

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Гальцева Ирина Владимировна

**Стратегия мониторинга минимальной остаточной болезни
у больных острыми лейкозами
методом мультипараметрической проточной цитометрии**

3.1.28 – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
Доктор медицинских наук Паровичникова Елена Николаевна

Москва, 2022 г.

Оглавление

Оглавление	2
Глава 1. Введение	5
1.1. Актуальность темы исследования	5
1.2. Степень разработанности темы исследования	6
1.3. Цели и задачи исследования	9
1.4. Научная новизна исследования	10
1.5. Теоретическая и практическая значимости работы	10
1.6. Методология и методы исследования	11
1.7. Положения, выносимые на защиту	12
1.8. Степень достоверности и апробация результатов	12
1.9. Структура диссертации	15
Глава 2. Обзор литературы	16
2.1. Основные аспекты определения минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами	16
2.2. Принципы детекции минимальной остаточной болезни с помощью полимеразной цепной реакции	18
2.3. Принципы определения минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии	25
2.4. Сопоставление количества бластных клеток, определенных разными методами	33
2.5. Чувствительность методов определения минимальной остаточной болезни	36
2.6. Прогностическая значимость и пороговые значения минимальной остаточной болезни	39

2.7. Определение минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	45
2.8. Дефекты иммунной реконституции после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и их взаимосвязь с пострасплантационными осложнениями.....	49
Глава 3. Материалы и методы.....	58
3.1. Клинико-лабораторная характеристика больных.....	58
3.2. Подготовка проб для цитометрического исследования минимальной остаточной болезни.....	70
3.3. Количественный подсчет минимальной остаточной болезни, определение чувствительности.....	73
3.4. Качественное описание иммунофенотипа клеток, формирующих остаточную опухолевую популяцию, у больных острыми лимфобластными лейкозами.....	75
3.5. Цитометрическое исследование основных субпопуляций лимфоцитов.....	79
3.6. Статистическая обработка данных.....	79
Глава 4. Результаты и их обсуждение.....	83
4.1. Анализ костного мозга здоровых доноров, разработка стратегии гейтирования для десятицветной проточной цитометрии.....	83
4.2. Анализ используемых наборов моноклональных антител.....	97
4.3. Кинетика остаточных опухолевых клеток у больных острыми лимфобластными лейкозами, включенных в протокол «ОЛЛ-2016».....	99
4.4. Мониторинг минимальной остаточной болезни для прогноза общей и безрецидивной выживаемости больных острыми лимфобластными лейкозами, включенных в протокол «ОЛЛ-2016».....	111

4.5. Характеристика иммунофенотипа клеток, формирующих остаточную опухолевую популяцию.....	128
4.6. Изменение количества зрелых В-клеток, В-клеточных предшественников и плазматических клеток у больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом, включенных в протокол «ОЛЛ-2016».....	139
4.7. Выживаемость больных острыми миелоидными лейкозами в зависимости от наличия или отсутствия минимальной остаточной болезни, оцененной на этапах индукции ремиссии	143
4.8. Минимальная остаточная болезнь и результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови у больных острыми лейкозами	155
4.9. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток	170
4.10. Субпопуляционный состав лимфоцитов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и вероятность регоспитализаций	175
Заключение	181
Выводы.....	191
Список сокращений и условных обозначений.....	193
Список литературы	198
ПРИЛОЖЕНИЕ А	231
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	236

Глава 1. Введение

1.1. Актуальность темы исследования

Острые лейкозы – химиотерапевтически излечимые заболевания, но даже при достижении полной ремиссии у 85-90% больных острыми лейкозами риск развития рецидива остается довольно высоким (30-40%) [6]. Так, безрецидивная выживаемость (БРВ) больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включенных в российские многоцентровые исследования «ОЛЛ-2009» и «ОЛЛ-2016», составила 60%. Трехлетняя БРВ больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), включенных в исследования «ОМЛ-2017» и «МОМЛ-2017», составила 67% [7]. Аналогичные результаты получены в международных исследованиях [15; 54]. Долгосрочные результаты терапии острых лейкозов определяются не только исходными молекулярно-генетическими характеристиками лейкемических клеток, но и их химиочувствительностью. Суррогатным маркером этого показателя является так называемая минимальная остаточная болезнь (МОБ).

Именно персистенция МОБ обуславливает развитие рецидивов при острых лейкозах. По современной терминологии МОБ – это минимальная измеряемая остаточная болезнь (МИОБ) [172]. МОБ – это популяция остаточных опухолевых клеток, которую можно обнаружить в период полной ремиссии высокочувствительными методами, такими как многоцветная проточная цитометрия, полимеразная цепная реакция (ПЦР) или секвенирование нового поколения. Преимуществом метода проточной цитометрии является возможность определения МОБ у 90-95% больных острыми лейкозами.

Как уже отмечалось, оценка минимальной популяции лейкемических клеток после химиотерапевтического воздействия характеризует химиочувствительность опухоли: быстрый и глубокий клиренс опухолевой массы ассоциирован с более благоприятным прогнозом заболевания. Выявление МОБ (МОБ-позитивный статус) в период полной ремиссии является независимым прогностическим фактором, который используют для окончательной стратификации больных на

группы риска и принятия решения о модификации терапии [172]. Однако данные о значении МОБ у больных, которым лечение выполняется в соответствии с российскими протоколами, отсутствуют. Остаются неизвестными конкретные сроки, когда следует выполнять исследование МОБ, с какой частотой это надо делать, и на какой результат правильнее всего ориентироваться в выборе терапевтической тактики.

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является той терапевтической стратегией, которая позволяет увеличить вероятность излечения от острого лейкоза, однако сопряжена со значительными рисками. Поэтому выделение группы больных, у которых риски рецидива перевешивают риски, связанные с алло-ТГСК, представляется важной задачей. Именно определение МОБ может позволить решить эту задачу, и прицельно выполнять алло-ТГСК больным с МОБ-позитивным статусом на определенных этапах терапии в рамках конкретных протоколов лечения острых лейкозов.

Риски, ассоциированные с алло-ТГСК, могут быть связаны с медленной или неполноценной реконституцией иммунных клеток, что увеличивает вероятность развития инфекционных осложнений, отторжения, рецидива, развитие тяжелой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Рост числа алло-ТГСК приводит к высокой нагрузке на стационар, как за счет больных, которых готовят к алло-ТГСК, так и за счет тех больных, которым алло-ТГСК уже провели. Поэтому изучение дефектов восстановления основных клеточных компонентов иммунной системы и анализ соотношений субпопуляций лимфоцитов может дать важную дополнительную клиническую информацию о прогнозе у больных после выполнения алло-ТГСК.

1.2. Степень разработанности темы исследования

Исследование МОБ интегрировано во многие зарубежные протоколы терапии острых лейкозов. Однако существуют отличия между разными протоколами в вариантах химиотерапевтического воздействия, суммарных дозах

и сроках введения цитостатических препаратов. Соответственно, для каждого протокола терапии острых лейкозов установлены клинически значимые пороговые значения МОБ в определенных контрольных точках исследования, которые могут отличаться.

Так, в педиатрическом протоколе терапии ОЛЛ AIEOP-BFM (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and Berlin-Frankfurt-Munster) используются два порога 0,1% и 10% МОБ, определяемой методом мультипараметрической проточной цитометрии (МПЦ) на 15-й день протокола, пятилетняя кумулятивная вероятность развития рецидива (ВРР) у больных с количеством МОБ < 0,1% составила 7,5%; с МОБ от 0,1% до 10% – 17,5%; и с МОБ более 10% – 47,2% [20]. В протоколе терапии ОЛЛ у взрослых французской группы исследователей GRAAL (Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia) было показано, что при обнаружении МОБ $\leq 0,01\%$ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в конце индукционного лечения вероятность развития рецидива составила 22,9%, а если МОБ была $> 0,01\%$, то вероятность развития рецидива была 60,4% [22]. В протоколе терапии взрослых больных ОМЛ EORTC/GIMEMA (European Organization for Research and Treatment of Cancer / Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto) был установлен значимый клинический порог МОБ 0,035% после курса консолидации. При обнаружении МОБ более 0,035% пятилетняя БРВ составила 16%, а при МОБ менее 0,035% БРВ была 60% ($p < 0,001$) [128]. В исследовании голландской группы значимым было наличие 0,1% МОБ, выявленной МПЦ после 2-й фазы индукции у больных ОМЛ, проходящих терапию в рамках протокола NOVON/SAKK AML (Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group/Swiss Group for Clinical Cancer Research Acute Myeloid Leukemia) [188].

Лечение больных острыми лейкозами в большинстве регионов Российской Федерации проводят в соответствии с российскими протоколами «ОЛЛ-2016», «ОМЛ-10» и «ОМЛ-17», в которых предусмотрено определение МОБ в разные контрольные точки, однако оптимальный временной период детекции остаточных опухолевых клеток и значимый порог МОБ до сих пор не были определены.

Таким образом, точное определение порогового значения МОБ в российских протоколах является актуальным и практически значимым.

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток может частично снизить отрицательное влияние МОБ-положительного статуса на БРВ, что подтверждается результатами исследований международных групп: GMALL (German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia) и GRAALL. В исследовании Н. Гокбугет и соавторов было показано, что у больных ОЛЛ с постиндукционным МОБ-положительным статусом, которым была выполнена алло-ТГСК или проводилась только химиотерапия, пятилетняя БРВ составила 50% против 16% ($p = 0,004$) [81]. Исследователи из университета Гамбурга показали, что выявление МОБ перед алло-ТГСК у больных ОМЛ ассоциировано с высокой вероятностью развития рецидива вне зависимости от процента выявленных клеток с аберрантным фенотипом [105]. С другой стороны, китайские исследователи не выявили связи между наличием МОБ перед алло-ТГСК и увеличением частоты рецидивов заболевания у больных ОМЛ и ОЛЛ, а МОБ-положительный статус коррелировал с увеличением вероятности развития хронической реакции «трансплантат-против-хозяина» (РТПХ) и летальности, не связанной с рецидивом заболевания [176]. Таким образом, прояснение значимости и влияния на прогноз после алло-ТГСК предтрансплантационного МОБ-статуса также представляется актуальной задачей.

После алло-ТГСК происходит сильное угнетение иммунной системы вследствие проведения высокодозной химиотерапии в качестве режима кондиционирования. Полноценное восстановление функции донорской иммунной системы имеет первостепенное значение для долгосрочной выживаемости после алло-ТГСК. Поэтому исследование реконституции основных субпопуляций лимфоцитов и изучение ее взаимосвязи с частотой повторных госпитализаций, также представляет как научный, так и практический интерес.

1.3. Цели и задачи исследования

Цель работы – создание стратегии детекции и мониторинга минимальной остаточной болезни на основе разработки лабораторной платформы для оценки кинетики лейкомиического клона методом проточной многоцветной цитометрии и ее имплементация в программную терапию острых лейкозов.

Задачи:

1. Разработка стратегии для определения минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии у больных острыми лейкозами – подбор оптимального сочетания моноклональных антител, алгоритм гейтирования и изучение закономерностей в изменении экспрессии антигенов, происходящем при нормальном кроветворении;
2. Определение порогового значения МОБ и включение его в алгоритм принятия решения о МОБ-статусе в ключевых точках протокола «ОЛЛ-2016» у больных ОЛЛ и протокола «ОМЛ-17/mOMЛ17» у больных ОМЛ;
3. Оценка общей выживаемости, безрецидивной выживаемости и вероятности развития рецидива в зависимости от МОБ-статуса у больных ОЛЛ и ОМЛ в ключевых точках протоколов «ОЛЛ-2016» и «ОМЛ-17/mOMЛ17» соответственно;
4. Определение МОБ-статуса у больных острыми лейкозами перед и после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток в определенные временные контрольные точки и оценка долгосрочных результатов в зависимости от значений МОБ;
5. Изучение динамики реконституции лимфоцитарного звена иммунной системы и взаимосвязи с МОБ-статусом и регоспитализацией на поздних сроках после алло-ТГСК;
6. Апробация и внедрение полученных алгоритмов решения о наличии МОБ и временных регламентов (ключевых точек) мониторинга МОБ в протоколы лечения больных острыми лейкозами.

1.4. Научная новизна исследования

1) Впервые установлено, что у больных ОМЛ для наиболее точного определения группы риска необходима оценка МОБ в двух точках – после первого и второго курсов индукции.

2) Впервые изучена ассоциация иммунофенотипа клеток, формирующих остаточную опухолевую популяцию, с безрецидивной выживаемостью и кинетика зрелых В-клеток, В-клеточных предшественников и плазматических клеток у больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом, включенных в протокол «ОЛЛ-2016».

3) Впервые показано, что МОБ-позитивный статус, определяемый методом многоцветной проточной цитометрии перед алло-ТГСК, имеет прогностическое значение для больных острыми лейкозами только в первой ремиссии заболевания.

1.5. Теоретическая и практическая значимости работы

Создана лабораторная база и методика определения МОБ методом многоцветной проточной цитометрии. Ключевые точки мониторинга МОБ интегрированы в российские протоколы терапии острых лейкозов. У больных ОМЛ, проходящих терапию в рамках российских протоколов, минимальная остаточная болезнь методом многоцветной проточной цитометрии должна быть определена после 1-го и 2-го курсов индукции, у больных ОЛЛ – после 2-й фазы индукции.

В случае выявления минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии на +70-й день протокола ОЛЛ-2016 у больных В- и Т-линейным ОЛЛ, достигших ПР заболевания, рекомендовано рассмотреть вопрос о смене терапевтического воздействия и назначения таргетной терапии.

У больных ОМЛ, у которых получена МОБ-негативная ПР после первого курса индукции и МОБ не выявляется после второго курса, можно воздержаться от алло-ТГСК.

1.6. Методология и методы исследования

Определение МОБ у больных острыми лейкозами выполняли методом многоцветной проточной цитометрии с использованием стандартизованных панелей моноклональных антител, подобранных с учетом рекомендаций международных и европейской групп исследователей [27; 172; 207]. Материалом для исследования служил аспират костного мозга. Работу проводили на проточных цитометрах BD FACSCanto II (BD Biosciences) или CytoFLEX (Beckman Coulter).

В работу включено 194 больных ОЛЛ, которым выполняли терапию в рамках проспективного многоцентрового исследования «ОЛЛ-2016» с 2016 по март 2022 года. МОБ определяли в контрольные точки: +70-й, +133-й и +190-й дни протокола.

Также в исследование включено 73 больных ОМЛ, которым проводили терапию по протоколу «ОМЛ-17» с 2017 по 2021 год в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. МОБ у этих больных была определена после 1-го и 2-го курса индукции.

Для оценки предтрансплантационного значения МОБ в исследование включен 241 больной острыми лейкозами: 143 больных ОМЛ и 98 больных ОЛЛ, которым была выполнена алло-ТГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в 2015 по 2021 год.

В исследование реконституции клеточного звена иммунитета после алло-ТГСК было включено 105 больных с гемобластозами, которым выполнили алло-ТГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с 2017 по 2019 год. Анализ субпопуляций лимфоцитов у этих больных осуществляли в периферической крови на +3, +6, +9 и +12 мес. после алло-ТГСК.

Все исследования носили запланированный проспективный характер.

1.7. Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся следующие основные положения:

Выявление минимальной остаточной болезни в ключевых точках с учетом установленного порога после индукционного этапа терапии является крайне неблагоприятным прогностическим признаком у больных острым лимфобластным и острым миелоидным лейкозами. Ошибки ложноположительной и ложноотрицательной оценки МОБ имеют разную ценность на разных этапах мониторинга: на раннем этапе оценки химиочувствительности предпочтительнее ложноотрицательное заключение о наличии МОБ, на этапе контроля ремиссии – предпочтительнее ложноположительное заключение о наличии МОБ и повторение исследования.

У больных ОМЛ для наиболее точного определения группы риска необходима оценка МОБ в двух точках – после первого и второго курсов индукции.

МОБ-позитивный статус у больных острыми лейкозами непосредственно перед трансплантацией аллогенных стволовых клеток крови ассоциирован с крайне высоким риском развития рецидива после алло-ТГСК только в первой ПР;

1.8. Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена тщательным изучением литературных данных по теме диссертации, отработкой лабораторных исследований в соответствии с современными международными рекомендациями, достаточного количества больных для корректного статистического анализа. В работе подробно освещены все этапы исследования. Подробно описаны применяемые методики, сопровождаемые большим количеством иллюстративного материала, что делает работу воспроизводимой и проверяемой.

