЦ) не проводят [14].

У больных ОМЛ наиболее часто встречаемыми хромосомными реаранжировками являются $t(8;21)$ и $inv(16)/t(16;16)$, которые ведут к появлению химерных генов *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)* и *CBFβ-MYH11* соответственно. Частота их обнаружения составляет 15–45 %, и все они ассоциированы с благоприятным прогнозом [17]. Молекулярные исследования по мониторингу МОБ с использованием в качестве мишеней *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11* немногочисленны и включают относительно малое число больных. Эти исследования показали, что более высокие уровни химерных транскриптов ассоциированы с более короткой безрецидивной выживаемостью [18]. В работе J. Ouyang и соавт. [18] у больных с количеством химерных транскриптов *RUNX1-RUNX1T1* или *CBFβ-MYH11* $\leq 0,1$ % рецидивов не было, с количеством 0,1–10 % рецидив развился у 30 % больных, с количеством ≥ 10 % рецидив развился у 50 % больных.

Наиболее известным и изученным белком с мутациями в его гене, который ассоциирован с ОМЛ, является

ся рецепторная тирозинкиназа 3 (FLT3). Этот белок имеет функцию внутриклеточной тирозинкиназы и участвует в росте и дифференцировке стволовых клеток [19]. В 30 % случаев ОМЛ обнаруживаются мутации гена *FLT3*. Существует несколько мутаций данного гена, наиболее часто обнаруживаются внутренние tandemные дупликации (*FLT3*-internal tandem duplication (ITD)), которые ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. У больных с выявленной мутацией *FLT3* определяется нормальный кариотип, однако иногда определяется 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 прогностическая роль на долгосрочные результаты терапии этих мутаций не доказана [20]. Ограничением применения мутации гена *FLT3* в качестве мишени для мониторинга МОБ является ее нестабильность при проведении терапии: мутации могут меняться или исчезать [21].

В сравнении с мутациями гена *FLT3*, мутации *NPM1*-гена более стабильны. Встречаются примерно у 30 % больных ОМЛ с аномальным кариотипом и у 50 % больных ОМЛ с нормальным кариотипом. Ген *NPM1* располагается на 5-й хромосоме и кодирует фосфопротеин, который участвует в поддержке стабильности генома, образовании рибосом, регуляции транскрипции и опухолевой супрессии [22]. В исследованиях, в которых использовали в качестве мишени мутации гена *NPM1* для мониторинга МОБ, установили прогностическую значимость этого маркера [23].

На этапе диагностики исследование мутаций проводится при помощи фрагментного анализа с капиллярным электрофорезом. Если в образце менее 10 % опухолевых клеток с одной из данных мутаций, результат будет отрицательным. Мутантный аллель *NPM1* больше «дикого» аллеля на 4 пары нуклеотидов и легко выявляется при проведении капиллярного электрофореза [24].

Альтернативной мишенью для молекулярного мониторинга МОБ при ОМЛ является исследование гиперэкспрессирующихся генов, таких как *WT1*, *EVII* и *PRAME*. Эти гены экспрессируются в низких количествах в нормальных гемопоэтических клетках [25]. Ограничением исследования генов *WT1* и *PRAME* является то, что в нормальных регенерирующих клетках КМ они также могут быть гиперэкспрессированы, что приводит к ложноположительным результатам. Однако в случаях, когда на фоне постоянной экспрессии *WT1* в периоде ремиссии его экспрессия повышается, можно заподозрить надвигающееся развитие рецидива [26, 27].

Согласно рекомендациям Европейской рабочей группы по острым лейкозам [28], определение минимальной остаточной болезни с помощью ПЦР следует проводить, если имеются мутации *NPM1*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*. Выявление мутаций *FLT3* и экспрессии *EVII* не должно использоваться в качестве одиночных

маркеров МОБ. Однако их обнаружение может быть полезным при использовании их в сочетании с основным маркером МОБ. Экспрессия *WT1* может быть оценена, если у больного нет других индикаторов МОБ. Оценивать МОБ методом ПЦР в периферической крови и КМ рекомендуется перед лечением, после 2 циклов индукции/консолидации и при окончании терапии, а также каждые 3 мес. в течение 2 лет после окончания терапии в КМ или крови (или каждые 4–6 нед. в периферической крови) [28]. В этих рекомендациях также определяются условия молекулярной прогрессии и молекулярного рецидива. Молекулярная прогрессия — это увеличение количества копий МОБ ≥ 1 lg между любыми двумя положительными образцами у больного с молекулярной персистенцией МОБ. Молекулярный рецидив — это увеличение значения МОБ ≥ 1 lg между двумя положительными образцами у больного, у которого ранее был негативный МОБ-статус. Преобразование отрицательного в положительное значение МОБ должно быть подтверждено при повторном исследовании через 4 нед. после первого положительного результата анализа. Если МОБ увеличивается в последующих точках исследования ≥ 1 lg, то диагностируют молекулярный рецидив [28].

Исследование химерных транскриптов (РНК) методом ОТ-ПЦР позволяет достичь чувствительность, превосходящую метод МПЦ, но имеет несколько недостатков. РНК склонна к деградации, а ее эффективность конверсии в комплементарную ДНК варьирует. Кроме того, количество РНК в лейкоэмических клетках также различно и нестабильно в ходе терапии. Все это ведет к тому, что МОБ, оцененная на основе РНК, лишь в ограниченной степени сопоставима между разными больными [29].