Результаты проведенной работы были представлены в виде докладов и тезисов на конгрессах, съездах и конференциях:

- 1) Международный симпозиум «Acute Leukemias XVI» (Германия, 2017);
- 2) Международный конгресс европейской гематологической ассоциации «The 22nd European Hematology Association Congress» (Испания, 2017);
- 3) Конференция американского сообщества гематологии 59th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (США, 2017);
- 4) Научно-практическая конференция «Лейкозы и лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (г. Нижний Новгород, 2017);
- 5) Рабочее собрание «Проточная цитометрия в онкогематологии и клеточной терапии» (г. Санкт-Петербург, 2017);
- 6) XXI Российский онкологический конгресс (Москва, 2017);
- 7) IV Конгресс гематологов России (Москва, 2018);
- 8) Международный конгресс европейской гематологической ассоциации «The 23rd European Hematology Association Congress» (Швеция, 2018);
- 9) Конференция американского сообщества гематологии 60th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (США, 2018);
- 10) V всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-петербург, 2019);
- 11) I Конгресс «Настоящее и перспективы российской онкогематологии» в рамках проведения II Международного форума онкологов и радиологов (Москва, 2019);
- 12) Международный симпозиум «Acute Leukemias XVII» (Германия, 2019);
- 13) Международный конгресс европейской гематологической ассоциации «The 24th European Hematology Association Congress» (Нидерланды, 2019);
- 14) Конференция американского сообщества гематологии 61st American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (США, 2019);

- 15) XIII Международный симпозиум памяти Р.М. Горбачевой "Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия" (Санкт-петербург, 2019);
- 16) Международный конгресс европейской гематологической ассоциации «The 25th European Hematology Association Congress» (виртуальная платформа, 2020);
- 17) XIV Международный симпозиум памяти Р.М. Горбачевой "Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия" (Санкт-петербург, 2020);
- 18) Конференция американского сообщества гематологии 62nd American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (виртуальная платформа, 2020);
- 19) Международный конгресс европейской гематологической ассоциации «The 26th European Hematology Association Congress» (виртуальная платформа, 2021);
- 20) Мультицентровая всероссийская встреча «Российской группы ВФМ» Гальцева И.В. «Минимальная остаточная болезнь: опыт НМИЦ гематологии (Москва, 2021);
- 21) Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (Киров, 2021);
- 22) II научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2021);
- 23) I Российский научно-практический форум «Лабораторная диагностика гематологических заболеваний» (Москва, 2022);
- 24) Научно-практическая конференция «Клиническая онкология. Смена эпох» (Москва, 2022);
- 25) Научно-практическая конференция «Лейкозы и лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования. Актуальные вопросы лимфопролиферативных заболеваний» (Москва, 2022);

- 26) Научно-практическая конференция «Молекулярно-генетическая диагностика и мониторинг гематологических заболеваний» (Самара, 2022).
- 27) XXX Конференция «Лейкозы и Лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (Москва, 2022);
- 28) Конференция «Современные лекарственные препараты в лечении онкогематологических заболеваний» (Москва, 2022);
- 29) Объединенный VI Конгресс гематологов России и III Конгресс трансфузиологов России (Москва, 2022).

Всего по теме диссертации опубликованы 21 работа, из них - научные статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации диссертационных работ – 17, в зарубежных журналах – 1; глава в монографии – 1 и 36 тезисов в сборниках материалов научных конференций.

1.9. Структура диссертации

Диссертация изложена на 245 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений А и Б. Диссертационная работа проиллюстрирована 51 рисунком и 24 таблицами. Список литературы содержит 211 литературных источников: 12 отечественных и 199 зарубежных.

Глава 2. Обзор литературы

2.1. Основные аспекты определения минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами

Острые лейкозы – это опухолевые заболевания кроветворной ткани, связанные с клональной пролиферацией клеток-предшественниц в костном мозге. В зависимости от того, в какой клетке произошли генетические нарушения, приводящие к неконтролируемой пролиферации опухолевого клона, острые лейкозы разделяют на лимфобластные, то есть представленные клетками предшественницами лимфоцитов, и миелоидными, при которых опухолевая масса представлена клетками миелоидного ряда. По разным данным заболеваемость острыми лейкозами составляет 4-8 человек на 100 тысяч населения для острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) и 1-2 на 100 тысяч населения для острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) [125]. С появлением новых протоколов терапии, таргетных и клеточных препаратов удалось значительно увеличить продолжительность жизни больных ОЛЛ и ОМЛ. Внедрение в практику новых подходов к терапии острых лейкозов привело к тому, что ПР на ранних этапах лечения могут достичь большинство больных. ПР характеризуется количеством бластных клеток менее 5% при морфологическом исследовании пунктата костного мозга (КМ) при условии нормального эритро-, гранулоцито- и мегакариоцитопоза, при количестве нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови $1,0 \times 10^9/\text{л}$ и $100,0 \times 10^9/\text{л}$, соответственно, и отсутствии экстрamedуллярных очагов лейкемического поражения [49; 154]. Но несмотря на достижение ПР, на разных сроках после окончания лечения, у 30-40% больных развивается рецидив, который может быть связан с персистенцией МОБ [7].

МОБ называют популяцию опухолевых клеток, не выявляемую цитологическим методом, но которая может быть обнаружена чувствительными методами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия (МПЦ) у пациентов в состоянии ПР. Термин

«минимальная остаточная болезнь» (МОБ) в настоящее время заменяется термином «минимальная измеряемая остаточная болезнь» (МИБ) [172]. Величина МОБ может быть дана в относительном выражении или процентном. Например, МОБ равная 10^{-3} (или 0,1%) означает, что на тысячу нормальных клеток приходится одна опухолевая.

В целом, существует два этапа исследования МОБ: 1) оценка ответа на начальном этапе терапии для определения химиочувствительности и, следовательно, групп риска и 2) последующий мониторинг МОБ у пациентов в ПР для обнаружения МОБ-рецидива и предсказания развития гематологического рецидива. Показано, что начальная кинетика редукции опухолевой массы имеет большую прогностическую значимость [32]. При этом величину остаточного опухолевого клона измеряют на ранних этапах терапии (например, 15-й день), порой и до подтверждения ПР. Быстрый клиренс опухолевой массы и достижение МОБ-негативного статуса на ранних этапах лечения ассоциируются с благоприятным прогнозом, тогда как персистенция МОБ в ходе терапии является неблагоприятным признаком. Длительный мониторинг МОБ на более отдаленных этапах терапии проводится у пациентов в ПР и достигших МОБ-негативного статуса (Рисунок 1). МОБ-мониторинг сопряжен с определенными трудностями - технологии поиска МОБ являются трудоемкими и дорогостоящими. Кроме того, показано, что отсутствие МОБ на отдаленных этапах терапии не является гарантией того, что рецидив в дальнейшем не разовьется [153].

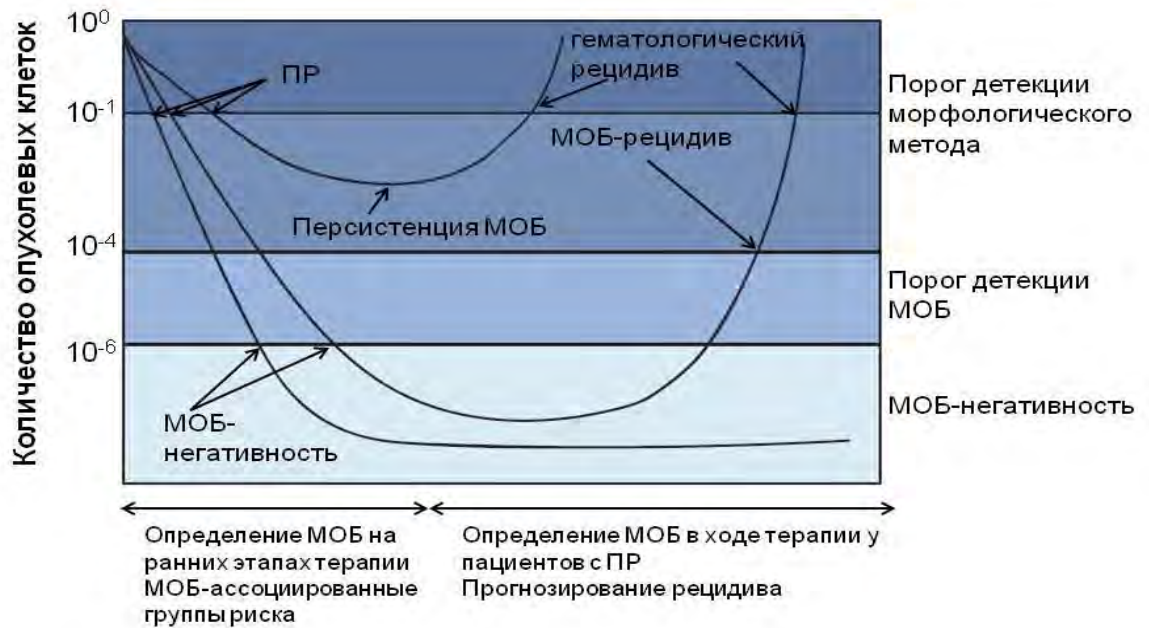


Рисунок 1 – Динамика редукции опухолевого клона и мониторинг МОБ

Методы исследования МОБ должны быть чувствительными, точными, надежными, быстрыми и доступными. Остановимся подробнее на способах детекции МОБ при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) и остром миелоидном лейкозе (ОМЛ).

2.2. Принципы детекции минимальной остаточной болезни с помощью полимеразной цепной реакции

Количественная ПЦР в реальном времени с подбором клоно-специфичных (пациент-специфичных) праймеров к реаранжировкам генов иммуноглобулина и/или Т-клеточного рецептора

В течение дифференцировки 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 преобладают лимфоциты с одинаково перестроенными генами

ИГ и ТКР. Т-и В- клеточную клональность исследуют с помощью ПЦР и последующим выполнением фрагментарного анализа ПЦР-продуктов. В норме (если клетки поликлональны 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.

В настоящее время показано, что более 90% В-линейных ОЛЛ (В-ОЛЛ) имеют клональные реаранжировки генов ТКР и около 30% Т-линейных ОЛЛ (Т-ОЛЛ) имеют клональные реаранжировки генов ИГ [184]. Клональные реаранжировки генов ИГ либо ТКР выявляются суммарно у 98% больных В-ОЛЛ, у 95% больных Т-ОЛЛ [63]. Это объясняется повышенной и сохраняющейся активностью рекомбиназного комплекса в клетках-предшественницах [64].

Следует иметь в виду, что у больных ОЛЛ, само по себе выявление Т- или В-клеточной клональности по реаранжировкам генов ТКР и ИГ не является критерием для установления диагноза или определения прогноза заболевания, и не позволяет судить о линейной принадлежности опухоли, а также и не является способом определения МОБ, так как чувствительность этого метода близка в чувствительности морфологического метода. Установление Т- и В- клеточной клональности позволяет в дальнейшем определить уникальную нуклеотидную последовательность генов ТКР или ИГ опухолевого клона. Подбор пациент-специфичных праймеров к уникальным перестройкам генов до начала лечения ОЛЛ позволит повысить чувствительность до 10^{-5} и оценить МОБ в течение терапии [194].

Оценка МОБ у больных ОЛЛ при помощи подбора пациент-специфичных праймеров состоит из следующих этапов:

- 1) Определение Т- и В-клеточной клональности по генам δ -, γ -, β - цепей ТКР, перестроек тяжелой и легкой цепи ИГ в дебюте заболевания. Определение нуклеотидной последовательности клональных продуктов. Подбор и тестирование пациент-специфичных праймеров.

2) Исследование костного мозга в контрольных точках в зависимости от протокола лечения с подобранными пациент-специфичными праймерами [11; 194].

Таким образом, без исследования костного мозга (КМ) в дебюте ОЛЛ оценка МОБ при помощи ПЦР в реальном времени с пациент-специфическими праймерами невозможна.

Поскольку для каждого больного и для каждой клональной реаранжировки подбирается индивидуальный праймер, то и условия ПЦР реакции и чувствительность метода будут различными [10; 191].

Для оценки МОБ и определения чувствительности метода проводят построение стандартной (калибровочной) кривой с известным количеством опухолевой дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Для этого моноклональную опухолевую ДНК больного, полученную в дебюте заболевания, разводят в поликлональной смеси ДНК, полученной из мононуклеарных клеток периферической крови как минимум 6 здоровых доноров [10; 191].

Недавними исследованиями показано, что клональный состав опухолевой популяции нестабилен и клональные реаранжировки могут меняться с течением заболевания, что усложняет процесс контроля МОБ по установленным в дебюте заболевания мишеням. Также у части больных это может приводить к ложно-негативным результатам [9; 181]. Однако, необходимо отметить, что 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 рибонуклеиновой кислоты (мРНК), с которой транслируется

аномальный белок. Некоторые хромосомные транслокации специфичны для лейкозов определённого 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 с высокой чувствительностью, однако метод имеет существенное ограничение в виду того, что слитные гены у больных ОЛЛ встречаются лишь в половине случаев [36; 59]. Суммарная частота $t(9;22)/BCR::ABL$, $t(1;19)/E2A::PBX1$, $t(4;11)/KMT2A::AFF1$, $t(12;21)/ETV6::RUNX1$ при В-ОЛЛ составляет 40-45%. Химерные транскрипты с участием гена *KMT2A* 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* могут возникать вследствие 50 различных транслокаций [171].

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) [72]. В случае ОТ-ПЦР химерных транскриптов для получения количественного значения МОБ в контрольных точках используют стандарты или калибраторы с известным числом молекул [62]. Возможно также использование подхода, в котором количественную оценку транскрипта определяют по отношению к экспрессии гена «домашнего хозяйства» [72]. Гены «домашнего хозяйства» - гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне.

Наиболее широко на практике проводится мониторинг МОБ по анализу транскрипта химерного гена *BCR::ABL*. При Ph-позитивном ОЛЛ может выявляться вариант p210 или встречаться одновременно и p190, и p210. Поэтому в дебюте заболевания необходимо установить тип транскрипта, а затем отслеживать его количество методом ОТ-ПЦР в контрольные точки. В частности,

такой способ мониторинга МОБ предусмотрен в протоколе лечения Ph-позитивных ОЛЛ взрослых «Ph+ ALL-2012m» [9].

У больных ОМЛ контроль МОБ молекулярно-генетическим методом представляется другой задачей, так как число маркеров невелико и не при всех ОМЛ обнаруживается. Некоторые генетические мутации и транскрипты слитных генов могут быть использованы для определения прогноза заболевания и мониторинга МОБ [61].

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 α* [47]. В российском протоколе терапии ОПЛ по модифицированной программе «AIDA» («mAIDA») предусмотрен постоянный мониторинг МОБ по оценке экспрессии *PML::RAR α* для своевременного изменения терапевтического воздействия в случае развития молекулярного рецидива. Определение МОБ у больных ОПЛ другими методами не проводят [9].

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* и *CBF β ::MYH11* соответственно. Частота их обнаружения составляет 15–45%, и все они ассоциированы с благоприятным прогнозом [85]. Молекулярные исследования по мониторингу МОБ с использованием в качестве мишеней *RUNX1::RUNX1T1* и *CBF β ::MYH11* немногочисленны и включают относительно мало больных. Эти исследования показали, что более высокие значения химерных транскриптов ассоциированы с более низкой безрецидивной выживаемостью [139]. Например, в работе Йуан Оуянг с соавторами [139] было показано, что у больных ОМЛ с количеством химерных транскриптов *RUNX1::RUNX1T1* или *CBF β ::MYH11* $\leq 0,1\%$ рецидивов не было, с количеством 0,1–10% рецидив развился у 30% больных, с количеством $\geq 10\%$ рецидив развился у 50% больных.

Наиболее известным и изученным белком с мутациями в его гене, который ассоциирован с ОМЛ, является рецепторная тирозинкиназа 3 (FLT3). Этот белок имеет функцию внутриклеточной тирозинкиназы и участвует в росте и дифференцировке стволовых клеток [78]. В 30% случаев ОМЛ обнаруживают мутации гена *FLT3*. Существует несколько мутаций этого гена, наиболее часто обнаруживаются внутренние tandemные дупликации (FLT3-ITD - internal tandem duplication), которые ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. В 30% случаев у больных с нормальным кариотипом определяется *FLT3* мутация, в 60% в сочетании с t(6;9)(p23;q34), а также в 50% случаев в сочетании с t(15,17)(q22;q12). Мутации в киназном домене *FLT3* (FLT3-TKD) встречаются у больных с нормальным кариотипом в 6-7% случаев, однако значение этих мутаций для прогнозирования долгосрочных результатов терапии не доказано [141]. Ограничением применения мутации гена *FLT3* в качестве мишени для мониторинга МОБ является ее нестабильность в ходе терапии: мутации могут меняться или исчезать [107].

В сравнении с мутациями гена *FLT3*, мутации гена нуклеофосмина 1 (*NPM1*) более стабильны. Встречаются примерно в 30% ОМЛ, и в 50% 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 [114].

Исследования, использующие в качестве мишени мутации гена *NPM1* для мониторинга МОБ, показали прогностическую значимость этого маркера [170].

Альтернативной мишенью для молекулярного мониторинга МОБ при ОМЛ является исследование гиперэкспрессирующихся генов, таких как *WT1* (Wilms' tumor protein), *EVII* (Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog) и *PRAME* (PReferentially expressed Antigen in MElanoma). Эти гены экспрессируются в низких количествах в нормальных гемопоэтических клетках [119]. Ограничением исследования генов *WT1* и *PRAME* является то, что в нормальных регенерирующих клетках КМ они также могут быть гиперэкспрессированы, что приводит к ложно-положительным результатам. Однако в случаях, когда на фоне

постоянной экспрессии *WT1* в периоде ремиссии, его экспрессия повышается, можно заподозрить надвигающееся развитие рецидива [5; 87].

Согласно рекомендациям 2018 года европейской рабочей группы по острым лейкозам определение минимальной остаточной болезни с помощью ПЦР следует проводить, если присутствуют мутации *NPM1*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH1* [172]. Мутации *FLT3* и экспрессия *EVII* не должны использоваться в качестве одиночных маркеров МОБ. Однако могут быть полезны 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 рекомендуется по крайней мере перед лечением, после 2 циклов индукции/консолидации и в конце терапии в периферической крови и костном мозге, а также каждые 3 месяца в течение 2 лет после окончания терапии в костном мозге или крови (или каждые 4-6 недель в периферической крови) [172].

В этих рекомендациях также определяются условия молекулярной прогрессии и молекулярного рецидива. Молекулярная прогрессия – это увеличение числа 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 в повторном исследовании через 4 недели после первого положительного результата анализа. Если МОБ увеличивается в последующих точках исследования ≥ 1 lg, диагностируется молекулярный рецидив [172].

Исследование химерных транскриптов (мРНК) методом ОТ-ПЦР позволяет достичь чувствительность, превосходящую метод МПЦ, но имеет несколько недостатков. мРНК склонна к деградации, а ее эффективность конверсии в комплементарную ДНК варьирует. Кроме того, количество мРНК в лейкоэмических клетках также различно и нестабильно в ходе терапии. Все это

ведет к тому, что МОБ, оцененная на основе мРНК, лишь в ограниченной степени сопоставима между разными больными [137].

2.3. Принципы определения минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии

В ходе исследования клетки КМ инкубируют с моноклональными антителами, мечеными различными флуорохромными красителями. Моноклональные антитела специфичны к так называемым кластерам дифференцировки CD (CD – сокращение от «clusters of differentiation») – поверхностным или внутриклеточным молекулам – антигенам (рецепторам или лигандам), которые можно использовать для иммунофенотипирования клеток [69].

Поиск МОБ методом МПЦ основан на знании того, какие CD обнаруживаются на клетках КМ разной линейности (лимфоидной и миелоидной) и на разных стадиях созревания. Поиск МОБ методом МПЦ заключается в поиске популяции(й) клеток, имеющих такое сочетание антигенов дифференцировки, которое не встречается на нормальных клетках КМ. Такое сочетание называют лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ). Проявлениями ЛАИФ могут 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); эктопическая экспрессия антигенов - появление в КМ клеток с фенотипом, встречающимся в норме только в других органах и тканях, например, наличие в КМ клеток с фенотипом Т-линейных предшественников [8]. Повышение или снижение экспрессии антигенов на опухолевых клетках оценивается по сравнению со здоровыми аналогами.

Существует два подхода к поиску МОБ методом МПЦ: поиск клеток с ЛАИФ, аналогичным обнаруженному в дебюте заболевания, и поиск клеток, с

иммунофенотипом не встречающимся при нормальном созревании лейкоцитов [208]. Первый подход подразумевает составление набора моноклональных антител на основании данных, полученных в результате поиска ЛАИФ на лейкоэмических клетках в дебюте заболевания. Такой набор затем используется для мониторинга МОБ в течение терапии. У каждого больного сочетание используемых моноклональных антител может быть разным. Очевидным недостатком этого метода является то, что при смене иммунофенотипа бластных клеток, выявленного в дебюте заболевания, результат исследования может быть ложно-отрицательным [203; 204]. Кроме того, использования индивидуальных панелей для каждого пациента не всегда удобно в рутинной практике.

Второй подход поиска МОБ требует тщательного изучения нормального иммунофенотипа зрелых клеток и их предшественников, и может осуществляться без знания иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания. Во все контрольные точки применяется одна универсальная и широкая 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 ходе анализа используются двумерные графики – диаграммы – которые позволяют визуально оценить экспрессию двух антигенов одновременно, а с помощью гейтирования (выделения клеток с интересующими характеристиками) можно изучить экспрессию всех антигенов на клетках, выделенных на диаграмме. Если выделенная популяция клеток находится в тех областях диаграмм, в которых нормальные клетки отсутствуют, то дается заключение о наличии МОБ – клеток с иммунофенотипом отличным от нормального. Такой подход называют «метод пустых мест», или метод «отличия от нормального» [203; 204].

Рекомендуется комбинировать оба методических подхода: в дебюте заболевания производить поиск ЛАИФ с помощью той же панели антител, по которой в дальнейшем будет производиться детекция МОБ. Знание иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания помогает в определении

остаточных опухолевых клеток в период ремиссии, однако следует помнить о возможной смене иммунофенотипа в течение терапии [203; 204].

Общие представления о детекции минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии у больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом

Созревание В-клеток происходит в костном мозге и включает несколько этапов. Условно можно выделить три стадии созревания В-клеточных предшественников, так называемых гематогаонов. Все эти стадии В-клеточных предшественников, а также зрелые В-клетки и большая часть плазматических клеток имеют на своей поверхности CD19 [7; 160; 202].

Зная типичное изображение расположения на диаграммах В-клеток различных стадий созревания, можно дифференцировать их с опухолевыми клетками при В-ОЛЛ. Исследование коэкспрессии многих маркеров помогает более точно разделять популяции и необходимо для случаев, когда популяция опухолевых клеток может пересекаться с популяцией нормальных гематогаонов. Ранние исследования, посвященные анализу МОБ у больных В-ОЛЛ, проводились с использованием двух-, трехцветных (позволяющих детектировать сигналы от двух-трех разных флуорохромов) проточных цитометров. Для исследований подбирались пациент-специфичные панели, а проведение иммунофенотипирования бластных клеток в дебюте заболевания в той же лаборатории было обязательным. Введение в рутинную практику четырех-, шестицветных проточных цитометров позволило точнее дифференцировать стадии созревания В-клеток и отличать их от бластов. Тем самым увеличилась специфичность исследования, и стало возможным достичь чувствительности 10^{-4} (или 0,01%) [57].

В настоящее время разрабатывается стандартизация анализа МОБ у больных В-ОЛЛ методом МПЦ. Стандартизация стала возможной благодаря международным исследованиям в этой области. Например, в одной из работ

зарубежных коллег показано, что результаты, полученные в разных лабораториях были одинаковы, несмотря на различия в используемых оборудовании и реактивах [65].

В литературе можно встретить несколько вариантов панелей моноклональных антител для диагностики МОБ при В-ОЛЛ. Обязательным является анализ семи антигенов: CD19, CD10, CD34, CD38, CD20, CD45, CD58. Некоторые авторы дополнительно анализируют другие маркеры, например CD11a, CD13, CD33, CD9, CD22, CD81 [7; 26; 49; 130].

Мониторинг МОБ в протоколе ALL-REZ BFM 2002 (NCT00114348) проводили с помощью панели, включающей восемь моноклональных антител меченых различными флуорохромными красителями. Результаты определения МОБ с помощью этой панели имели высокую конкордантность с ПЦР – 86,5% [101]. Опубликована также шестицветная панель, состоящая из трех пробирок, которая используется лабораториями, участвующими в исследовании МОБ у детей, проходящих терапию по протоколу COG (Children's Oncology Group) [102]. Консорциумом EuroFlow (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) предложена восьмицветная панель из двух пробирок, которая может быть использована в многоцентровых исследованиях, и позволяет достичь чувствительности $\leq 10^{-5}$, что сопоставимо с чувствительностью ПЦР [189].

Процесс окрашивания и выбранные моноклональные антитела могут быть источником технических ошибок. Для решения этой задачи были созданы коммерческие наборы антител. Например, валидирован набор, представляющий собой готовую смесь семи конъюгатов антител с флуорохромными красителями в отдельных пробирках. В такие пробирки достаточно добавить исследуемую суспензию клеток [29]. Использование подобных реактивов позволяет избежать ошибок на этапе окрашивания образца антителами, что является важным шагом на пути к стандартизации МПЦ.

Особую проблему представляет собой исследование образцов КМ больных, получающих терапию таргетными препаратами против CD19 (блинатумомаб, Chimeric Antigen Receptor (CAR) Т-клеточная терапия) и CD22 (инотузумаб

озогамицин). Эти препараты могут приводить к опухолевой селекции – отбору клонов бластных клеток с отсутствием соответствующих антигенов или с измененными эпитопами. На начальных этапах поиска МОБ при гейтировании выделяются все CD19⁺ клетки, однако потенциальная потеря этого антигена на поверхности бластов меняет всю стандартную схему гейтирования и требует пересмотра панели антител [130]. Например, предлагается использование комбинации CD22 и CD24 для идентификации В-клеток и CD66b – для исключения миелоидных клеток. Такая комбинация позволила выделить популяцию нормальных ранних В-клеточных предшественников, которые имеют иммунофенотип, характеризующийся высокой экспрессией CD22, отсутствием CD24 и CD19, вариабельной экспрессией CD10. Подобные клетки ошибочно можно принять за опухолевые [46; 56].

Общие представления о детекции минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии у больных Т-линейным острым лимфобластным лейкозом

Т-линейный острый лимфобластный лейкоз/лимфома может возникнуть из клетки–предшественницы, которая находится как в КМ, так и в экстранодальных тканях, в частности в тимусе. Нередко опухоль поражает только средостение, а КМ остается интактным. Опухолевые клетки при этом заболевании часто обнаруживают в одинаковом количестве как в периферической крови, так и КМ, однако для мониторинга МОБ рекомендуется исследование именно аспирата КМ [59].

Созревание Т-клеток происходит в тимусе, поэтому в норме в аспирате КМ можно обнаружить только зрелые Т-клетки, и при анализе МОБ не нужно дифференцировать нормальные Т-клеточные предшественники и бластные клетки. Обнаружение популяции клеток с иммунофенотипом Т-клеточных предшественников в КМ является патологией, а сама популяция признается опухолевой. Исследование МОБ при Т-ОЛЛ менее стандартизовано, чем при В-

ОЛЛ. К общим рекомендациям можно отнести исследование CD-антигенов Т-клеток и натуральных киллеров (НК), таких как CD7, CD5, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1a, CD16/CD56 [7; 37]. Зрелые Т-клетки в костном мозге имеют иммунофенотип $CD7^+CD2^+CD3^+CD5^+$ и экспрессируют CD4 (Т-хэлперы) или CD8 (цитотоксические Т-клетки). Большинство нормальных НК имеют иммунофенотип $CD7^+CD2^+CD3^-CD5^-$. Однако популяции НК и Т-клеток очень гетерогенны, что вызывает определенные трудности в анализе [92]. Крайне полезным подходом в поиске МОБ при Т-ОЛЛ является одновременный анализ поверхностной и внутриклеточной экспрессии CD3. Дело в том, что у зрелых Т-клеток обнаруживается и поверхностная, и внутриклеточная экспрессия CD3, а Т-клеточные предшественники характеризуются экспрессией только цитоплазматического CD3. Если в КМ обнаруживается популяция клеток, которая имеет цитоплазматический CD3, но не поверхностный ($CD3^{cyt^+}CD3^-$), то среди этих клеток с высокой вероятностью могут быть обнаружены опухолевые клетки [7; 37].

Часто в панели антител для мониторинга МОБ у больных Т-ОЛЛ включают маркеры незрелых предшественников, например, CD34 или терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу, которые могут экспрессироваться на бластных клетках. Полезным является анализ антигена CD45, экспрессия которого на опухолевых клетках может быть снижена, и CD99, экспрессия которого часто повышена. Рекомендуют включать в панель антитела против CD48 – маркера, который экспрессируется на нормальных Т-клетках и НК, но отсутствует на бластах [210].

Следует иметь в виду, что при поиске МОБ могут встречаться нормальные клетки с нетипичным иммунофенотипом. При этом их количество варьирует от единичных событий до нескольких процентов. Так, при анализе $CD7^+$ клеток большинство Т-клеток имеет иммунофенотип $CD3^+CD5^+$, однако может встречаться субпопуляция $CD3^-CD5^+$, которая соответствует НК и $CD3^+CD5^-$, которые являются $\gamma\delta$ -Т-клетками, количество которых увеличивается с возрастом [37; 148].

*Общие представления о детекции минимальной остаточной болезни
методом многоцветной проточной цитометрии у больных острым миелоидным
лейкозом*

Использование МПЦ для диагностики МОБ у больных ОМЛ изучается с конца 80-х – начала 90-х гг. [38; 53]. В 1991-ом году впервые на двухцветном цитофлюориметре было показано, что обнаружение остаточных лейкоэмических клеток ассоциировано с высоким риском развития рецидива заболевания [187], а в 1993-ем году в исследовании К.Л. Ридинг и соавторов [160] на когорте 272 пациентов была показана зависимость продолжительности первой ремиссии и количественного значения МОБ ($\geq 0,15\%$ – продолжительность 15 месяцев; $< 0,15\%$ – медиана не достигнута за период наблюдения 70 месяцев), а также была описана смена иммунофенотипа в рецидиве заболевания [160]. Однако недостаточные знания по оценке отличий антигенных профилей нормальных и лейкоэмических клеток и недостаточное количество моноклональных антител затрудняли исследование МОБ.

Принцип детекции МОБ у больных 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) [4]. Следует учитывать, что на нормальных гемопоэтических клетках, особенно при регенерации клеток костного мозга, может встречаться «аномальная» экспрессия ряда антигенов. Лимфоидные антигены CD2, CD7 и CD56 присутствуют на нормальных CD34⁺ предшественниках, но таких клеток в норме немного [94; 96; 189].

Немаловажным при исследовании МОБ у больных ОМЛ 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 следует помнить, что для ОМЛ характерен «иммунофенотипический сдвиг», то есть исчезновение экспрессии антигенов, которые были в дебюте заболевания и/или появление новых антигенов на бластных клетках в течение терапии.

Некоторые исследования демонстрируют, что изменения в иммунофенотипе лейкозных клеток обнаруживают как на фоне лечения, так и в момент рецидива [50; 108]. М. Баер с соавторами [16] показали, что у 91% больных ОМЛ в рецидиве заболевания иммунофенотип бластных клеток изменяется, но это изменение не ассоциировано с прогнозом. Д. Воскова с соавторами [198] показали смену ЛАИФ, а также цитогенетических и молекулярных параметров у больных с рецидивом ОМЛ. В исследовании ОМЛ у детей было отмечено, что в рецидиве заболевания иммунофенотип лейкозных клеток становится незрелым («теряются» антигены CD14, CD11b, CD15) [111].

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 2018 года европейской рабочей группы по острым лейкозам 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 сочетание антигенов CD64, CD11b, CD14, CD4, CD34, HLA-DR, CD33, CD45, позволяющее оценить моноцитарную дифференцировку клеток [172].

Для решения проблем, связанных с малыми различиями 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 антител с разными флуорохромами приводит к тому, что ручная обработка данных становится крайне трудной, поэтому применение автоматических алгоритмов анализов является очень перспективным [84].

Таким образом, основными методами, используемыми в диагностике МОБ, являются ПЦР и МПЦ. При ОЛЛ метод МПЦ в 90-99 % случаев и ПЦР в 95-98% случаев выявляют aberrантные маркеры для мониторинга МОБ. При ОМЛ для поиска МОБ метод ПЦР обнаруживает в 30-40% случаев мишени, а исследование МОБ методом МПЦ возможно в 90-100% случаев, но сопряжено с методическими трудностями: требует высокого уровня подготовленности и профессионализма персонала, хорошего технического оснащения и широкого набора моноклональных антител, удовлетворяющего требованиям современных методических рекомендаций.

2.4. Сопоставление количества бластных клеток, определенных разными методами

МОБ – это опухолевые клетки, обнаруживаемые чувствительными методами у больных в ПР, которая устанавливается при наличии в пунктате КМ менее 5 % бластных клеток и отсутствии экстрамедуллярных очагов поражения. Тогда вызывает недоумение тот факт, что в протоколе AIEOP-BFM-ALL 2000 (NCT00613457) неблагоприятным прогностическим фактором явилась МОБ более 10 % в КМ на 15-й день, определенная методом МПЦ. В этом исследовании [20] сравнивались результаты МОБ с количеством бластных клеток, определенных морфологическим методом. Была показана хорошая корреляция данных, однако были и случаи несоответствия данных. С одной стороны, МОБ < 0,1 % была получена у 295 больных, при этом у 48 (16,3 %) из них количество бластных

клеток было $> 5 \%$, т.е. ПР фактически отсутствовала. С другой стороны, МОБ $\geq 10 \%$ определялась у 76 больных, при этом у 19 (25 %) из них бластных клеток было меньше 5% , т.е. морфологическая ремиссия была достигнута, но вероятность рецидива у них была $36,8 \%$ [20]. Такие несоответствия данных можно объяснить:

1. Разведением КМ периферической кровью. Содержание миелокариоцитов в первой порции пунктата КМ превышает клеточность второй порции в три и более раза [64]. Значительная примесь крови меняет соотношение субпопуляций клеток, и доля бластных клеток не может быть точно подсчитана. Поэтому для мониторинга МОБ рекомендуется исследование первой порции КМ объемом 0,5–1,0 мл.

2. Неудовлетворительным качеством мазков КМ, когда подсчет бластных клеток затруднен, особенно при гипоплазии КМ.

3. Интенсивным восстановлением кроветворения, при котором количество бластных клеток в пунктате КМ может быть больше 5% , а МОБ может быть очень низкой или не определяться вообще. В этом случае бластные клетки, выявленные с помощью морфологического метода, вероятнее всего являются нормальными гемопоэтическими предшественниками, а не опухолевыми клетками.

Детекция МОБ и методом ПЦР, и методом МПЦ показала большую прогностическую значимость во многих протоколах терапии острых лейкозов. Однако в рамках одного протокола обычно используют только один из этих методов. Но имеются данные, сравнивающие результаты МОБ, полученные одновременно разными методами. При сравнении оценки МОБ методом ПЦР и методом МПЦ обычно получают высокую сопоставимость данных (около 90 %). Лишь в небольшой группе больных положительный результат МОБ был получен только одним методом. Объяснения данного явления могут быть сведены к следующим причинам:

- 1) Различия в чувствительности методов. ПЦР обычно более чувствительна, чем МПЦ.