Определение МОБ при ОЛЛ методом МПЦ

Детекция МОБ методом МПЦ основана на выявлении лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа (ЛАИФ). ЛАИФ — это сочетание антигенов, характерное для опухолевых клеток и не обнаруживающееся (или обнаруживающееся в небольшом количестве) на нормальных гемопоэтических клетках. Проявлением ЛАИФ может быть наличие экспрессии миелоидных маркеров на клетках лимфоидного происхождения (например, экспрессия CD33 при В-ОЛЛ), повышенная экспрессия антигенов (например, CD7 при Т-ОЛЛ или CD10 при В-ОЛЛ), сниженная экспрессия антигенов (например, CD38 при В-ОЛЛ), а также эктопическая экспрессия (появление в КМ клеток с фенотипом, встречающимся в норме в других органах и тканях, например наличие в КМ клеток с фенотипом Т-линейных предшественников [30]). Повышение или снижение экспрессии антигенов на опухолевых лимфобластах оценивается по сравнению со здоровыми аналогами гемопоэтических предшественников.

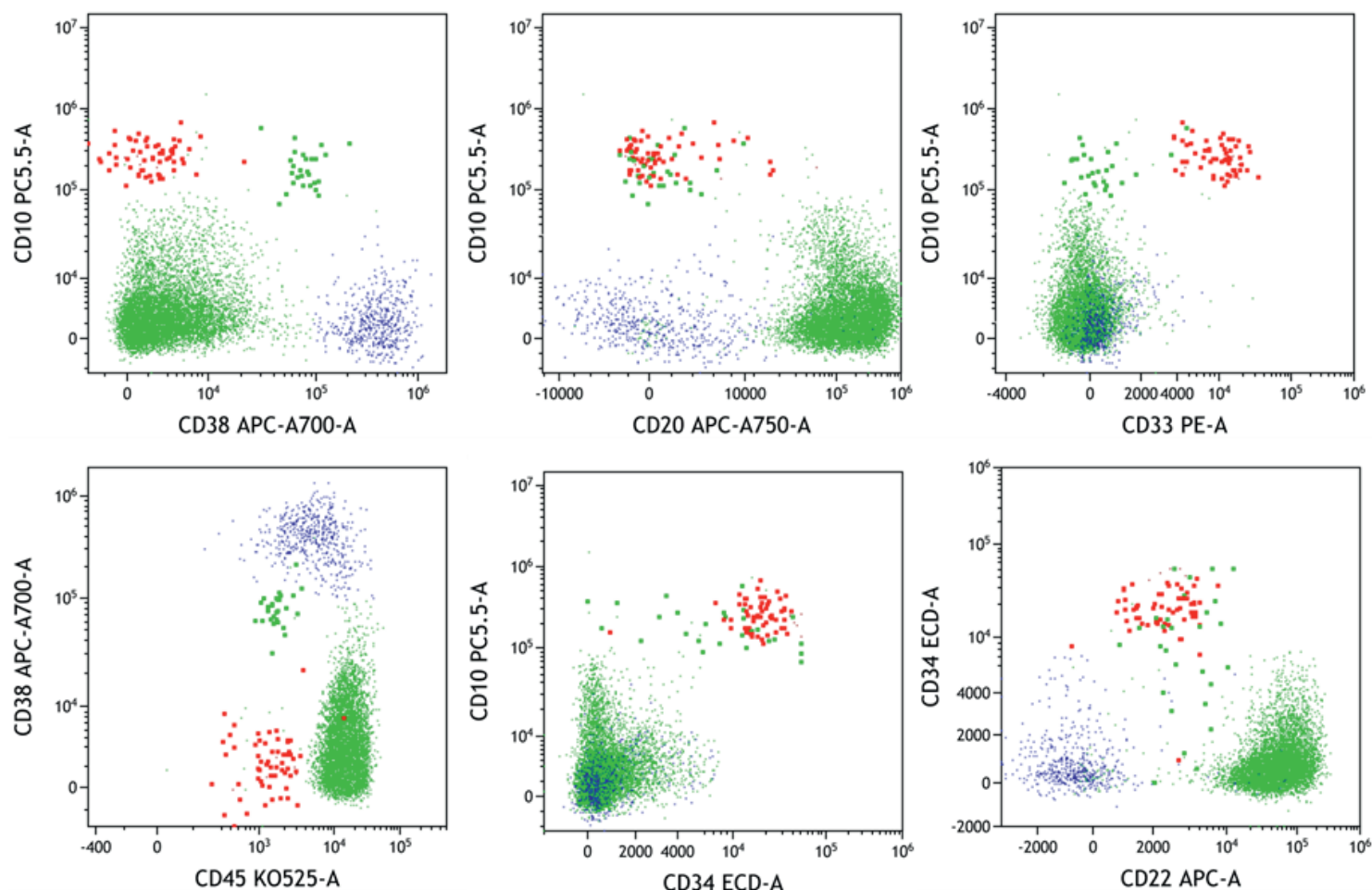


Рисунок 2. Пример обнаружения опухолевых клеток у больного В-ОЛЛ после терапии. Обнаружена опухолевая популяция $CD19^+CD10^+CD34^+$ с пониженной экспрессией $CD38$ и коэкспрессией миелоидного маркера $CD33$. На точечных графиках показаны только $CD19^+$ клетки. Зеленым цветом выделены В-клеточные предшественники и зрелые В-лимфоциты, синим — плазматические клетки, красным — остаточная опухолевая популяция. Данные получены на проточном цитометре CytoFlex, обработаны в программе Kaluza Analysis 2.1