2) Некоторые опухолевые клетки проходят стадию апоптоза, при этом, так как они содержат ДНК, то результат ПЦР будет положительным, а метод МПЦ, исключая их из анализа, дает отрицательный результат;

3) Смена иммунофенотипа приводит к отрицательным результатам МПЦ при положительных данных ПЦР;

4) Подбор пациент-специфичных праймеров к минорной опухолевой субпопуляции, которая элиминируется в ходе терапии, приводят к отрицательным результатам ПЦР и положительным МПЦ [133; 188].

Несоответствия результатов можно получить и между двумя вариантами мониторинга МОБ методом ПЦР. В исследовании Л. Говорковой и соавторов [94] изучали МОБ у детей с Ph⁺ ОЛЛ тремя методами: ПЦР с пациент-специфичными праймерами к химерному гену *BCR::ABL1* (то есть мониторировали уровень ДНК, а не мРНК), к перестройкам генов иммуноглобулина/Т-клеточного рецептора (ИГ/ТКР) и к делеции гена *IKZF1* (Ikaros family zinc finger protein 1). Была отмечена хорошая корреляция между этими тремя методами у большинства больных, однако у более 20 % больных количество химерного гена *BCR::ABL1* значительно (> 1 lg) превышало количество перестроенных генов ИГ/ТКР и гена *IKZF1* с делецией. Авторами [94] была проведена сортировка клеточных субпопуляций и оценена частота выявления гена *BCR::ABL1* в них с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ*. Оказалось, что у больных с несовпадающими результатами ПЦР, *BCR::ABL1* определялся также в зрелых В- и Т-лимфоцитах и миелоидных клетках [94]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях [40; 132; 165].

В исследовании Х. Инаба и соавторов [96] в рамках протокола AML02 (NCT00136084) было получено, что практически все (308 из 311) ПЦР-негативные образцы также были МПЦ-негативны. Однако только 19 из 197 (9,6 %) ПЦР-положительных по *RUNX1::RUNX1T1* и *CBFβ::MYH11* образцов были МПЦ-положительны. В данном исследовании только данные МПЦ имели прогностическую значимость после курсов индукции 1 и 2, тогда как результаты ПЦР такого

значения не имели [96]. В работе Вендита А. и соавторов, было показано, что у больных ОМЛ с МОБ позитивным статусом, подтвержденным одновременно методом ПЦР и МПЦ, демонстрировалась худшая выживаемость по сравнению с другими тремя когортами больных (МПЦ негативных/ ПЦР негативных, МПЦ позитивных/ ПЦР негативных, МПЦ негативных/ ПЦР позитивных) [196].

2.5. Чувствительность методов определения минимальной остаточной болезни

Аналитическая чувствительность любого лабораторного метода — это наименьшее количество вещества (наименьшая концентрация), которое можно обнаружить этим методом [3]. Применительно к детекции МОБ чувствительность того или иного метода можно описать как минимальное количество опухолевых клеток, которое можно обнаруживать с его помощью. МОБ-негативность не означает, что опухолевых клеток нет вообще, и достигнуто полное отсутствие опухолевых клеток у больного. МОБ-негативность означает, что в образце не найдено опухолевых клеток при указанной чувствительности метода, и что опухолевые клетки могут персистировать, но в меньшем, чем чувствительность метода количестве. Поэтому и происходит смена понятия «минимальная остаточная болезнь» на термин «измеряемая остаточная болезнь». Чувствительность метода определения МОБ может быть подсчитана в относительном выражении или процентном. Например, чувствительность 10^{-4} (или 0,01 %) означает, что возможно определить наличие 1 опухолевой клетки среди 10 000 нормальных клеток. Именно такая чувствительность требуется для определения МОБ в большинстве протоколов терапии острых лейкозов [31].

Нарастает тенденция к внедрению в практику все более чувствительных методов, которые позволяют обнаружить меньшие количества опухолевых клеток. Например, секвенирование нового поколения (next generation sequencing – NGS) и проточная цитометрия следующего поколения (next generation flow – NGF) позволяют достичь чувствительности 10^{-7} (или 0,00001 %), т.е. найти одну

опухолевую клетку на 10 млн нормальных [156; 164; 209]. Такие методы требуют высокой клеточности анализируемого образца: если клеток в образце всего 100 тысяч, чувствительности 10^{-7} достичь невозможно. С этим связаны сложности определения МОБ на ранних этапах терапии, когда нередко у больных острыми лейкозами наблюдается аплазия кроветворной ткани вследствие цитостатического воздействия [31]. Кроме того, детекция крайне низкого количества опухолевых клеток высокочувствительным методом должна быть клинически обоснована.

Вне зависимости от варианта острого лейкоза количественное определение МОБ методом проточной цитометрии осуществляют одинаковым образом. Если опухолевая популяция клеток с аномальным иммунофенотипом обнаружена, то подсчитывают число клеток, составляющих эту популяцию. Далее определяют или число проанализированных ядродержащих клеток (используя нуклеотропные красители Syto или выделение клеток по показателям прямого и бокового светорассеяния), или число лейкоцитов (используя маркер CD45). Затем определяют долю опухолевых клеток от всех ядродержащих клеток или лейкоцитов. Ответ выдается в виде процента.

Результат исследования МОБ считается положительным, если при цитометрическом исследовании выявлена популяция лейкемических клеток, состоящая по меньшей мере из 10-50 клеток с аберрантной гомогенной экспрессией определенных антигенов. Число клеток, формирующих минимальную популяцию, в разных лабораториях может отличаться. Если среди собранных клеток не обнаружено 10-50 лейкемических клеток, то делается заключение, что МОБ не выявлена при достигнутой чувствительности анализа.

Чувствительность в МПЦ зависит от общего количества проанализированных клеток. Например, если за минимальную принимается популяция, состоящая из 20 клеток, то чувствительность определяется по формуле 1.

$$\text{чувствительность} = \frac{20}{\text{количествоядросодержащихклеток}} \times 100\%. \quad (1)$$

Необходимая чувствительность метода составляет 0,01%. Для того, чтобы достичь такой чувствительности необходимо проанализировать 200 000 клеток и более (если за минимальную 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 и повторное исследование МОБ [1].

В последнее время при мониторинге МОБ уделяют особое внимание понятиям LOD (сокр. от англ. «Limit of Detection») и LLOQ (сокр. от англ. «Lower Limit of Quantification»). LOD – это минимальный порог детекции, когда найдена популяция не менее, чем 30 клеток, что позволяет сделать заключение просто о наличии МОБ (формула 2).

$$LOD = \frac{30 \text{ аберратных клеток}}{\text{количество ядросодержащих клеток}} \times 100\%. \quad (2)$$

LLOQ – это порог точной количественной оценки, который достигается, если найдена популяция не менее чем из 50 клеток, когда возможно определить количество МОБ точно и воспроизводимо (формула 3) [180].

$$LLOQ = \frac{50 \text{ аберратных клеток}}{\text{количество ядросодержащих клеток}} \times 100\%. \quad (3)$$

LOD и LLOQ, так же как и чувствительность зависят от количества собранных клеток. Таким образом, если среди собранных событий обнаружена популяция, состоящая из 50 аберратных 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 аберратных 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 [180].

Применение LOD/LLOQ-подхода позволяет повысить специфичность исследования за счет выделения группы МОБ-позитивных пациентов с низким количеством обнаруженных опухолевых клеток (от 20 до 50) и группы «истинно

МОБ-негативных» пациентов с достигнутым высоким показателем чувствительности [140].

Существует несколько факторов, снижающих чувствительность и специфичность метода МПЦ. Во-первых, после химиотерапии развивается панцитопения, и КМ характеризуется низкой клеточностью, поэтому проанализировать достаточное количество клеток проблематично. Во-вторых, известен феномен «иммунофенотипического сдвига» – изменения фенотипа лейкоэмических клеток в течение терапии, что затрудняет их поиск и нередко приводит к ложноотрицательным результатам [39;40].

2.6. Прогностическая значимость и пороговые значения минимальной остаточной болезни

В разных протоколах приняты разные пороговые значения МОБ в зависимости от контрольной точки исследования, а также применяемого метода (МПЦ или ПЦР). Эти пороговые значения позволяют провести стратификацию больных на группы риска. Обычно определение МОБ для этого проводят на начальных этапах терапии (индукции или консолидации ремиссии), где в пределах одного протокола больные с быстрым клиренсом МОБ имеют более благоприятный прогноз, чем больные с медленным клиренсом и высокими значениями МОБ в контрольные точки.

Чтобы оценить влияние количественных показателей МОБ в конкретной точке протокола на частоту рецидивов, используют анализ выживаемости. По результатам такого анализа, рассчитывают оптимальные пороговые значения МОБ, по которым можно выделить группы пациентов с разным риском развития рецидивов. В Таблице 1 суммированы данные по пороговым значениям МОБ, полученных в разных исследованиях.

Таблица 1 – Пороговые значения минимальной остаточной болезни по данным разных исследований

Протокол, авторы	Метод	Контрольная точка	Порог	Выживаемость
Острые лимфобластные лейкозы				
AALL0232, М. Боровиц и соавторы [27]	МПЦ	Конец индукции (день 29)	0,01 % (10 ⁻⁴)	5-летняя БСВ 86±1 % vs 58±4 %, $p < 0,0001$
GMALL, Н. Гокбугет и соавторы [81]	ПЦР	День 71 Неделя 16	10 ⁻⁴	Вероятность сохранения ПР день 71: 69 ± 3 % vs 42 ± 6 %, $p < 0,0001$, Неделя 16: 74±3 % vs 35±6 % $p < 0,0001$
GRAALL, К. Белджорд и соавторы [22]	ПЦР	Конец индукции	10 ⁻⁴	ВРР 22,9 % vs 60,4 %
NILG-ALL09/00, Р. Бассан и соавторы [19]	ПЦР	Неделя 16, неделя 22	10 ⁻⁴	БРВ, медиана не достигнута vs 1,16 лет, $p = 0,001$
PETHEMA ALL-AR-03, Х. Рибера и соавторы [161]	МПЦ	Конец индукции (неделя 5-6) и конец консолидации (недели 16-18)	0,1 % 0,05 %	Нет данных
AIEOP-BFM-ALL, Г. Бассо и соавторы [20]	МПЦ	День 15	0,1 % 10 %	5-летняя ВРР <0,1 %: 7,5 %; 0,1 %-10 %: 17,5 %; ≥ 10%: 47,2 %
NORHO-92, Е. Бьёрклунд и соавторы [24]	МПЦ	Индукция	0,01 %	Нет данных
Острые миелоидные лейкозы				
Х Сан Мигель и соавторы [166]	МПЦ	Индукция	0,01 % 0,1 % 1 %	5-летняя ВРР: >1 % - 85 %, 0,1-1 % - 45 %; 0,01-0,1 % - 14 %; <0,01 % - 0 %
Л. Маурило и соавторы [128]	МПЦ	Индукция	0,035 %	5-летняя БРВ: ≤ 0,035 % - 50 %; >0,035 % - 22 %; $p = 0,009$
NOVON/SAKK AML 42A, М. Тервин и соавторы [188]	МПЦ	Индукция 2	0,1 %	4-летняя БРВ: ≤ 0,1% - 52 %; > 0,1 % - 23 %
DCOG ANLL97/MRC AML12, В. ван дер Фельден и соавторы [195]	МПЦ	Индукция	0,1 % 0,5 %	3-летняя БРВ: < 0,1 % - 85 ± 8 %; 0,1-0,5 - 64 ± 10 %; > 0,5 % - 14±10 %
С. Буонамичи и соавторы [35]	ПЦР	На протяжении всей терапии	0,12 % 0,25 %	< 0,12 % - наибольшая вероятность устойчивой ремиссии; > 0,25 % - высокая вероятность развития рецидива
Д. Чилони и соавторы [50]	ПЦР	Индукция	Редукция на 2 log	5-летняя ВРР: < 2 log - 75 %; ≥ 2 log - 40 %
Т.И. Лобанова и соавторы [116]	МПЦ	Индукция 1, 2	0,01 %	Три группы больных: достигшие < 0,01 % после индукции 1, < 0,01 % после индукции 2 и > 0,01 % после индукции 2. Двухлетняя БРВ составила 90 %, 48 % и 32 % соответственно

Примечания: ПЦР – полимеразная цепная реакция, МПЦ – многоцветная проточная цитометрия, БСВ – бессобытийная выживаемость, ПР – полная ремиссия, ВРР – вероятность развития рецидива, БРВ – безрецидивная выживаемость

ОЛЛ. Раннее определение количественных показателей МОБ и ранняя стратификация пациентов имеет свои преимущества. В протоколе терапии ОЛЛ для детей и подростков AIEOP-BFM-ALL 2000 (NCT00613457) исследование МОБ проводили на 33-й и 78-й день терапии методом ПЦР, однако экспериментально МОБ оценивали и на 15-й день методом МПЦ у 830 больных. По результатам исследования выявлено три группы больных: с количеством аберрантных клеток на 15-й день $< 0,1$ % (42 % от всей когорты больных); от 0,1 % до 10 % (47 % больных) и более 10 % (11 % больных). Пятилетняя кумулятивная вероятность рецидива у них составила 7,5 %, 17,5 % и 47,2 % соответственно [20].

Эти данные были учтены в последующем исследовании AIEOP-BFM ALL 2009 (EudraCT Number: 2007-004270-43), где проводили рандомизацию больных для изучения возможностей изменения терапии в зависимости от значения МОБ. У больных, не относящихся к группе высокого риска, с количеством опухолевых клеток в костном мозге $< 0,1$ %, определенном на 15-й день терапии методом МПЦ, проводили редукцию дозы даунорубицина на 50 %. У больных из группы высокого риска, т.е. если МОБ методом ПЦР была $> 10^{-3}$ на 33-й день и осталась позитивной на 12-ю неделю, и/или если на 15-й день МОБ методом МПЦ была более 10 %, использовали терапевтическую тактику продолжения терапии PEG-L-аспарагиназой.

Еще одним примером целесообразности раннего определения МОБ может служить исследование результатов терапии ОЛЛ у детей и подростков ALL-REZ BFM 2002 (NCT00114348). Согласно данному протоколу, больным с количеством аберрантных клеток менее 10^{-3} в конце индукции (неделя 5), проводили стандартную консолидацию и поддерживающую терапию, а трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) рекомендовали только при наличии совместимого родственного донора. Если же значение МОБ в конце индукции составляло 10^{-3} аберрантных клеток и более, то больному выполняли алло-ТГСК от родственного или неродственного совместимого

донора. Результаты лечения по этому протоколу сравнили с данными предыдущего протокола ALL-REZ BFM P95/96, в котором алло-ТГСК проводили независимо от результатов МОБ в конце индукции. В группе больных с количеством аберрантных клеток $\geq 10^{-3}$ вероятность бессобытийной выживаемости составила 64 % при лечении по протоколу ALL-REZ BFM 2002 и 18 % – по протоколу ALL-REZ BFM P95/96 ($p < 0,001$). Прицельное выполнение алло-ТГСК улучшило прогноз у больных с медленной редукцией опухоли [67].

В протоколах терапии ОЛЛ у взрослых по результатам исследования МОБ также принимаются решения об изменении терапии, но в основном в отношении проведения ТГСК, а не коррекции терапевтических доз химиопрепаратов. В испанском исследовании PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología) ALL-AR-03 trial (NCT00853008) кандидатами для алло-ТГСК являются только больные, у которых высокие показатели МОБ, а не все больные, относящиеся к группе высокого риска. В протоколе GMALL 07/2003 (NCT00198991) при персистенции МОБ $> 10^{-4}$ в конце консолидации решается вопрос об алло-ТГСК. В российском протоколе терапии Ph-негативных ОЛЛ «ALL-2016» (NCT01193933) при сочетании начального лейкоцитоза и персистенции МОБ на 190-ый день предусматривается решение вопроса о смене терапии и выполнении алло-ТГСК [9].

Мониторинг МОБ после достижения больным МОБ-негативного статуса также может быть полезен в качестве предиктивного метода обнаружения развивающегося рецидива. В исследовании Н. Пемараджу и соавторов [146] с 2003 по 2014 гг. ОЛЛ диагностировали у 647 взрослых больных, среди них МОБ-негативности, которую определяли МПЦ, достигли 536 (91%) больных. У МОБ-негативных больных был продолжен мониторинг МОБ в ПР на отдаленных этапах терапии, и у 55 из них была обнаружена МОБ, то есть выявлен МОБ-рецидив. Медиана времени до МОБ-рецидива составила 14 мес. (разброс от 3 до 58 мес). У 44 (80 %) больных в дальнейшем развился морфологический рецидив. Медиана продолжительности сохранения ПР после МОБ-рецидива составила 3 мес. (разброс: 1–33 мес.). У 49 из 55 больных с МОБ-рецидивом до развития

морфологического рецидива осуществляли терапию: у 16 больных продолжили поддерживающую терапию в соответствии с протоколом, у 15 больных провели интенсифицированную терапию, у 9 больных сменили терапию и включили неларабин, блинатумомаб или ритуксимаб, и у 9 больных выполнили алло-ТГСК. При сравнении этих терапевтических подходов, не было получено достоверных отличий по общей выживаемости, однако выборки больных были небольшими [146].

ОМЛ. Оценка МОБ при ОМЛ в постиндукционной фазе лечения в настоящее время становится новым инструментом, который можно использовать для выделения пациентов с неблагоприятным прогнозом среди больных ОМЛ из благоприятной цитогенетической и молекулярной групп риска. Таким пациентам показано выполнение алло-ТГСК в первой ПР. Группа исследователей из Национального исследовательского института рака Великобритании провела проспективную оценку прогностической ценности МОБ, определяемой методом МПЦ, после 1-го и 2-го курса индукционной химиотерапии [71]. Пациенты, которые достигли ПР после индукционной химиотерапии, были разделены на группы больных с МОБ-позитивным статусом (МОБ⁺) и МОБ-негативным статусом (МОБ⁻). МОБ⁺ статус после 2-го курса химиотерапии оказался крайне неблагоприятным прогностическим фактором, влияющим на общую выживаемость (ОВ), причем, выявление МОБ ассоциировано с более низкой ОВ у больных из благоприятной и промежуточной групп риска, по сравнению с неблагоприятной группой риска. Более того, долгосрочные результаты терапии больных с МОБ⁺ статусом были сопоставимы с результатами при резистентном течении заболевания. Поскольку число МОБ⁺ больных, которым была выполнена алло-ТГСК, было небольшим, авторы не смогли доказать необходимость выполнения алло-ТГСК для этой группы больных, с этой целью в настоящее время проводится рандомизированное исследование фазы III.

Пока принципы терапии, основанной на оценке МОБ методом МПЦ, для взрослых больных ОМЛ не разработаны (как, например, для острых лимфобластных лейкозов). Использование средних и высоких доз цитарабина у

взрослых больных ОМЛ приводит к небольшому увеличению процента ремиссий, однако не влияет на показатели долгосрочной выживаемости [36; 41; 152; 211]. В ходе исследования Л. Маурило [127] и соавторов показано, что использование высокодозной химиотерапии (ХТ) никак не влияет на скорость редукции МОБ, а также приводит к повышению ее количественных значений в сравнении с МОБ у пациентов, получавших стандартные дозы химиопрепаратов. Пятилетняя ОВ у больных с МОБ-негативным статусом, у которых использовали стандартные и высокие дозы цитарабина, составляла 60 % и 30 % соответственно ($p = 0,007$) [127]. Терапевтическая тактика интенсификации терапии в зависимости от результатов МОБ не подтверждена у взрослых больных ОМЛ, поскольку не улучшает прогноз заболевания. Кроме того, такая терапия высокотоксична и создает повышенный риск развития тяжелых грибковых осложнений [164]. В каждом конкретном случае необходимо разрабатывать индивидуальную тактику ведения больного. Например, в протоколе AML02 (NCT00136084) риск-адаптивная терапия для детей с ОМЛ заключается в раннем (на 22-й день терапии) выявлении МОБ (при $\text{МОБ} \geq 1\%$) и сопряженным с этим ранним началом следующего курса ХТ в сочетании с таргетными препаратами (гемтузумаб озогамицин), что позволяет снизить частоту развития рецидивов в этом исследовании [164].

Таким образом, раннее исследование МОБ может способствовать ранней стратификации больных на группы риска и проведению корректировки химиотерапии. С одной стороны, если у больного произошел очень быстрый клиренс опухолевой массы (и на основании величины МОБ в контрольной точке установлен благоприятный прогноз), то возможно уменьшить дозы химиотерапевтических препаратов, и тем самым снизить частоту развития неблагоприятных эффектов терапии. С другой стороны, когда скорость редукции опухолевых клеток низкая, и в контрольных точках выявляется большое количество МОБ, можно рассмотреть возможность смены препаратов или проведения алло-ТГСК.

Основываясь на представленных данных, можно полагать, что проведение оценки МОБ у взрослых больных, по крайней мере, ОЛЛ целесообразно через каждые 3 мес. до конца поддерживающей терапии [31; 143; 153].

Таким образом, обнаружение МОБ интегрировано в протоколы терапии и проводится в определенные контрольные точки выбранным методом. Нельзя пороговые значения МОБ, полученные на одном протоколе, автоматически переносить на другой, так как на разных режимах химиотерапевтического воздействия разная скорость клиренса опухолевой массы. И, следовательно, количество аберрантных клеток, принимаемых за порог, может отличаться особенно на ранних этапах терапии. При разработке нового протокола или режима химиотерапии необходимо проводить проспективные исследования и определять пороговые значения и контрольные точки, а не заимствовать их из других протоколов.

2.7. Определение минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

ОМЛ. Ряд исследований последних лет показали, что наличие МОБ перед алло-ТГСК связано с увеличением риска развития рецидива заболевания и ухудшением прогноза у больных с любым вариантом острого лейкоза. В 2017-м году был опубликован мета-анализ по оценке прогностического значения МОБ для больных ОМЛ перед и после алло-ТГСК методами ПЦР и МПЦ, который объединил результаты 19 работ в период с января 2005 по июнь 2016 гг. Было показано, что МОБ⁺ статус перед алло-ТГСК ассоциирован с худшими показателями БРВ (отношение рисков (ОР) = 2,76), ОВ (ОР = 2,36) и риском возникновения рецидива (ОР = 3,65). Также в результате исследования было отмечено, что интенсификация режима кондиционирования (применение миелоаблативного режима) не влияет на улучшение прогноза у МОБ-положительных пациентов [34].

Ф. Бучизано и его коллеги из Университета в Риме решили ответить на вопрос, может ли алло-ТГСК помочь больным ОМЛ с МОБ-позитивным предтрансплантационным статусом в достижении длительной ремиссии [33]. В исследование были включены 81 больной ОМЛ, которым была выполнена трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) или алло-ТГСК в МОБ⁺ статусе. Результаты алло-ТГСК были значительно лучше, чем результаты ауто-ТГСК, с 5-летней БРВ 60% против 19% [33]. Таким образом, алло-ТГСК, в отличие от ауто-ТГСК, может частично преодолевать негативное влияние МОБ и может вылечить значительное количество больных с МОБ-позитивным статусом после химиотерапии.

Учитывая далеко не всегда оптимистичные результаты алло-ТГСК у больных ОМЛ в МОБ⁺ статусе, возник вопрос: может ли выбор донора повлиять на клинический исход алло-ТГСК? Какой донор является оптимальным для пациентов с МОБ-позитивным предтрансплантационным статусом? В 2019-м году исследователями из США были представлены результаты ретроспективного анализа, включавшего 143 больных, которым была выполнена трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичных доноров (гапло-ТГСК) с использованием пострасплантационного циклофосфида (ПТ-ЦФ). Среди больных, которые находились в морфологической ремиссии перед трансплантацией, не было различий в БРВ между больными с МОБ⁺ статусом (n = 24) и МОБ⁻ статусом (n = 41) (ОР = 1,85; p = 0,1). В мультивариантном анализе только возраст оказывал влияние на исход, в то время как предтрансплантационный МОБ-статус не влиял на долгосрочные результаты. Авторы предполагают, что гапло-ТГСК с ПТ-ЦФ может потенциально нивелировать неблагоприятное влияние МОБ⁺ статуса для больных ОМЛ [179].

ОЛЛ. Отрицательное «влияние» МОБ-позитивного статуса на БРВ у больных ОЛЛ может быть частично преодолено с помощью алло-ТГСК, что подтверждается результатами трех крупных исследований, проведенных исследовательскими группами GMALL, PETHEMA и GRALL [58; 81; 161]. В объединенном исследовании GMALL 06/99 и 07/03, в котором был

проанализирован проспективный мониторинг МОБ с помощью ПЦР (перестройка генов ТКР / ИГ) было показано, что у больных с персистирующей МОБ $> 10^{-4}$ после индукции/консолидации и перед трансплантацией, которым была выполнена алло-ТГСК, вероятность 5-летней БРВ значимо выше, чем у тех больных, которым проводилась только химиотерапия (50% против 16%, $p = 0,004$) [81].

Хотя долгосрочные результаты больных ОЛЛ с персистирующей МОБ, которым выполняется алло-ТГСК, лучше по сравнению с теми, кому проводилась только химиотерапия, частота посттрансплантационных рецидивов значительно выше у пациентов с МОБ-положительным статусом перед алло-ТГСК по сравнению с МОБ-негативными пациентами. З. Шэн и соавт. провели метаанализ, включивший 21 исследование, посвященное влиянию МОБ непосредственно перед алло-ТГСК у больных ОЛЛ. Эти исследования были опубликованы в период 1998–2016 гг., а в качестве метода детекции МОБ применялись и МПЦ, и ПЦР. Анализ данных показал, что больные с МОБ-положительным статусом перед алло-ТГСК имели более высокий риск развития рецидива, чем больные с МОБ-негативным статусом ($OR = 3,26$; $p < 0,05$), а также меньшую продолжительность БРВ ($OR = 2,53$; $p < 0,05$) и ОВ ($OR = 1,98$; $p < 0,05$). Необходимо отметить, что МОБ-статус не влиял на летальность, не связанную с рецидивом заболевания [177].

В 2019 году было опубликовано исследование европейского общества по трансплантации клеток крови и костного мозга EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation), в которое было включено 2780 пациентов, которым была выполнена алло-ТГСК в период с 2000 до 2017 гг. Всем больным предтрансплантационное кондиционирование выполняли в миелоаблативном режиме, но у 76% предтрансплантационная подготовка включала тотальное облучение тела (TOT), остальным пациентам проводили кондиционирование высокодозной химиотерапией. Результаты исследования подтвердили негативное влияние МОБ-положительного предтрансплантационного статуса на ОВ ($OR=1,19$ [1,02-1,39]) и БРВ ($OR = 1,26$ [1,1-1,44]). Однако при разделении больных на две группы, в зависимости от варианта кондиционирования, авторы отметили, что

использование ТОТ улучшило ОВ и БРВ, как у МОБ-негативных, так и у МОБ-позитивных больных [144].

Таким образом, во многих протоколах предусмотрено проведение алло-ТГСК у больных с персистирующей МОБ на определенном этапе терапии. Однако выполнение алло-ТГСК в МОБ-позитивном статусе ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, а именно – высоким риском рецидива в посттрансплантационном периоде. Поэтому проводится разработка терапевтических подходов, позволяющих добиться МОБ-негативности с последующим проведением алло-ТГСК. Например, в исследовании ALL-REZ BFM 2002 (NCT00114348) больным ОЛЛ с МОБ $\geq 10^{-3}$ перед алло-ТГСК были проведены интервенционные блоки химиотерапии, и в 78 % случаев произошла редукции МОБ. Однако значимого уменьшения вероятности развития рецидива после алло-ТГСК не достигнуто [66]. Более перспективным представляется применение иммунотерапии. Показана эффективность применения блинатумомаба у взрослых больных В-ОЛЛ с персистирующей МОБ ($n = 113$) [80]. Элиминация остаточных опухолевых клеток после первого цикла терапии была достигнута у 88 (78 %) больных, и 55 больным была проведена алло-ТГСК. Медиана БРВ для МОБ-негативных больных составила 23,6 мес. (для МОБ-позитивных – 12,5 мес. ($p = 0,002$)). Авторы пришли к выводу, что такие результаты выгодно отличаются от ранее опубликованных данных для больных с МОБ-позитивным статусом или рефрактерными ОЛЛ [80]. Поскольку у значительного числа пациентов с полным ответом по МОБ сохранялась длительная ремиссия без выполнения трансплантации, авторы обратили внимание на то, что роль алло-ТГСК в этой клинической ситуации неоднозначна и должна быть определена в дополнительных проспективных исследованиях [80].

Мониторинг МОБ до и после алло-ТГСК имеет большое значение для назначения поддерживающей посттрансплантационной терапии. Этот подход успешно применяется для пациентов с Rh-позитивным ОЛЛ. Использование ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) в поддерживающей терапии после алло-ТГСК приводит к снижению частоты рецидивов и улучшению долгосрочных

результатов алло-ТГСК, что было продемонстрировано в нескольких проспективных и ретроспективных исследованиях [29; 43; 51; 145]. Больным Ph⁺ ОЛЛ с МОБ⁺ статусом до и/или после алло-ТГСК должна быть назначена терапия ИТК, как можно скорее, назначение ИТК больным с МОБ-негативным статусом до алло-ТГСК обсуждается отдельно, возможно проведение динамического наблюдения и добавление к терапии ИТК только при появлении МОБ в последующих тестах. Для Ph-негативных ОЛЛ на настоящий момент тактика ведения при обнаружении МОБ до и/или после алло-ТГСК не определена.

Таким образом, определение МОБ перед алло-ТГСК у больных острыми лейкозами является важным этапом диагностического процесса, а наличие остаточных опухолевых клеток сопряжено с крайне высоким риском развития рецидива в ранние сроки после алло-ТГСК. Однако прогноз у больных после алло-ТГСК зависит не только от МОБ-статуса, но и от эффективности приживления трансплантата и полноты восстановления иммунокомпетентных клеток.

2.8. Дефекты иммунной реконституции после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и их взаимосвязь с пострасплантационными осложнениями

В настоящее время трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) остается одним из немногих методов, позволяющих излечить многие заболевания системы крови. Терапевтический эффект алло-ТГСК достигается за счет циторедуктивного эффекта кондиционирования и последующего аллореактивного иммунного ответа на остаточные лейкоэмические клетки – «реакции трансплантат против лейкоза» (РТПЛ) [162].

Проведение высокодозной ХТ в качестве режима кондиционирования необходимо с целью обеспечения адекватной иммуносупрессии для предотвращения первичного отторжения трансплантата. В результате на ранних сроках после алло-ТГСК происходит сильное истощение иммунной системы

[213], что сопряжено с высоким риском развития жизнеугрожающих инфекционных осложнений в раннем посттрансплантационном периоде (до +100 дня после алло-ТГСК) [74]. Быстрое и полноценное восстановление функции донорской иммунной системы имеет первостепенное значение для долгосрочной выживаемости после алло-ТГСК [179]. Инфекции, возникающие на этапе до восстановления числа лейкоцитов ($> 2 \times 10^9/\text{л}$) представлены бактериальными, вирусными и грибковыми патогенами, которые контролируются лекарственными средствами, используемыми с профилактической целью [132]. Первые 100 дней после алло-ТГСК характеризуются глубоким иммунодефицитом из-за низкого количества НК и Т-клеток, что делает больных особенно восприимчивыми к вирусной инфекции, включая цитомегаловирус (ЦМВ), вирус герпеса человека 6 типа и вирус Эпштейна-Барр [42; 71].

Дефекты реконституции иммунной системы влияют на развитие аллореактивного иммунного ответа на остаточные лейкоэмические клетки – РТПЛ, что в конечном итоге может приводить к рецидиву основного заболевания. По данным разных авторов, частота развития рецидивов варьирует в зависимости от варианта заболевания, цитогенетических факторов риска, статуса заболевания перед алло-ТГСК и может достигать 50% [73; 166]. Прогноз у таких больных крайне неблагоприятен, особенно при развитии рецидива в первые полгода после алло-ТГСК. При этом возможности терапии резко ограничены, что обусловлено вероятной резистентностью опухолевых клеток к химиотерапии, а также тяжелым соматическим статусом больного, связанным с накопленной токсичностью, инфекционными осложнениями и/или развитием РТПХ [147; 154].

Рост числа алло-ТГСК ведет к появлению проблем, связанных с высокой нагрузкой на стационар, причем не только за счет больных, которых готовят к алло-ТГСК, но и за счет тех больных, которым алло-ТГСК уже провели. Н.С. Маджхаил и соавторами было подсчитано, что средняя общая стоимость 100-дневного лечения больных при алло-ТГСК составляет более двухсот тысяч долларов и большинство затрат ($> 75\%$) приходится на время первичной госпитализации перед алло-ТГСК [124]. Согласно исследованиям наших коллег

до 30,7% всех больных после алло-ТГСК повторно поступают в стационар в течение 30 дней после выписки [2]. При этом С.К. МакИльвеннан с соавторами подсчитали, что предотвращение даже 10% от всех случаев повторного поступления в 30-дневный срок после выписки может снизить затраты на систему здравоохранения в США на сумму почти в 1 миллиард долларов в год [129].

Восстановление врожденной и адаптивной иммунной системы происходит постепенно в течение длительного периода после алло-ТГСК. Иммунные клетки начинают вновь появляться в периферической крови в следующем порядке: нейтрофилы (14 дней), моноциты (1 мес.), НК (1 мес.), Т-клетки (2 мес.) и В-клетки (3 мес.); однако нормальное количество этих клеток достигается намного позже [181].

Время восстановления иммунокомпетентных клеток зависит от многих причин, таких как источник стволовых клеток, совместимость донора и реципиента по системе человеческих лейкоцитарных антигенов HLA (HLA – Human Leukocyte Antigens), режим кондиционирования, манипуляции с трансплантатом до алло-ТГСК (как например, Т-клеточная деплеция трансплантата), иммуносупрессивная терапия (особенно кортикостероиды), а также развитие РТПХ.

*Влияние типа донора на иммунную реконституцию после трансплантации
аллогенных гемопоэтических стволовых клеток*

Наиболее предпочтительным считается HLA-совместимый родственный донор, однако, такой донор доступен приблизительно в 25 % случаев [173]. Для пациентов, у которых нет HLA-идентичного сиблинга, алло-ТГСК может быть выполнена с использованием гемопоэтических стволовых клеток от HLA-идентичного неродственного, частично-совместимого неродственного или гаплоидентичного донора. Считается, что алло-ТГСК от HLA-идентичного родственного донора дает большие шансы на успешное восстановление иммунной системы, что способствует снижению частоты развития инфекционных

осложнений [170; 198] и летальности, связанной с проведением алло-ТГСК. Однако, благодаря совершенствованию режимов кондиционирования, иммуносупрессивной и сопроводительной терапии, результаты алло-ТГСК от неродственного полностью-совместимого донора приближаются к результатам алло-ТГСК от HLA-идентичного сиблинга [121]. Кроме того, появившиеся в последнее годы данные о гапло-ТГСК с использованием ПТ-ЦФ [120] или *ex vivo* деплеции Т-клеток с помощью антител к $\alpha\beta$ -ТКР [110] показали обнадеживающие результаты в отношении скорости восстановления показателей периферической крови.