Figure 2. An example of the detection of tumor cells in a patient with B-acute lymphoblastic leukemia after therapy. A tumor population $CD19^+CD10^+CD34^+$ with reduced expression of $CD38$ and co-expression of the myeloid marker $CD33$ was found. Scatter plots show only $CD19^+$ cells. B-cell progenitors and mature B-lymphocytes are highlighted in green, plasma cells — in blue, and residual tumor population — in red. Data obtained on flow cytometer CytoFlex processed in Kaluza Analysis 2.1

Поиск МОБ методом МПЦ может быть выполнен на основе двух методических подходов [31]. Первый подход подразумевает поиск ЛАИФ на лейкомиических клетках в дебюте заболевания. По данным исследования в дебюте заболевания подбирают панель моноклональных антител, которую затем используют для мониторинга МОБ при проведении терапии. У каждого больного она может быть различной. Второй подход требует наличия сведений о нормальном иммунофенотипе зрелых клеток и их предшественников, а поиск МОБ сводится к поиску клеток с иммунофенотипом, отличным от нормального. В этом случае сведения об иммунофенотипе бластных клеток в дебюте заболевания не обязательны, и во всех контрольных точках применяют одну универсальную и широкую панель моноклональных антител, которая позволяет обнаружить опухолевые клетки определенной линейности. То есть для детекции МОБ у больных В-ОЛЛ, Т-ОЛЛ и ОМЛ применяют абсолютно разные сочетания моноклональных антител. В настоящее время рекомендуется комбинировать оба подхода: в дебюте заболевания

производить поиск ЛАИФ с помощью той же панели, по которой в дальнейшем будет производиться детекция МОБ. ЛАИФ, определенный в дебюте, используется как отправная точка в поиске МОБ, однако все клеточные популяции сравниваются с нормальными стадиями созревания гемопоэтических клеток [32, 33].

Общие представления о детекции МОБ методом МПЦ у больных В-ОЛЛ. В-клеточные предшественники (гематопоны) дифференцируются в зрелые В-клетки в КМ, которые затем покидают КМ и высвобождаются в периферическую кровь. Особенности изменения антигенного профиля, происходящего при В-лимфопозе, хорошо изучены. Линейно ассоциированным В-клеточным маркером является $CD19$, но на самых ранних В-клеточных предшественниках $CD19$ отсутствует, а на поверхности клеток экспрессируется $CD34$ совместно с $CD22$. Затем по мере созревания В-клеточные предшественники начинают экспрессировать $CD19$, $CD34$ и $CD10$. Далее гематопоны теряют экспрессию $CD34$, экспрессия $CD10$ снижается, а экспрессия $CD19$ и $CD45$ повышается. Переходя в зрелую фазу, В-клетки приобретают мем-

бранную экспрессию IgM, характеризуются высокой экспрессией CD45 и отсутствием CD10. Количество В-клеточных предшественников в КМ крайне вариабельно и зависит от возраста [30, 34, 35].

Зная иммунофенотипическую характеристику стадий нормального развития В-клеток КМ, можно дифференцировать их с опухолевыми В-лимфобластными клетками (рис. 2). Однако вследствие того, что антигенный профиль нормальных и опухолевых клеток пересекается, необходимо исследовать коэкспрессию многих маркеров. Для этих целей рекомендуют множество панелей моноклональных антител, и оптимальным является сочетание CD19, CD10, CD34, CD38, CD20, CD58, иногда полезным может быть включение CD11a, CD13, CD33, CD9, CD22, CD81 [30, 36–38].

Общие представления о детекции МОБ методом МПЦ у больных Т-ОЛЛ. Иммунофенотип лейкоемических клеток при Т-ОЛЛ близок к иммунофенотипу нормальных Т-клеточных предшественников. Однако в отличие от В-клеток, созревание Т-клеток происходит в тимусе,

а не в КМ. Т-клетки в КМ представлены только зрелыми Т-клетками, попавшими из периферической крови. Детекция МОБ при Т-ОЛЛ подразумевает поиск в пунктате КМ клеток с иммунофенотипом Т-клеточных предшественников. Зрелые Т-клетки в костном мозге имеют иммунофенотип $CD7^+CD3^{cyt^+}CD5^+CD2^+CD3^+$ и экспрессируют CD4 или CD8. При поиске МОБ уделяют внимание наличию опухолевых клеток с иммунофенотипом незрелых Т-клеток: цитоплазматическая экспрессия CD3 без поверхностной экспрессии CD3, а также снижение экспрессии CD2, CD5 или аномальной экспрессии CD4 и CD8, наличие маркеров CD34, TdT, высокая экспрессия CD99 и низкая — CD45. Может быть полезным также исследование нелинейной коэкспрессии миелоидных антигенов [30, 39].