*Влияние источника гемопоэтических стволовых клеток на иммунную
реконституцию после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых
клеток*

Потенциальными источниками гемопоэтических стволовых клеток, используемых для алло-ТГСК, являются костный мозг, мобилизованные гемопоэтические стволовые клетки периферической крови (СКК), а также пуповинная кровь.

КМ традиционно был источником, наиболее часто используемым для алло-ТГСК. После инфузии КМ врожденный иммунитет обычно восстанавливается в течение первых нескольких месяцев. Восстановление адаптивного иммунитета происходит в течение первого года. Мобилизованные СКК стали широко используемым источником стволовых клеток во многом благодаря удобству сбора периферических клеток. Однако трансплантаты СКК содержат приблизительно на 1 lg больше Т-клеток по сравнению с КМ [182], что приводит к увеличению риска развития хронической РТПХ (хРТПХ) [106]. Хотя «хоминг» стволовых клеток, полученных из КМ, должен быть лучше, чем при использовании СКК [185], восстановление показателей периферической крови происходит значительно быстрее при использовании СКК [106]. Так восстановление тромбоцитов (до $20 \times 10^9/\text{л}$) происходит на 11–18-ый дни при использовании СКК, тогда как при

трансплантации костного мозга на 17–25-ый дни. Восстановление нейтрофилов ($> 0,5 \times 10^9/\text{л}$) также происходит быстрее в случае применения в качестве источника трансплантата СКК (12–19 дней), чем при использовании КМ (15–23 дня). Это связано с присутствием бóльшего количества коммитированных мультипотентных предшественников в мобилизованных СКК, чем в КМ [106].

Пуповинная кровь используется в качестве альтернативного источника стволовых клеток. Благодаря иммунологическим особенностям стволовых клеток плацентарной крови, для их трансплантации достаточно совпадения как минимум 4 из 6 аллелей локусов HLA-A, -B, -DRB1. Одним из основных препятствий на пути широкого использования пуповинной крови для алло-ТГСК было ограниченное количество стволовых гемопоэтических клеток, которое можно собрать у одного донора. Это препятствие, по крайней мере, частично преодолевается у взрослых путем трансплантации двух неродственных частично-совместимых трансплантатов пуповинной крови [18]. При таком варианте алло-ТГСК один из трансплантатов осуществляет длительную иммунную реконституцию, а другой опосредует кратковременное приживление [14; 85]. По сравнению с трансплантациями КМ или мобилизованных СКК, алло-ТГСК с использованием пуповинной крови ассоциируется с более длительной нейтропенией (приблизительно 30 дней против 14), отсроченной иммунной реконструкцией и большей частотой развития инфекционных осложнений [52; 97].

Некоторые центры используют Т-клеточную деплецию или CD34-позитивную селекцию, чтобы модифицировать трансплантат стволовых клеток в попытке снизить частоту развития РТПХ. Хотя эти методы эффективны в предотвращении острой РТПХ (oРТПХ), удаление Т-клеток из трансплантата может неблагоприятно влиять на приживление, восстановление иммунной системы и, как следствие, на частоту рецидивов заболевания и инфекционных осложнений. Т-клеточная деплеция трансплантата приводит к значительному замедлению восстановления иммунной системы и вызывает увеличение вероятности развития жизнеугрожающих инфекционных осложнений [193].

Режимы кондиционирования, иммуносупрессивная терапия и иммунная реконституция после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Проведение кондиционирования необходимо для уничтожения остаточных опухолевых клеток, иммунокомпетентных клеток и предотвращения отторжения трансплантата. Существуют различные режимы кондиционирования, в которых используют высокие дозы химиотерапевтических препаратов (например, циклофосфида и бусульфана) и/или ТОТ [201]. На мышинных моделях было продемонстрировано, что использование режимов кондиционирования более высокой интенсивности может значительно увеличить вероятность приживания трансплантата от частично-совместимых доноров, но также увеличивает и токсичность, связанную с лечением [178].

В основном применяют два варианта режимов кондиционирования перед алло-ТГСК: миелоаблативный и режим пониженной интенсивности. К миелоаблативным режимам кондиционирования МАС (myeloablative conditioning) относятся схемы с применением ТОТ, высоких доз бусульфана (12-16 мг/кг), тиотепы (10 мг/кг) или мелфалана (200 мг/м²). Использование ТОТ приводит к необратимому повреждению тимуса, невозможности пролиферации *de novo* наивных Т-клеток и глубокому иммунодефициту. Такая же ситуация наблюдается и при использовании других схем МАС с той лишь разницей, что повреждение тимуса обеспечивается за счет высокой токсичности химиотерапевтических препаратов [119; 142]. Восстановление Т-клеточного звена происходит за счет пролиферации зрелых Т-клеток, которые были трансплантированы реципиенту от донора. В свою очередь, дальнейшая экспансия донорских Т-клеток реализует иммунологическую реакцию «трансплантат против лейкоза». Однако данный механизм - «перенос зрелых Т-клеток от донора к реципиенту» - может приводить к избыточной аллореактивности и развитию тяжелой оРТПХ [26].

Внедрение режимов пониженной интенсивности RIC (reduced intensity conditioning) приобрело актуальность вследствие большого количества тяжелых осложнений, связанных с органотоксичностью при назначении цитостатических препаратов в миелоаблативных дозах; высокой частоты развития рецидивов основного заболевания после алло-ТГСК, несмотря на использование цитостатических препаратов в максимальных дозах. Имеющиеся литературные данные показывают, что время восстановления Т-клеточного звена иммунного ответа у больных после алло-ТГСК с использованием RIC достоверно не отличается от тех пациентов, которым проводили МАС [72; 128].

Много исследований посвящено изучению реконституции иммунного ответа при использовании различных схем профилактики ОРТПХ, особенно при алло-ТГСК от частично-совместимых и гаплоидентичных доноров. Известно, что использование антитимоцитарного иммуноглобулина (АТГ) значительно удлиняет время восстановления практически всех субпопуляций иммунных клеток в сравнении с классическим режимом профилактики – циклоsporин А (ЦСА), метотрексат (МТХ) и микофенолата мофетил (ММФ). Так, было показано, что на +28 день алло-ТГСК после использования АТГ количество НК, моноцитов, базофилов, дендритных клеток значимо ниже, чем после классического режима без АТГ. Восстановление В-клеток происходит не ранее +180 дня алло-ТГСК, а восстановление Т-клеток происходит значительно дольше – количество как $CD4^+$, так $CD8^+$ на +730 день алло-ТГСК все еще не достигает нормальных значений [28].

Реакция «трансплантат против хозяина» и иммунная реконституция после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Режимы кондиционирования оказывают токсичные воздействия на органы и ткани. Повреждение кожных покровов и эндотелия заслуживает особого внимания, поскольку эти патологические изменения приводят к развитию осложнений, связанных с алло-ТГСК, а именно веноокклюзионной болезни,

микроангиопатии, РТПХ. В случае развития РТПХ может замедляться восстановление кожных покровов и слизистых оболочек. Иммунокомпетентные клетки слизистых оболочек относятся к врожденной иммунной системе, т.е. образуется замкнутый круг повреждения в случае развития РТПХ. С другой стороны, назначение иммуносупрессивной терапии, когда разворачивается клиника острой и/или хронической РТПХ, значительно замедляет восстановление иммунитета.

Больные хронической РТПХ имеют значительные дефекты как гуморального, так и клеточного иммунитета, отсроченное восстановление антигенпрезентирующих клеток и функциональный гипоспленизм. Восстановление функции моноцитов может занять до одного года, в то время как восстановление количества и функциональной активности тканевых дендритных клеток (например, клеток Лангерганса) может происходить в течение шести месяцев [204]. Кроме того, было показано, что вилочковая железа чрезвычайно чувствительна к методам лечения, используемым для подавления иммунологических реакций при развитии РТПХ, а также сама РТПХ оказывает сложное воздействие на тимус [67; 105; 106; 131; 152]. В связи с вышеизложенным, изучение восстановления Т- и В-клеточного и НК иммунитета после алло-ТГСК актуально для обнаружения дефектов реконституции и последующего возможного изменения тактики терапии.

Заключение

Современная стратегия терапии острых лейкозов, в том числе и таргетная, базируется на динамическом определении МОБ. Точная количественная детекция остаточного лейкоемического клона позволяет использовать новые подходы и выбирать или усиление, или минимизацию химиотерапевтического воздействия. Таким образом, определение МОБ при острых лейкозах стало обязательным направлением научно-клинических исследований. Количественные значения МОБ используют для стратификации больных на группы риска по глубине ответа

на терапию и прогнозирования развития рецидива. Несмотря на многочисленные исследования МОБ, необходимо учитывать, что пороговые значения МОБ на разных этапах терапии, определяющие различные прогностические группы больных, применимы только в рамках того протокола, в котором они были получены. Диагностика МОБ должна быть доступна для оценки ответа на лечение у каждого больного острым лейкозом, так как позволит провести точную оценку риска и своевременно оптимизировать терапию.

Для больных острыми лейкозами, отнесенных к группе неблагоприятного риска, одним из подходов улучшения прогноза является выполнение алло-ТГСК. Основными факторами, от которых зависит успех или неуспех алло-ТГСК, являются МОБ-статус перед и после алло-ТГСК, а также полнота и скорость иммунной реконституции. Иммунокомпетентные клетки донора обеспечивают развитие РТПЛ, то есть аллореактивную реакцию на остаточный опухолевый клон. Поэтому изучение дефектов восстановления основных клеточных компонентов иммунной системы представляется актуальной задачей, а анализ величины субпопуляций лимфоцитов может дать дополнительную информацию о прогнозе у больных после выполнения алло-ТГСК.

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Клинико-лабораторная характеристика больных

Определение МОБ проводили с 2015 года по 2022 год. Мониторинг МОБ осуществляли в рамках многоцентрового исследования по протоколу «ОЛЛ-2016». Раздел, связанный с ОМЛ и трансплантацией костного мозга выполнен на базе ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. В таблице 2 представлена характеристика распределения числа больных по нозологическим формам и по количеству выполненных исследований – этапов мониторинга МОБ, включенных в исследование/диссертационную работу.

Таблица 2 – Распределение больных, включенных в исследование, по нозологическим формам и этапам определения МОБ

Диагноз	Мониторинг МОБ на протоколе терапии n=267	МОБ до алло-ТГСК n=241	МОБ после алло-ТГСК	Восстановление иммунной системы после алло-ТГСК n=105
ОЛЛ	194	98	+30д=59 +60д=65 +90д=50 +180д=33	19+1(смешанного иммунофнотипа)
ОМЛ	73	143	+30д=77 +60д=99 +90д=57 +180д=37	60
Другие заболевания системы крови	-	-	-	25

Больные острым лимфобластным лейкозом, включенные в исследование минимальной остаточной болезни

Определение МОБ выполняли в аспирате костного мозга больных ОЛЛ, которые были включены в многоцентровое исследование «ОЛЛ-2016»

(NCT01193933), и госпитализированы в гематологические отделения любых регионов Российской Федерации, принимающих участие в совместной работе по оптимизации терапии острых лейкозов. Всего за период с февраля 2016 года по март 2022 года в протокол было включено 267 больных ОЛЛ. Всем больным на этапе диагностики заболевания выполнялось стандартное цитогенетическое исследование, молекулярно-генетические тесты на химерные транскрипты *BCR::ABL*, *MLL::AF4*, определение мутаций гена *FLT3*.

С целью анализа значения МОБ статуса в качестве фактора, влияющего на прогноз заболевания, и нивелирования возможного влияния других факторов на общую и безрецидивную выживаемость была сформирована “однородная” по своим клиническим характеристикам на момент окончания индукции группа больных. Критерии включения были следующие:

- 1) Достижение ремиссии на момент окончания индукции (после констатации рефрактерности больных исключали из исследования);
- 2) Отсутствие значимых отклонений от терапевтического протокола на этапе индукции;
- 3) Отсутствие решения об изменении терапевтического протокола после достижения ремиссии.

Мониторинг МОБ был выполнен у 194 больных, из них В-линейный вариант ОЛЛ был у 102 больных, Т-линейный – у 84 больных, смешанно-клеточный вариант – у 8 больных.

Следует обратить внимание на то, что при проведении ландмарк-анализа в конкретных временных точках количество больных может меняться и не совпадать с исходной численностью группы по различным причинам: не для всех больных проведены МОБ-исследования в каждой временной точке, для некоторых больных дата исследования в конкретной временной точке является датой последнего контакта.

Клинико-лабораторная характеристика больных ОЛЛ, включенных в исследование, представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Клинико-лабораторная характеристика больных ОЛЛ, включенных в исследование

Вариант ОЛЛ	В-ОЛЛ	Т-ОЛЛ
Число больных, n	102	84
Возраст, медиана (диапазон), лет	32 (18-55)	31 (18-52)
Соотношение мужчины/женщины	55/47	65/19
Иммунофенотипический вариант, n (%)	В-I: 19 (19%) В-II: 78 (76%) В-III: 5 (5,0%) В-IV: 0	Т-I: 9 (11%) Т-II: 28 (33%) Т-III: 41 (49%) Т-IV: 5 (6%) Неопределенный: 1 (1%)
Цитогенетика выполнена, n (%)	92 (90%)	82 (98%)
Нормальный кариотип, n (%)	32 (44%)	40 (56%)
Транслокация с вовлечением локуса гена MLL (KMT2A) /11q23, n (%)	5 (5%)	2 (2%)
Из них: t(4;11) (q21;q23)	5	0
Гиперплоидия, n (%)	13 (14%)	6 (7%)
Гипоплоидия, n (%)	2 (2%)	0
t(1;19) (q23;p13)	3 (3%)	0
Комплексный кариотип	5 (5%)	9 (11%)
Иные аномалии, n (%)	20 (22%)	18 (23%)

Измерения МОБ выполнялись на дни +36 (индукция I), +70 (индукция II), +105 (консолидация II), +133 (консолидация III), +162 (консолидация IV), +190 (консолидация V), а также на протяжении поддерживающей терапии протокола «ОЛЛ-2016». Исследования МОБ на +70, +133 и +190 дни проводилось для всех больных ОЛЛ, которые проходили терапию в ФГБУ «НМИЦ гематологии» (Москва), ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (Москва), ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», ГБУЗ «Волгоградский областной онкологический диспансер», ГБУЗ КО «Калужская областная клиническая больница», ГБУЗ Ярославской области «Областная клиническая больница», ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», БУ «Сургутская окружная клиническая больница», Санкт-Петербургском ГУЗ «Больница № 15», ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница» и в ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1».

Исследования МОБ на +36, +70, +105, +133, +162 и +190 дни выполняли только для больных, проходящих лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Терапию в зависимости от МОБ-статуса не меняли.

Больные острым миелоидным лейкозом, включенные в исследование минимальной остаточной болезни

В разделе диссертационной работы, посвященной исследованию МОБ у больных ОМЛ, включено 73 больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» с февраля 2017 года по январь 2021 года. Критериями включения в исследование были: впервые диагностированный ОМЛ, возраст до 60 лет, отсутствие острого промиелоцитарного лейкоза, отсутствие изменений, свойственных миелодисплазии.

Всем больным на этапе диагностики заболевания выполняли стандартное цитогенетическое исследование, FISH-исследование и молекулярно-генетические тесты, а именно исследование мутации генов *FLT3*, *NPM-1* и *CEBPA* (ССААЕ/enhancer-binding protein α) методом фрагментного анализа. Результаты этих исследований учитывали при формировании групп риска согласно классификации ELN-2017 [61].

Клинико-лабораторная характеристика больных ОМЛ, включенных в исследование приведена в Таблице 4.

Больные, включенные в исследование с февраля 2017 г. по декабрь 2018 г., получали терапию по протоколу «ОМЛ-17» (n=37), с января 2019 г. больные были включены в модифицированный протокол «мОМЛ-17» (n=36). Больные ОМЛ с изменениями, свойственными миелодисплазии (n=21), были исключены из исследования.

Таблица 4 – Клинико-лабораторная характеристика больных ОМЛ, включенных в исследование

Параметр	Значения
Число больных, n	73
Медиана возраста (разброс), лет	37 (17-58)
Соотношение мужчины/женщины, n	28/45
Лейкоцитоз $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$, n	17
Медиана ЛДГ (разброс), Ед/л	1029 (205-21224)
Вовлечение ЦНС, n	12
Цитогенетическая группа риска:	
Благоприятная, n	15
Промежуточная, n	53
Неблагоприятная, n	5
Группа риска по ELN-2017:	
Благоприятная, n:	34
t(8;21), n	8
inv(16) или t(16/16), n	7
мутации <i>CEBPA</i> , n	3
мутации <i>NPM1</i> , n	18
мутации <i>NPM1</i> с низкой аллельной нагрузкой FLT3-ITD, n	5
Промежуточная, n:	26
Нормальный кариотип без мутаций, n	13
Низкая аллельная нагрузка FLT3-ITD, n	3
Мутации <i>NPM1</i> с высокой аллельной нагрузкой FLT3-ITD, n	2
Трисомия 8 хромосомы, n	3
t(9;11), n	1
Неблагоприятная, n:	13
Транслокация с вовлечением локуса гена MLL (11q23), n	2
Высокая аллельная нагрузка FLT3-ITD, n	8
t(6;9), n	1

Протокол «ОМЛ-17» предусматривал в качестве 1-го индукционного курса классическую программу «7+3» (даунорубицин 60 мг/м² 1 раз в день 1–3-й дни и цитарабин 200 мг/м² в день в виде непрерывной инфузии 1–7-й дни). В качестве 2-го индукционного курса использовалась программа «FLARIDA», составленная на основе программы FLA-G-Ida (цитарабин в средних дозах (1,5 г/м²) через 2 ч после введения флударабина (25 мг/м² в 1–5-й дни) и идарубицин (8 мг/м², 1, 3-й дни). Этот курс повторяли и в качестве консолидации. В модифицированном протоколе «мОМЛ-17» в качестве 2 индукционных курсов стали применять 2 курса «7+3», а в качестве консолидации – 2 курса FLA-G. Для дальнейшего анализа больных из этих двух групп объединили в одну «ОМЛ-17» (так как не было выявлено различий в эффективности индукционной терапии по программе

ОМЛ-17 и мОМЛ-17). Больным в ПР из группы благоприятного и промежуточного прогнозов после завершения курсов индукции/консолидации проводили поддерживающую терапию: в зависимости от рандомизации 6 курсов «5+5» или постоянная 2-летняя поддерживающая терапия 6-меркаптопурином и метотрексатом. Всем больным из групп промежуточного и неблагоприятного прогнозов в период 1-ой ПР предусматривали выполнение аллоТГСК как запланированного этапа программной терапии [7].

Определение МОБ выполняли в аспирате костного мозга после 1-го и 2-го индукционных курсов при восстановлении показателей периферической крови (нейтрофилы $> 1,5 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты $100 \times 10^9/\text{л}$).

Больные, включенные в исследование минимальной остаточной болезни перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови

В исследование был включен 241 больной: 143 больных ОМЛ и 98 больных ОЛЛ, которым была выполнена алло-ТГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с сентября 2015 года по июль 2021 года.

Характеристики больных, программы кондиционирования, вид донора, источник трансплантата, режимы профилактики РТПХ приведены в Таблице 5. Перед началом кондиционирования у всех больных была подтверждена клинико-гематологическая ремиссия заболевания. Исследование МОБ методом МПЦ выполнялось в пунктате костного мозга непосредственно перед началом кондиционирования ($n=241$) и далее в контрольные точки (+30, +60, +90, +180 дни после алло-ТГСК).

Таблица 5 – Характеристика больных острыми лейкозами, включенных в исследование по изучению предтрансплантационного значения МОБ

Параметры	ОМЛ (n=143)	ОЛЛ (n=98)
Медиана наблюдения, мес	19,3 (1,5-58)	11,7 (1-65,5)
Пол (мужской/женский)	57/86	49/49
Возраст (медиана, интервал)	38 (18-66)	31 (17-63)
Статус заболевания <ul style="list-style-type: none"> • Ремиссия 1 • Ремиссия 2 и более 	117 (82%) 26 (18%)	58 (59%) 40 (41%)
Цитогенетическая группа риска (для ОМЛ) <ul style="list-style-type: none"> • благоприятная • промежуточная • неблагоприятная 	25 (17%) 81 (57%) 37 (26%)	
Вариант ОЛЛ <ul style="list-style-type: none"> • Т-клеточный • В-клеточный • Ph-позитивный 		22 (22%) 46 (47%) 30 (31%)
Режим кондиционирования <ul style="list-style-type: none"> • Миелоаблативный • Пониженной интенсивности 	34 (24%) 109 (76%)	37 (38%) 61 (62%)
Программа кондиционирования <ul style="list-style-type: none"> • BuCy • FluBu • FluCy • FluMel • FluTre • FluTreMel • ThioFluBu • ThioFluMel • ThioFluTre 	27 (19%) 90 (63%) 1 (1%) - 4 (2%) 14 (10%) 1 (1%) - 6 (4%)	19 (20%) 52 (53%) - 1 (1%) 1 (1%) 4 (4%) 2 (2%) 2 (2%) 17 (17%)
Вид донора <ul style="list-style-type: none"> • Родственный совместимый • Неродственный совместимый • Неродственный частично-совместимый • Гаплоидентичный 	47 (33%) 35 (24%) 22 (16%) 39 (27%)	19 (20%) 23 (23%) 18 (18%) 38 (39%)
Источник трансплантата <ul style="list-style-type: none"> • Костный мозг • Периферические стволовые клетки 	56 (39%) 87 (61%)	23 (23%) 75 (77%)
Режимы профилактики РТПХ <ul style="list-style-type: none"> • АТГ-содержащие • ЦФ-содержащие • TCR$\alpha\beta$-деплеция • Другие (ЦСА+MTX) 	75 (52%) 34 (24%) 20 (14%) 14 (10%)	44 (45%) 26 (27%) 21 (21%) 7 (7%)

Продолжение Таблицы 5 – Характеристика больных острыми лейкозами, включенных в исследование по изучению предтрансплантационного значения МОБ

Параметры	ОМЛ (n=143)	ОЛЛ (n=98)
Профилактика РТПХ		
• ЦСА+МТХ*	14 (10%)	7 (7%)
• АТГ+МТХ+ЦСА	4 (3%)	1 (1%)
• АТГ+МТХ+ЦСА+ММФ	45 (32%)	22 (23%)
• Моно-ЦФ	2 (1%)	1 (1%)
• АТГ+ЦФ+ЦСА+ММФ	26 (18%)	21 (21,5%)
• ЦФ+ЦСА+ММФ	32 (22%)	25 (26%)
• Ритуксимаб+тоциллизумаб+абатацепт	20 (14%)	21 (21,5%)

Примечание: ЦСА – циклоспорин А; МТХ – метотрексат; ЦФ – циклофосфамид; ММФ – микофенолата мофетил; АТГ – антитимоцитарный иммуноглобулин

Посттрансплантационную терапию проводили больным из группы высокого риска развития рецидива заболевания. Критериями для группы высокого риска развития рецидива считались: первично-резистентное течение заболевания, рецидивирующее течение заболевания (выполнение трансплантации во второй и более ремиссии заболевания), группа неблагоприятного цитогенетического риска при ОМЛ, стратификационные критерии группы высокого риска при ОЛЛ (транслокация (9;22) или BCR::ABL, транслокация (4;11) или MLL::AF4), а также персистенция МОБ, несмотря на проводимую в рамках существующих протоколов терапию ОЛ, наличие МОБ перед алло-ТГСК. Профилактическая посттрансплантационная терапия была проведена 55 больным (31 больному ОМЛ и 24 – ОЛЛ).

В качестве посттрансплантационной терапии использовали трансфузии лимфоцитов донора в сочетании с гипометилирующими агентами (n=24) и без них (n=7) или «таргетные» препараты, которые применяли у пациентов, имевших биологические «мишени» для них, например, BCR::ABL (n=16) или FLT3-ITD (n=9).

Больные, включенные в исследование реконституции лимфоцитарного звена иммунитета после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови

В исследование включено 105 больных с диагнозами: ОМЛ (n = 60), В-ОЛЛ (n = 17), Т-ОЛЛ (n = 2), острый лейкоз смешанного фенотипа (n = 1), хронический миелоидный лейкоз (n = 2), лимфома мантийной зоны (n = 2), Т-клеточная лимфома (n = 5), хронический лимфолейкоз (n = 1), первичный миелофиброз (n = 3), миелодиспластический синдром (МДС) (n = 9), идиопатическая апластическая анемия (n = 3). Всем пациентам выполнили алло-ТГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ с 2017 по 2019 год. Характеристики больных приведены в Таблице 4.

Иммуносупрессивную терапию (ИСТ) проводили по схемам, в зависимости от основного заболевания, режима кондиционирования и HLA-совместимости пары «донор-реципиент»: классическая ИСТ (кИСТ, n = 66; 62,9%), ИСТ с использованием ПТ-ЦФ (n = 27; 25,7%) и с $\alpha\beta$ -Т-клеточной деплецией (ТКД, n = 12; 11,4%). кИСТ включала схемы: 1) АТГ 40 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м²; ММФ 2 г/сут, 2) Циклоспорин А (ЦСА) 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м², 3) Тимоглобулин 7,5 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м²; ММФ 2 г/сут, 4) АТГ 40 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м², 5) АТГ 40 мг/кг; Такролимус 0,3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м²; ММФ 2 г/сут.

В группе ПТ-ЦФ ЦФ использовали либо в режиме монотерапии в дозе 50+50 мг/кг на +3 и +4 день, либо в комплексе с другими препаратами по следующим схемам: 1) АТГ 40 мг/кг; ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; ММФ 3 г/сут., 2) АТГ 40 мг/кг; ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг., 3) Тимоглобулин 7,5 мг/кг; ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; ММФ 3 г/сут.

В группе ТКД проводили процедуру *ex vivo* деплеции $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов и CD19⁺ В-клеток по протоколу отдела оптимизации профилактики и лечения осложнений после алло-ТГСК ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва» [25] (руководитель исследования: профессор, д.м.н. Масчан М.А.).

Классическую ИСТ применяли в случаях родственной совместимой алло-ТГСК (n=35; 53%), неродственной совместимой (n=31; 47%); ПТ-ЦФ – при неродственных несовместимых алло-ТГСК (n=20; 74,1%), неродственной совместимой (n=4; 14,8%), родственной совместимой (n=2; 7,4%), гаплоидентичной неродственной (n=1; 3,7%). ТКД проводили только при гапло-ТГСК, используя в качестве трансплантата только СКК (n=12) (Таблица 6).

В исследование включены больные только после первой алло-ТГСК. Кондиционирование в режиме RIC (Флударабин 180 мг/м² и Бисульфан 8 мг/кг за курс, либо Флударабин 180 мг/м², Треосульфан 36 г/м² и Мелфалан 140 мг/м² за курс (в случае частично совместимой алло-ТГСК – без Мелфалана) выполнили 78 больным (74,3%), а 27 больным (25,7%) – в режиме MAC (Бусульфан 12 мг/кг и ЦФ 120 мг/кг за курс). У 24 (22,9%) больных развился рецидив заболевания, медиана времени от алло-ТГСК до рецидива составила 9,6 мес. (2-24 мес.). У 37 (35,2%) пациентов была подтверждена оРТПХ, у 35 (33,3%) – хРТПХ. Повторная госпитализация в промежутке от 3-го до 6-го месяца после алло-ТГСК потребовалась 31 (41,0%) больному, от 3-го до 6-го месяца – 26 больным (36,2%) и от 9-го до 12-го месяца – 13 (29,5%) больным.

Таблица 6 – Характеристика больных, включенных в исследование лимфоцитарного звена иммунитета после аллоТГСК

Схема ИСТ Параметры	Классическая	С введением посттрансплантационного циклофосфамида	Т- клеточная деплеция
n (%)	66 (62,9%)	27 (25,5%)	12 (11,4%)
Число мужчин и женщин	30:36	15:12	4:8
Возраст – минимум-максимум (медиана), лет	21-70 (41)	24-62 (42)	20-60 (37)
Диагноз, n			
ОМЛ	36	18	8
В-ОЛЛ	11	3	2
Т-ОЛЛ	1	1	1
МДС	5	0	1
апластическая анемия:	3	0	0
В-клеточная лимфома:	2	1	0
Т-клеточная лимфома:	3	3	0
Миелофиброз:	2	1	0
хронический лимфолейкоз:	1	0	0
хронический миелолейкоз:	2	0	0
Источник трнсплантата, n (%)			
КМ	48 (72,7%)	11 (40,7%)	0 (0%)
СКК	18 (27,3%)	16 (59,3%)	12 (100%)

Продолжение Таблицы 6 – Характеристика больных, включенных в исследование лимфоцитарного звена иммунитета после алло-ТГСК

Схема ИСТ Параметры	Классическая	С введением посттрансплантационного циклофосфида	Т- клеточная депрессия
Тип алло-ТГСК, n (%)			
родственная совместимая	35 (53%)	2 (7,4%)	0
неродственная совместимая	31 (47%)	4 (14,8%)	0
гаплоидентичная	0	1 (3,7%)	0
неродственная несовместимая	0	20 (74,1%)	12 (100%)
Кондиционирование, n (%)			
RIC	49 (74,2%)	21 (77,8%)	8 (66,7%)
MAC	17 (25,8%)	6 (22,2%)	4 (33,3%)
Схема ИСТ, n (%)			
1) АТГ 40 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м ² ; ММФ 2 г/сут	52 (78,8%)	0	0
2) ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м ²	6 (9,1%)	0	0
3) Тимоглобулин 7,5 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м ² ; ММФ 2 г/сут	4 (6,1%)	0	0
4) АТГ 40 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м ²	3 (4,5%)	0	0
5) АТГ 40 мг/кг; Такролимус 0,3 мг/кг; МТХ 15-10 мг/м ² ; ММФ 2 г/сут	1 (1,5%)	0	0
6) АТГ 40 мг/кг; ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; ММФ 3 г/сут	0	21 (77,8%)	0
7) АТГ 40 мг/кг; ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг	0	4 (14,8%)	0
8) ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг	0	1 (3,7%)	0
9) Тимоглобулин 7,5 мг/кг; ПТ-ЦФ 50+50 мг/кг; ЦСА 3 мг/кг; ММФ 3 г/сут	0	1 (3,7%)	0
oРТПХ, n (%)	23 (34,8%)	11 (40,7%)	3 (25,0%)
xРТПХ, n (%)	26 (39,4%)	8 (29,6%)	1 (8,3%)
Рецидив, n (%)	16 (24,2%)	4 (14,8%)	4 (33,3%)
Смерть, n (%)	21 (31,8%)	8 (29,6%)	3 (25,0%)

Для всей когорты больных были использованы ключевые показатели иммунного статуса в сроки от +3 до +12 мес. после алло-ТГСК с целью оценки риска повторного поступления больных в стационар.

Анализ субпопуляций лимфоцитов осуществляли на +3, +6, +9 и +12 мес. после алло-ТГСК.

*Подразделения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России,
принимавшие участие в исследовании*

- 1) Отделение интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным стационаром (заведующий отделением, к.м.н. Кузьмина Л.А.);
- 2) Отделение интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром (заведующий отделением, к.м.н. Фидарова З.Т.);
- 3) Отделение онкологии (химиотерапии гемобластозов) и депрессий кроветворения с дневным стационаром (заведующий отделением, к.м.н. Лукьянова И.А.);
- 4) Отделение иммунохимиотерапии с дневным стационаром для больных после ТКМ и группой поиска потенциальных доноров (заведующий отделением, к.м.н. Васильева В.А.);
- 5) Сектор по изучению иммунных воздействий и осложнений после ТКМ (руководитель сектора, к.м.н. Дроков М.Ю.);
- 6) Отделение интенсивной высокодозной химиотерапии гематологических заболеваний с круглосуточным и дневным стационарами (заведующий отделением, к.м.н. Грибанова Е.О.);
- 7) Отделение орфанных заболеваний (заведующий отделением, д.м.н. Лукина Е.А.);
- 8) Обсервационное отделение (заведующий отделением, к.м.н. Гаврилина О.А.);
- 9) Централизованная клинико-диагностическая лаборатория (заведующий лабораторией, к.м.н. Двирнык В.Н.);
- 10) Лаборатория кариологии (заведующий лабораторией, к.м.н. Обухова Т.Н.);
- 11) Информационно-аналитический отдел (начальник отдела, к.т.н. Куликов С.М.);

12) Лаборатория молекулярной гематологии (заведующий лабораторией, д.б.н. Судариков А.Б.);

13) Патологоанатомическое отделение (заведующий отделением, д.б.н., Ковригина А.М.).

3.2. Подготовка проб для цитометрического исследования минимальной остаточной болезни

Материалом для исследования являлся аспират КМ с антикоагулянтом ЭДТА-К3 (этилендиаминтетраацетат калия 3-х замещенный). Образец КМ объемом 1 мл переносили в полипропиленовую центрифужную пробирку на 15 мл и добавляли 9 мл предварительно разведенного дистиллированной водой (1:9) лизирующего раствора Pharm Lyse (BD Biosciences, США), оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Далее образец центрифугировали при 400 g 3,5 мин на центрифуге Z32 6K (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, а к клеточному осадку добавляли 2 мл раствора CellWash (BD Biosciences, США), перемешивали с помощью вортекса V-1 plus (Biosan, Латвия) и вновь центрифугировали при 400 g 3,5 мин. Далее надосадочную жидкость удаляли, добавляли 1 мл раствора CellWash, перемешивали на вортексе и пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм «Filcons» (BD Biosciences, США) для удаления микросгустков. Затем подсчитывали содержание ядродержащих клеток в образце на гематологическом анализаторе Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия).

В-ОЛЛ. У больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом для окраски моноклональными антителами отбирали не более 2×10^6 клеток в 100 мкл раствора CellWash в круглодонные полипропиленовые пробирки объемом 5 мл (Falcon, Мексика). Добавляли моноклональные антитела, меченые флюорохромами, согласно Таблицам А1 или А2 в Приложении А, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. В период с 2016 по 2019 в лаборатории использовалась 6-ти цветная панель моноклональных антител, а с

2019 по 2021 годы – 10-цветные панели моноклональных антител (Приложение А). Десятицветный набор антител №1 Таблицы А2 включал готовую смесь семи конъюгатов антител с флуорохромными красителями DURAClone RE ALB (Beckman Coulter, Франция), включающий антитела против CD10, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45 и CD58. К этой смеси дополнительно добавляли антитела против антигенов CD24 (Beckman Coulter, Франция), CD22 (Becton Dickinson, США), а также краситель Syto41 (Invitrogen), окрашивающий все ядродержащие клетки. Такое сочетание антител позволяет обнаруживать aberrантные клетки и в случае применения таргетной терапии моноклональными антителами анти CD19 и анти CD22.