При поиске МОБ могут встречаться нормальные клетки с нетипичным иммунофенотипом в небольшом количестве. При анализе $CD7^+$ -популяции большинство Т-клеток имеет иммунофенотип $CD3^+CD5^+$, однако может встречаться субпопуляция $CD3^-CD5^+$, которая

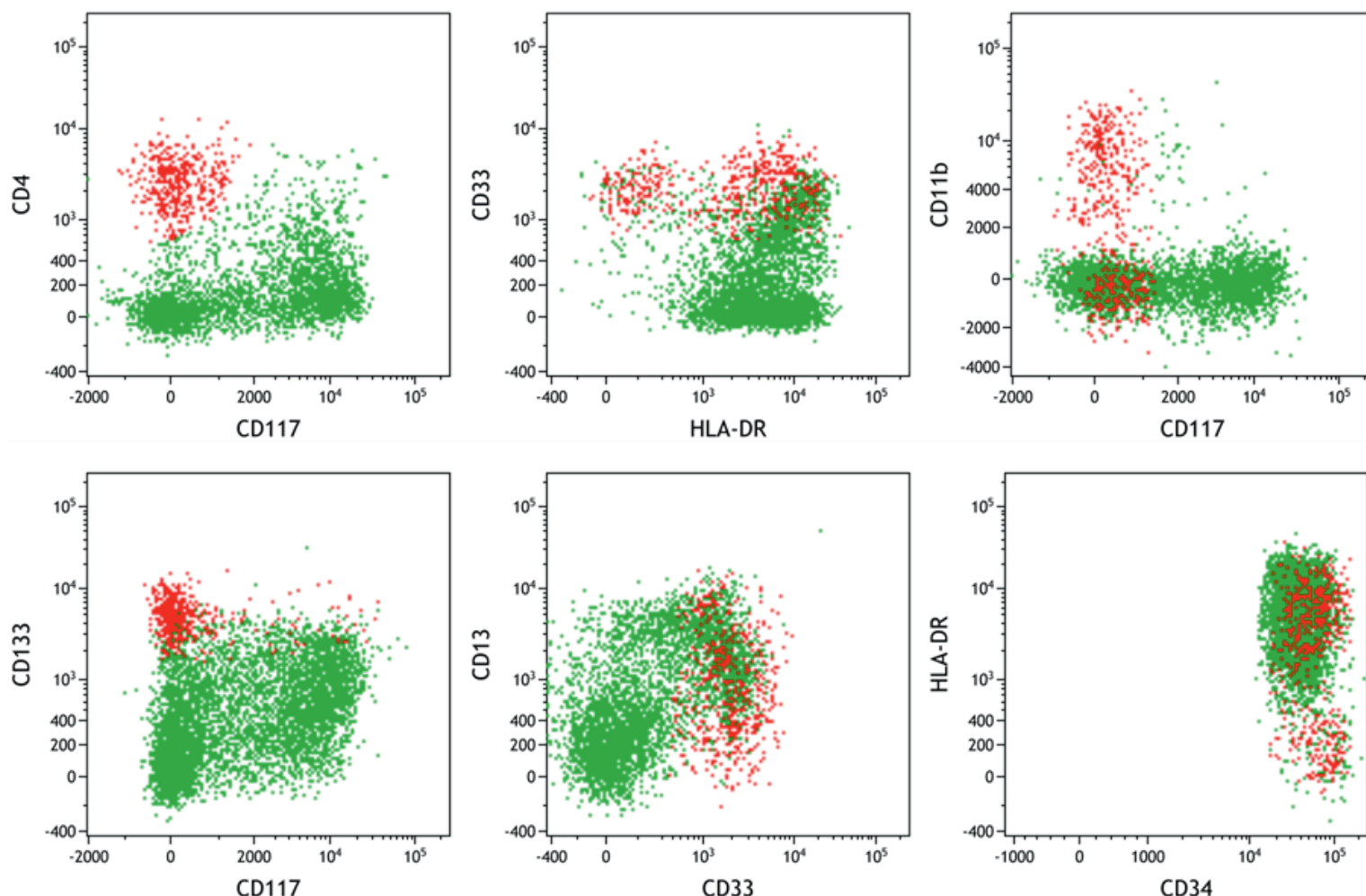


Рисунок 3. Пример обнаружения опухолевых клеток у больного ОМЛ после терапии. Обнаружена CD34-положительная опухолевая популяция с коэкспрессией CD4, CD133 и отсутствием CD117, а также частичным отсутствием HLA-DR и частичной асинхронной коэкспрессией CD11b. На точечных графиках показаны только $CD34^+$ клетки. Зеленым цветом выделены нормальные клетки, красным — остаточная опухолевая популяция. Данные получены на проточном цитометре CytoFlex, обработаны в программе Kaluza Analysis 2.1

Figure 3. An example of the detection of tumor cells in a patient with acute myeloid leukemia after therapy. A CD34-positive tumor population was found with co-expression of CD4, CD133 and the absence of CD117, as well as a partial absence of HLA-DR and partial asynchronous co-expression of CD11b. Scatter plots show only $CD34^+$ cells. Normal cells are highlighted in green and residual tumor population in red. Data obtained on flow cytometer CytoFlex processed in Kaluza Analysis 2.1

соответствует НК-клеткам и $CD3^+CD5^-$, которые являются $\gamma\delta$ -Т-клетками, количество которых увеличивается с возрастом [39, 40].

Общие представления о детекции МОБ методом МПЦ у больных ОМЛ. Принцип детекции МОБ при ОМЛ такой же, как и при ОЛЛ, и основан на поиске клеток с ЛАИФ. Примерами ЛАИФ при ОМЛ могут быть: обнаружение лимфоидных маркеров на клетках миелоидного происхождения (например, экспрессия $CD7$); повышенная экспрессия антигенов (например, $CD33$, $CD34$, $CD99$); сниженная экспрессия антигенов (например, $CD38$, $HLA-DR$); асинхронная коэкспрессия ранних и поздних антигенов (например, $CD34$ и $CD11b$) [41]. Пример детекции МОБ методом МПЦ показан на рис. 3. Следует учитывать, что на нормальных гемопоэтических клетках, особенно при регенерации клеток КМ, может встречаться «аномальная» экспрессия ряда антигенов. Лимфоидные антигены $CD2$, $CD7$ и $CD56$ присутствуют на нормальных $CD34^+$ предшественниках, но таких клеток в норме немного [42–44].

В сравнении с детекцией МОБ при ОЛЛ, поиск МОБ при ОМЛ представляет собой более трудную задачу. Иммунофенотип миелоидных бластных клеток значительно отличается у разных больных, поэтому отработка стандартной системы гейтирования становится проблемной. Кроме того, популяция бластных клеток даже у одного больного может быть гетерогенной и состоять как из незрелых клеток-предшественниц, так и из клеток с экспрессией зрелых миеломоноцитарных маркеров. Поэтому важным при исследовании МОБ на этапах терапии является изучение иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания для установления основного ЛАИФ с помощью той же панели антител, которая затем будет использоваться для мониторинга МОБ. Однако для ОМЛ характерен «иммунофенотипический сдвиг», то есть исчезновение экспрессии антигенов, которые обнаруживались в дебюте заболевания, и/или появление новых антигенов на бластных клетках при проведении терапии.

Изменения в иммунофенотипе лейкозных клеток обнаруживают как при проведении лечения, так и при развитии рецидива [45, 46]. M.R. Baer и соавт. [47] показали, что у 91 % больных ОМЛ при рецидиве заболевания иммунофенотип бластных клеток изменяется, но это изменение не ассоциировано с прогнозом. D. Voskova и соавт. [48] показали смену ЛАИФ, а также цитогенетических и молекулярных параметров у больных с рецидивом ОМЛ. В исследовании ОМЛ у детей отмечено, что при рецидиве заболевания иммунофенотип лейкозных клеток становится незрелым, т. е. «теряются» антигены $CD14$, $CD11b$, $CD15$ [45].

Исследование МОБ методом МПЦ возможно у 80–100 % больных ОМЛ в отличие от метода ПЦР, который применим лишь у 30 % больных. Однако стандартизация метода МПЦ остается дискуссионной. В разных лабораториях значительно отличаются используемые

панели антител, количество одновременно анализируемых параметров, а также применяемые подходы анализа данных. Согласно рекомендациям Европейской рабочей группы по острым лейкозам [28], анализ МОБ у больных ОМЛ предлагается проводить с помощью не менее 8-цветного анализа с включением в панель моноклональных антител против $CD7$, $CD11b$, $CD13$, $CD15$, $CD19$, $CD33$, $CD34$, $CD45$, $CD56$, $CD117$, $HLA-DR$. Выделение бластных клеток должно выполняться на основе анализа $CD45$, $CD34$, $CD117$, $CD13$, $CD33$, а также прямого и бокового светорассеяния. В случаях необходимости дополнительно исследовать комбинацию антигенов $CD64$, $CD11b$, $CD14$, $CD4$, $CD34$, $HLA-DR$, $CD33$, $CD45$, позволяющую оценить моноцитарную дифференцировку клеток.

Для решения проблем, связанных с низким различием в антигенном профиле бластных клеток и нормальных предшественников и «иммунофенотипическим сдвигом», необходимо использовать комплексную стандартизованную панель моноклональных антител, позволяющую одновременно исследовать коэкспрессию большого количества антигенов. Увеличивающееся количество цветов приводит к тому, что ручная обработка данных становится крайне трудной, поэтому применение автоматических алгоритмов анализов является перспективным [49].

Количественное определение и чувствительность детекции МОБ методом МПЦ. При детекции МОБ методом МПЦ в контрольной точке проводят анализ всех клеток КМ. Применяя принципы поиска МОБ, описанные выше, находят опухолевую популяцию клеток с определенным иммунофенотипом и подсчитывают количество клеток, составляющих данную популяцию. Далее определяют количество проанализированных ядродержащих клеток (используя нуклеотропные красители Syto или выделение клеток по показателям прямого и бокового светорассеяния) или количество лейкоцитов (используя маркер $CD45$). Затем определяют долю опухолевых клеток от всех ядродержащих клеток или лейкоцитов. Результат исследования МОБ считают положительным, если при цитометрическом исследовании выявлена популяция лейкемических клеток, состоящая, по меньшей мере, из 10–50 клеток с aberrантной экспрессией определенных антигенов (количество клеток, формирующих минимальную популяцию, в разных лабораториях может отличаться). Если среди собранных клеток не обнаружено и 10–50 лейкемических клеток, то делается заключение, что МОБ не выявлена при достигнутой чувствительности анализа.

При этом не исключается вероятность того, что МОБ будет обнаружена, но будет меньше достигнутого порога чувствительности. Чувствительность же определяется при каждом анализе и зависит от общего количества проанализированных клеток. Например, если за минимальную принимается по-

пуляция, состоящая из 20 клеток, то чувствительность определяется по формуле 1.

$$\text{чувствительность} = \frac{20}{\text{количество ядродержащих клеток}} \times 100\% \quad (1)$$

Необходимая чувствительность метода составляет 0,01 %. Для того, чтобы достичь такую чувствительность, необходимо проанализировать 200 000 клеток и более (если минимальной была принята популяция, состоящая из 20 клеток). Если такая чувствительность не достигается, например, вследствие низкой клеточности КМ или значительного разведения материала периферической кровью, то необходимо провести повторную пункцию КМ и повторное исследование МОБ.

В последнее время при мониторинге МОБ уделяют особое внимание понятиям LOD и LLOQ, которые аналогичны понятиям общей и подсчетной чувствительности при ПЦР. LOD (англ. limit of detection) — это минимальный порог детекции, когда найдена популяция не менее чем из 30 клеток, что позволяет сделать заключение просто о наличии МОБ (формула 2). LLOQ (англ. lower limit of quantification) — это порог точной количественной оценки, который достигается, если найдена популяция не менее чем из 50 клеток, когда возможно определить уровень МОБ точно и воспроизводимо (формула 3).

$$\text{LOD} = \frac{30 \text{ аберрантных клеток}}{\text{количество ядродержащих клеток}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{LLOQ} = \frac{50 \text{ аберрантных клеток}}{\text{количество ядродержащих клеток}} \times 100\% \quad (3)$$

LOD и LLOQ, так же как и чувствительность, зависят от количества собранных клеток. Таким образом, если среди собранных событий обнаружена популяция, состоящая из 50 аберрантных клеток и более, то МОБ выявляется и может быть точно подсчитана. В этом случае в заключении указывают подсчитанное значение МОБ. Если среди собранных событий обнаружена популяция, состоящая из более 30, но менее 50 аберрантных клеток, то МОБ выявляется, однако точная количественная оценка не может быть дана. В этом случае в заключении указывают диапазон от LOD до LLOQ, в котором находится истинное значение МОБ [50].

Таким образом, основными методами, используемыми в диагностике МОБ, являются ПЦР и МПЦ. Применимость обоих методов при анализе МОБ при ОЛЛ достигает 90 %, что привело к интеграции ПЦР и МПЦ в протоколы терапии. Применимость ПЦР для поиска МОБ при ОМЛ составляет только 30 %, а исследование МОБ методом МПЦ возможно в 80–100 % случаев, но сопряжено с методическими трудностями: требует высокого уровня подготовленности и профессионализма персонала, хорошего технического оснащения и широкого набора моноклональных антител, удовлетворяющих требованиям современных методических рекомендаций. Диагностика МОБ должна быть доступна для оценки ответа на лечение у каждого больного острым лейкозом, так как позволяет провести точную оценку риска и своевременно оптимизировать терапию.

Литература

1. Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Паровичникова Е.Н. Определение минимальной измеримой остаточной болезни у взрослых больных острыми лейкозами. Гематология и трансфузиология. 2020; 65(4): 460–72. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-460-472.
2. van Dongen J.J.M., van der Velden V.H.J., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. Blood. 2015; 125(26): 3996–4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027.
3. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010; 2010: 7–12. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.7.
4. Szczepański T., van der Velden V.H.J., Raff T., et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. Leukemia. 2003; 17(11): 2149–56. DOI: 10.1038/sj.leu.2403081.
5. van Dongen J.J.M., Langerak A.W., Brüggemann M., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003; 17(12): 2257–317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
6. van der Velden V.H.J., Cazzaniga G., Schrauder A., et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for inter-

References

1. Galtseva I.V., Davydova Y.O., Parovichnikova E.N. Detection of measurable residual disease in adults with acute leukaemia. Gematologiya i transfuziologiya. 2020; 65(4): 460–72. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-460-472. (In Russian).
2. van Dongen J.J.M., van der Velden V.H.J., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. Blood. 2015; 125(26): 3996–4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027.
3. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010; 2010: 7–12. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.7.
4. Szczepański T., van der Velden V.H.J., Raff T., et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. Leukemia. 2003; 17(11): 2149–56. DOI: 10.1038/sj.leu.2403081.
5. van Dongen J.J.M., Langerak A.W., Brüggemann M., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003; 17(12): 2257–317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
6. van der Velden V.H.J., Cazzaniga G., Schrauder A., et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for inter-

- pretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007; 21(4): 604–11. DOI: 10.1038/sj.leu.2404586.
7. Смирнова С.Ю., Сидорова Ю.В., Судариков А.Б. Методика определения минимальной остаточной болезни при остром лимфобластном лейкозе. Справочник заведующего КДЛ. 2015; 4: 50–61.
 8. 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. URL: <https://clinicaltrials.gov/>
 9. Смирнова С.Ю., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В. и др. Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых. *Acta naturae* (русскоязычная версия). 2016; 8(4): 108–18.
 10. van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A., et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999; 13(12): 1901–28. DOI: 10.1038/sj.leu.2401592.
 11. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2003; 121(6): 823–38. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04393.x.
 12. Scholl C., Breitinger 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 Chromosomes Cancer*. 2003; 38(3): 274–80. DOI: 10.1002/gcc.10284.
 13. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H.J., et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — A Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2318–57. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135.
 14. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. В 2 т. Т. 1. М.: Практика; 2018.
 15. Döhner H., Estey E., Grimwade D., et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129(4): 424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
 16. Chen Z., Tong Y., Li Y., et al. Development and validation of a 3-Plex RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantitation of the three PML-RARa fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0122530. DOI: 10.1371/journal.pone.0122530.
 17. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V., et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116(3): 354–65. DOI: 10.1182/blood-2009-11-254441.
 18. 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.
 19. Gilliland D.G., Griffin J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100(5): 1532–42. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0492.
 20. 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.
 21. 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.
 7. Smirnova S.Yu., Sidorova Yu.V., Sudarikov A.B. Method for determining the minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Spravochnik za-veduyushchego KDL*. 2015; 4: 50–61. (In Russian).
 8. 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. URL: <https://clinicaltrials.gov/>
 9. Smirnova S.Yu., Sidorova Yu.V., Ryzhikova N.V., et al. Evolution of tumor clones in acute lymphoblastic leukemia in adults. *Acta naturae*. 2016; 8(4): 108–18. (In Russian).
 10. van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A., et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999; 13(12): 1901–28. DOI: 10.1038/sj.leu.2401592.
 11. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2003; 121(6): 823–38. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04393.x.
 12. Scholl C., Breitinger 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 Chromosomes Cancer*. 2003; 38(3): 274–80. DOI: 10.1002/gcc.10284.
 13. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H.J., et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — A Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2318–57. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135.
 14. Diagnostic algorithms and protocols for the treatment of diseases of the blood system. Ed. V.G. Savchenko. Vol. 1. Moscow: Praktika; 2018. (In Russian).
 15. Döhner H., Estey E., Grimwade D., et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129(4): 424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
 16. Chen Z., Tong Y., Li Y., et al. Development and validation of a 3-Plex RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantitation of the three PML-RARa fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0122530. DOI: 10.1371/journal.pone.0122530.
 17. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V., et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116(3): 354–65. DOI: 10.1182/blood-2009-11-254441.
 18. 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.
 19. Gilliland D.G., Griffin J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100(5): 1532–42. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0492.
 20. 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.
 21. 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.

22. Lindström M.S. NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem Res Int.* 2011; 2011: 195209. DOI: 10.1155/2011/195209.
23. 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. *Blood.* 2009; 114(11): 2220–31. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213389.
24. Hirsch P., Tang R., Marzac C., et al. Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. *Haematologica.* 2012; 97(2): 241–5. DOI: 10.3324/haematol.2010.034447.
25. 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.
26. 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.
27. Мамаев Н.Н., Горбунов А.В., Бархатов И.М. и др. Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена *WT1* после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая онкогематология.* 2015; 8(3): 309–20.
28. 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): 1275–91. DOI: 10.1182/blood-2017-09-801498.
29. Nunes V., Cazzaniga G., Biondi A. An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17(11): 953–63. DOI: 10.1080/14737159.2017.1377073.
30. Попов А.М., Вержицкая 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): 302–13.
31. 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.
32. Wood B.L. Multicolor immunophenotyping: Human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* 2004; 75: 559–76. DOI: 10.1016/s0091-679x(04)75023-2.
33. Wood B.L. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia. *Methods Mol Biol.* 2013; 999: 123–36. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_8.
34. Rimsza L.M., Larson R.S., Winter S.S., et al. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. *Am J Clin Pathol.* 2000; 114(1): 66–75. DOI: 10.1309/LXU4-Q7Q9-3YAB-4QE0.
35. Wohlfahrt A.B., Hannel L., Oliveira L.Z., et al. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *J Bras Patol e Med Lab.* 2015; 51(1): 7–12. DOI: 10.5935/1676-2444.20150002.
36. Ciudad J., Orfao A., Vidriales B., et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: Implications for minimal residual disease detection. *Haematologica.* 1998; 83(12): 1069–75.
37. Borowitz M.J., Pullen D.J., Shuster J.J., et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation
22. Lindström M.S. NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem Res Int.* 2011; 2011: 195209. DOI: 10.1155/2011/195209.
23. 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. *Blood.* 2009; 114(11): 2220–31. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213389.
24. Hirsch P., Tang R., Marzac C., et al. Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. *Haematologica.* 2012; 97(2): 241–5. DOI: 10.3324/haematol.2010.034447.
25. 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.
26. 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.
27. Mamaev N.N., Gorbunov A.V., Barkhatov I.M., et al. Molecular monitoring of *WT1* gene expression in acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical oncohematology.* 2015; 8(3): 309–20. (In Russian).
28. 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): 1275–91. DOI: 10.1182/blood-2017-09-801498.
29. Nunes V., Cazzaniga G., Biondi A. An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17(11): 953–63. DOI: 10.1080/14737159.2017.1377073.
30. Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Fechina L.G., et al. Acute leukemia: differences in the immunophenotype of blast cells and their non-tumor analogues in the bone marrow. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2016; 9(3): 302–13. (In Russian).
31. 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.
32. Wood B.L. Multicolor immunophenotyping: Human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* 2004; 75: 559–76. DOI: 10.1016/s0091-679x(04)75023-2.
33. Wood B.L. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia. *Methods Mol Biol.* 2013; 999: 123–36. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_8.
34. Rimsza L.M., Larson R.S., Winter S.S., et al. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. *Am J Clin Pathol.* 2000; 114(1): 66–75. DOI: 10.1309/LXU4-Q7Q9-3YAB-4QE0.
35. Wohlfahrt A.B., Hannel L., Oliveira L.Z., et al. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *J Bras Patol e Med Lab.* 2015; 51(1): 7–12. DOI: 10.5935/1676-2444.20150002.
36. Ciudad J., Orfao A., Vidriales B., et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: Implications for minimal residual disease detection. *Haematologica.* 1998; 83(12): 1069–75.
37. 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): 1566–72. DOI: 10.1038/sj.leu.2403001.
38. Muzzafar T., Medeiros L.J., Wang S.A., et al. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132(5): 692–8. DOI: 10.1309/AJCP02RPVOKTNWEC.
 39. Campana D., Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002; 15(1): 1–19. DOI: 10.1053/beha.2002.0182.
 40. Porwit-MacDonald A., Björklund E., Lucio P., et al. BIOMED-1 concerted action report: Flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia*. 2000; 14(5): 816–25. DOI: 10.1038/sj.leu.2401741.
 41. 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.
 42. Tien H.F., Wang C.H. CD7 positive hematopoietic progenitors and acute myeloid leukemia and other minimally differentiated leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31(1-2): 93–8. DOI: 10.3109/10428199809057588.
 43. Jorgensen J.L., Chen S.S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011; 11 Suppl 1: S49–53. DOI: 10.1016/j.clml.2011.03.023.
 44. Jaso J.M., Wang S.A., Jorgensen J.L., Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: Past, present and future. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49(9): 1129–38. DOI: 10.1038/bmt.2014.99.
 45. Langebrake C., Brinkmann I., Teigler-Schlegel A., et al. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005; 63(1): 1–9. DOI: 10.1002/cyto.b.20037.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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*. 2004; 62(1): 25–38. DOI: 10.1002/cyto.b.20025.
 49. Grimwade D., Freeman S.D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Which platforms are ready for “prime time”? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014; 2014(1): 222–33. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.222.
 50. Stetler-Stevenson M., Paiva B., Stoolman L., et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2016; 90(1): 26–30. DOI: 10.1002/cyto.b.21249.
 38. Muzzafar T., Medeiros L.J., Wang S.A., et al. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132(5): 692–8. DOI: 10.1309/AJCP02RPVOKTNWEC.
 39. Campana D., Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002; 15(1): 1–19. DOI: 10.1053/beha.2002.0182.
 40. Porwit-MacDonald A., Björklund E., Lucio P., et al. BIOMED-1 concerted action report: Flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia*. 2000; 14(5): 816–25. DOI: 10.1038/sj.leu.2401741.
 41. Lobanova T.I., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. Minimal residual disease assessment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry (literature review). *Onkogematologiya*. 2018; 13(1): 83–102. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-83-102. (In Russian).
 42. Tien H.F., Wang C.H. CD7 positive hematopoietic progenitors and acute myeloid leukemia and other minimally differentiated leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31(1-2): 93–8. DOI: 10.3109/10428199809057588.
 43. Jorgensen J.L., Chen S.S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011; 11 Suppl 1: S49–53. DOI: 10.1016/j.clml.2011.03.023.
 44. Jaso J.M., Wang S.A., Jorgensen J.L., Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: Past, present and future. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49(9): 1129–38. DOI: 10.1038/bmt.2014.99.
 45. Langebrake C., Brinkmann I., Teigler-Schlegel A., et al. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005; 63(1): 1–9. DOI: 10.1002/cyto.b.20037.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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*. 2004; 62(1): 25–38. DOI: 10.1002/cyto.b.20025.
 49. Grimwade D., Freeman S.D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Which platforms are ready for “prime time”? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014; 2014(1): 222–33. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.222.
 50. Stetler-Stevenson M., Paiva B., Stoolman L., et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2016; 90(1): 26–30. DOI: 10.1002/cyto.b.21249.

Информация об авторах

Гальцева Ирина Владимировна*, кандидат медицинских наук, заведующая научно-клинической 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>

Смирнова Светлана Юрьевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

e-mail: smirnova-s-ju@yandex.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6220-8868>

Паровичникова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, генеральный директор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

e-mail: parovichnikova.e@blood.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 14.10.2021

Принята в печать: 16.02.2022

Information about the authors

Irina V. Galtseva*, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory for Immunophenotyping of Blood and Bone Marrow Cells, National Research Center for Hematology,

e-mail: irinagaltseva@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

Svetlana Y. Smirnova, Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Research Center for Hematology,

e-mail: smirnova-s-ju@yandex.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6220-8868>

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), CEO of the National Research Center for Hematology,

e-mail: parovichnikova.e@blood.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

*** Corresponding author**

Received 14.10.2021

Accepted 16.02.2022