Десятицветный набор антител 2 (Таблица А2) для определения МОБ у больных В-ОЛЛ включал 7-аминоактиномицин D (7-AAD) – интеркалирующий флуоресцирующий краситель, окрашивающий ДНК, способный попадать внутрь клетки только через поврежденную мембрану. Поэтому 7-AAD окрашивает только нежизнеспособные клетки (претерпевающие некроз или апоптоз) [77].

При использовании этого набора перед внесением антител к клеточной суспензии добавляли буфер для антител, конъюгированных с бриллиант-фиолетовыми красителями, BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, США) для предотвращения взаимодействия между красителями.

Настройку компенсаций флуоресценции проводили с помощью BD CompBeads (BD Biosciences, США) или VersaComp Antibody Capture Beads (Beckman Coulter, Франция).

Чтобы избавиться от несвязавшихся антител, в пробирки вносили по 2 мл раствора CellWash, перемешивали на вортексе, центрифугировали при 400 g 3,5 мин, надосадочную жидкость сливали. После чего добавляли по 100 мкл раствора CellWash.

Клеточную взвесь с целью выявления МОБ при ОЛЛ и ОМЛ анализировали на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) или 13-цветном CytoFLEX (Beckman Coulter, Китайская Народная Республика). Регулировка напряжения на фотоумножителях для поддержания

значений выходного сигнала проводилась рутинно с применением Cytometer Setup & Tracking Beads kit (BD Biosciences, США) для BD FACSCanto II и CytoFlex Daily QC Fluorospheres (Beckman Coulter, Франция) для CytoFLEX. Анализ данных производился с помощью программного обеспечения FACSDiva Software Version 6.1.3. или Kaluza Analysis 2.1.

Т-ОЛЛ. Лизис эритроцитов выполняли раствором FACSLyse (BD Biosciences, США) после инкубации с антителами. В пробирки для цитометра объемом 5 мл (Falcon, Мексика) переносили не более 100 мкл КМ, содержащего, если было возможно, 1×10^6 клеток, и добавляли моноклональные антитела согласно Таблицам А1 или А2 в Приложении А. Инкубация образца с антителами проводилась по стандартной методике. В период с 2016 по 2019 в лаборатории использовалась 6-цветная панель моноклональных антител, а с 2019 по 2021 годы – 9- и 11-цветные панели моноклональных антител (Приложение А). При использовании 9- и 11-цветных панелей перед внесением моноклональных антител добавляли BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, США).

После отмывки от избытка антител и лизирующего раствора, осуществлялась пермеабиллизация клеток для возможности выполнить цитоплазматическое окрашивание моноклональным антителом к антигену CD3. Для этого использовали коммерческие наборы для пермеабиллизации: IntraPrep (Beckman Coulter) или BD IntraSure™ Kit (BD Biosciences, США) согласно инструкции. После этого выполнялась отмывка образца и анализ.

ОМЛ. Для окрашивания в каждую пробирку объемом 5 мл (Falcon, Мексика) отбирали 2×10^6 лейкоцитов. Если клеточность образца была недостаточной, то для анализа брали максимально возможное количество клеток, разделяя весь образец на необходимое число пробирок. После этого добавляли моноклональные антитела (согласно Таблицам А1 или А2 в Приложении А), и инкубировали, отмывали и анализировали. В период с 2016 по 2018 гг. в лаборатории использовалась 6-цветный набор антител 1, с 2019 по 2020 гг. – 6-цветный набор 2 (Таблица А1). С 2020 года мы начали применять 11-цветную панель (Таблица А2). Это сочетание моноклональных антител было разработано

исследовательской группой по иммунологической диагностике детского больничного комплекса Святой Анны (Вена, Австрия). При использовании 11-цветной панели перед внесением моноклональных антител добавляли BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, США).

3.3. Количественный подсчет минимальной остаточной болезни, определение чувствительности

В результате цитометрического анализа данных у больных острыми лейкозами делалось заключение о наличии/отсутствии МОБ. Поиск МОБ осуществляли преимущественно методом «пустых мест» [206; 207]. У больных острыми лейкозами, проходивших терапию в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, образцы костного мозга в дебюте заболевания были проанализированы с помощью тех же наборов моноклональных антител, по которым предполагалось проводить мониторинг МОБ. Полученную информацию о дебютном ЛАИФ также использовали для определения остаточных опухолевых клеток. Однако вследствие наличия феномена изменения иммунофенотипа, поиск МОБ проводили полностью по выработанному стандартному алгоритму гейтирования, который будет описан в главе «Результаты». За МОБ принимали популяцию, которая состояла из 20 и более клеток с aberrантным фенотипом.

Чтобы сделать заключение о наличии МОБ проверяли выполнение следующих критериев:

- 1) Адекватное количество материала для исследования, отсутствие сгустков в образце КМ;

- 2) Обнаружение кластера из 20 и более клеток с сочетанием экспрессии исследуемых антигенов, не встречающимся в костном мозге здоровых доноров. Проверялась «гомогенность» этой популяции, т.е. схожесть экспрессии большинства изучаемых антигенов, а также показателей прямого и бокового светорассеяния для всех событий, формирующих подозрительную популяцию.

При наличии МОБ подсчитывали количество клеток в обнаруженном кластере в процентном отношении от всех клеток образца после исключения дедриса на графике прямого и бокового светорассеяния. Если в панели содержался краситель Syto41, то долю опухолевых клеток определяли относительно клеток, окрашивающихся Syto41. При наличии признаков значительного разведения образца периферической кровью (преобладание зрелых форм нейтрофилов, отсутствие плазматических клеток, нормальных миелоидных и В-клеточных предшественников) было рекомендовано повторное проведение пункции КМ, так как количество клеток, относимых к МОБ, может быть значительно больше в неразведенном кровью образце КМ.

Чтобы сделать заключение об отсутствии МОБ проверяли наличие следующих критериев:

- 1) Отсутствие хотя бы 20 аномальных клеток, формирующих популяцию;
- 2) Адекватное качество образца, отсутствие сгустков. При наличии признаков значительного разведения образца периферической кровью было рекомендовано повторное проведение пункции КМ.

При отсутствии МОБ рассчитывали показатель чувствительности по формуле 1.

$$\text{чувствительность} = \frac{20}{\text{количество ядродержащих клеток}} \times 100\%.$$

В ходе проводимых исследований стремились достичь чувствительности 0,01% [31], для чего анализировали не менее 200 тысяч клеток.

Если в анализируемом образце МОБ отсутствовала, но чувствительность исследования была более 0,01%, то проводилась повторная пункция КМ.

3.4. Качественное описание иммунофенотипа клеток, формирующих остаточную опухолевую популяцию, у больных острыми лимфобластными лейкозами

Если на 70-й день по протоколу «ОЛЛ-2016» у больных ОЛЛ выявлялась опухолевая популяция, то мы 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*, сокращение от «dimly» – тусклый);
- 4) частично-негативная (+/–);
- 5) наличие экспрессии (+);
- 6) высокая плотность экспрессии (*high* – высокий).

Частично-положительной экспрессией называли экспрессию антигена в случае, если доля позитивных по этому антигену клеток была менее, чем 50%. Частично-негативной – если доля позитивных клеток была более 50%.

Экспрессию CD19, CD10, CD34, CD38 и CD20 опухолевыми клетками оценивали по сравнению с нормальными В-клеточными предшественниками, зрелыми В-клетками и ПК. На графике CD34 против CD10 оценивали экспрессию CD10 (Рисунок 2 (а–г)) и CD34 (Рисунок 2 (д–з)), на графике CD38 против CD10 оценивали экспрессию CD38 (Рисунок 2 (и–м)), на графике CD20 против CD10 оценивали экспрессию CD20 (Рисунок 2 (н–р)).

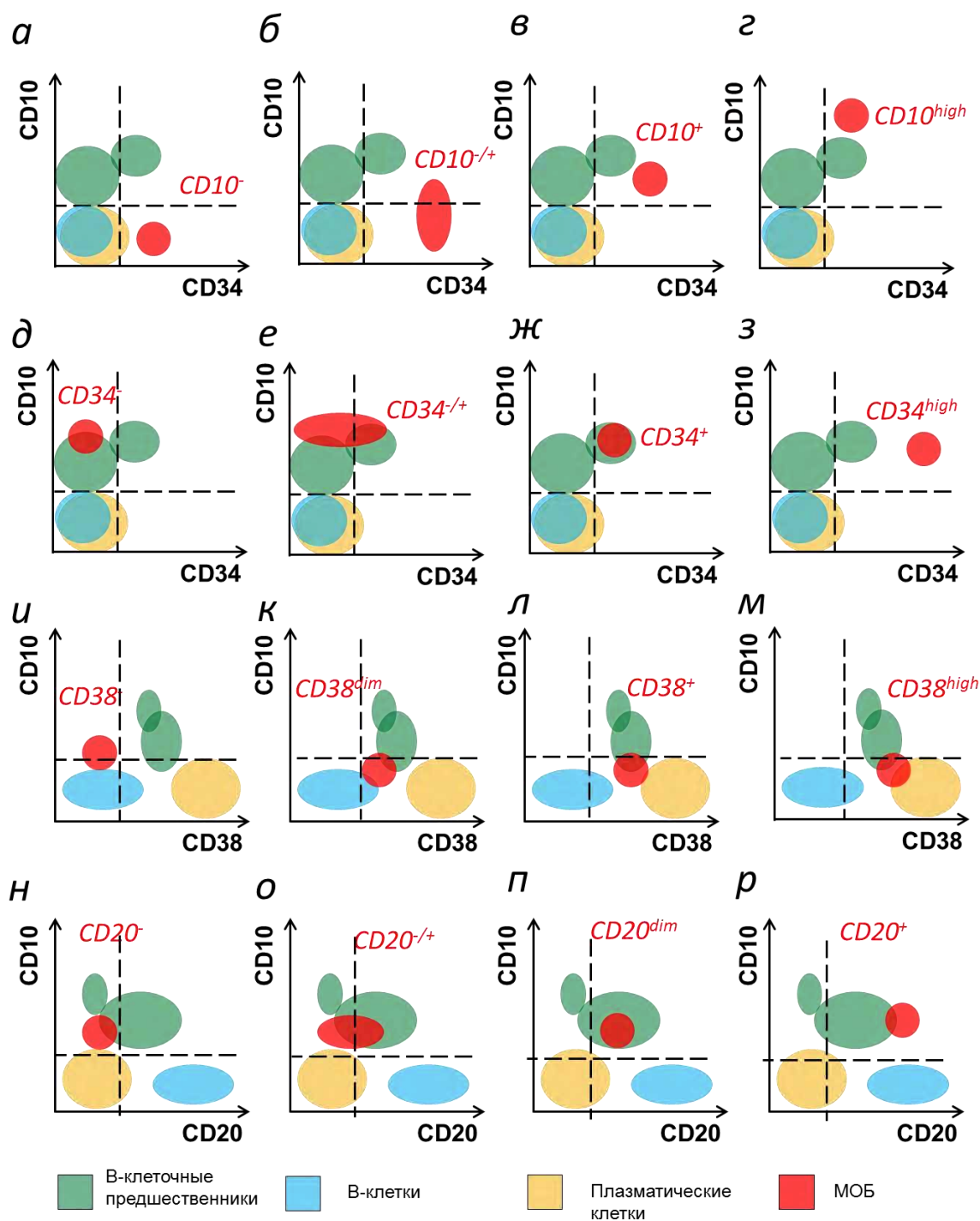


Рисунок 2 – Примеры схематического расположения $CD19^+$ клеток: нормальных В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток, плазматических клеток и остаточных опухолевых клеток. Описание иммунофенотипа остаточных опухолевых клеток в представленных случаях: *а* – отсутствие экспрессии CD10; *б* – частично-положительная экспрессия CD10; *в* – наличие экспрессии CD10; *г* – высокая плотность экспрессии CD10; *д* – отсутствие экспрессии CD34; *е* – частично-положительная экспрессия CD34; *ж* – наличие экспрессии CD34; *з* –

высокая плотность экспрессии CD34; *u* – отсутствие экспрессии CD38; *к* – слабая экспрессия CD38; *л* – наличие экспрессии CD38; *м* – высокая плотность экспрессии CD38; *н* – отсутствие экспрессии CD20; *о* – частично-негативная экспрессия CD20; *п* – слабая экспрессия CD20; *р* – наличие экспрессии CD20

На графике CD19 против бокового светорассеяния с отображением всех клеток костного мозга после исключения дэбриса оценивали экспрессию CD19 на остаточных опухолевых клетках (Рисунок 3 (а–в)). Экспрессию CD45 и CD58 остаточными опухолевыми клетками у больных В-ОЛЛ оценивали по отношению к гранулоцитам, моноцитам и лимфоцитам (Рисунок 3).

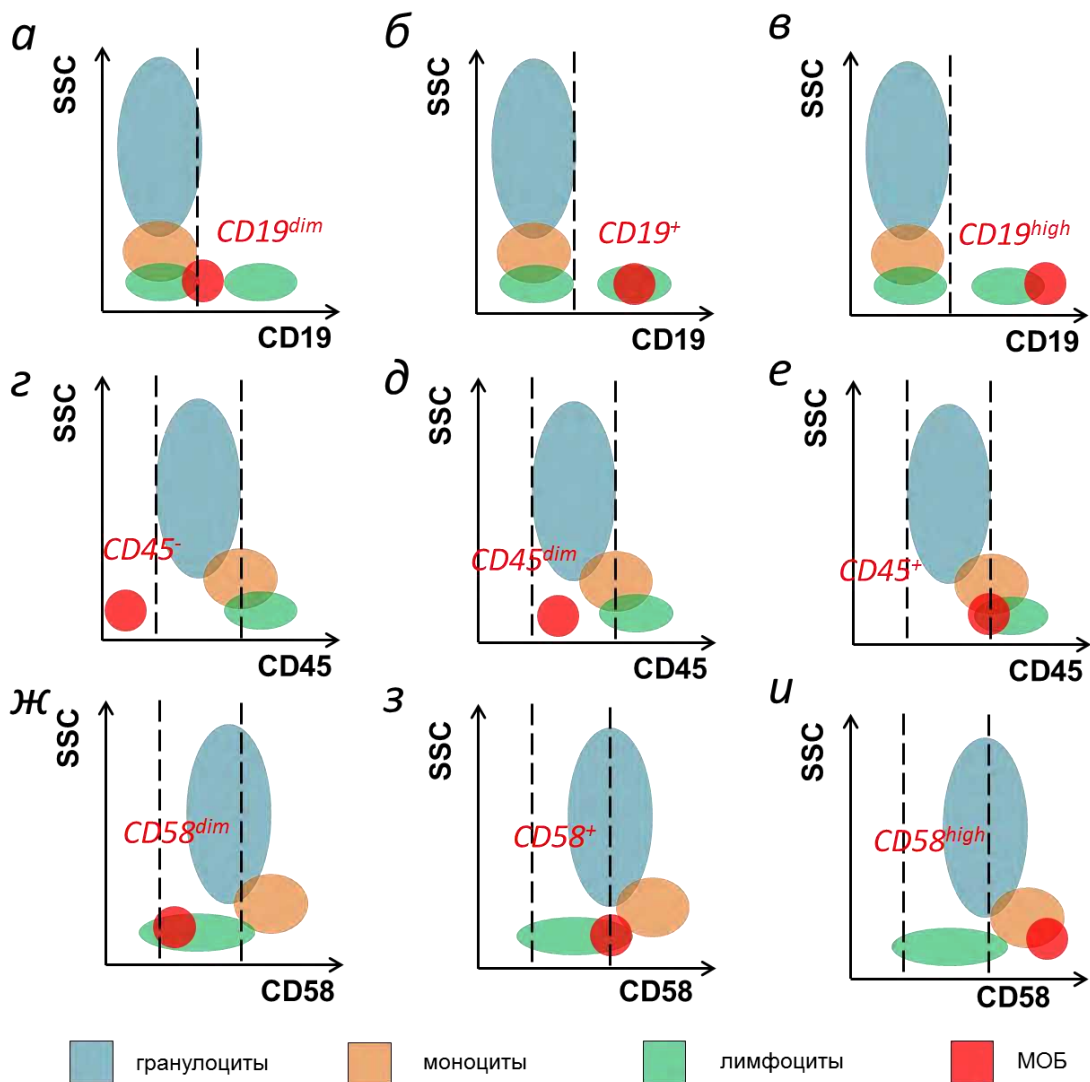


Рисунок 3 – Примеры схематического расположения гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов и остаточных опухолевых клеток. Описание

иммунофенотипа остаточных опухолевых клеток в представленных случаях: *а* – слабая экспрессия CD19; *б* – наличие экспрессии CD19; *в* – высокая плотность экспрессии CD19; *г* – отсутствие экспрессии CD45; *д* – слабая экспрессия CD45; *е* – наличие экспрессии CD45; *ж* – слабая экспрессия CD58; *з* – наличие экспрессии CD58; *и* – высокая плотность экспрессии CD58

У больных Т-ОЛЛ экспрессию антигенов CD3, CD7, CD8, CD4, CD5, CD99, CD45 остаточными опухолевыми клетками оценивали по отношению к экспрессии этих антигенов зрелыми Т-клетками и НК (Рисунок 4).

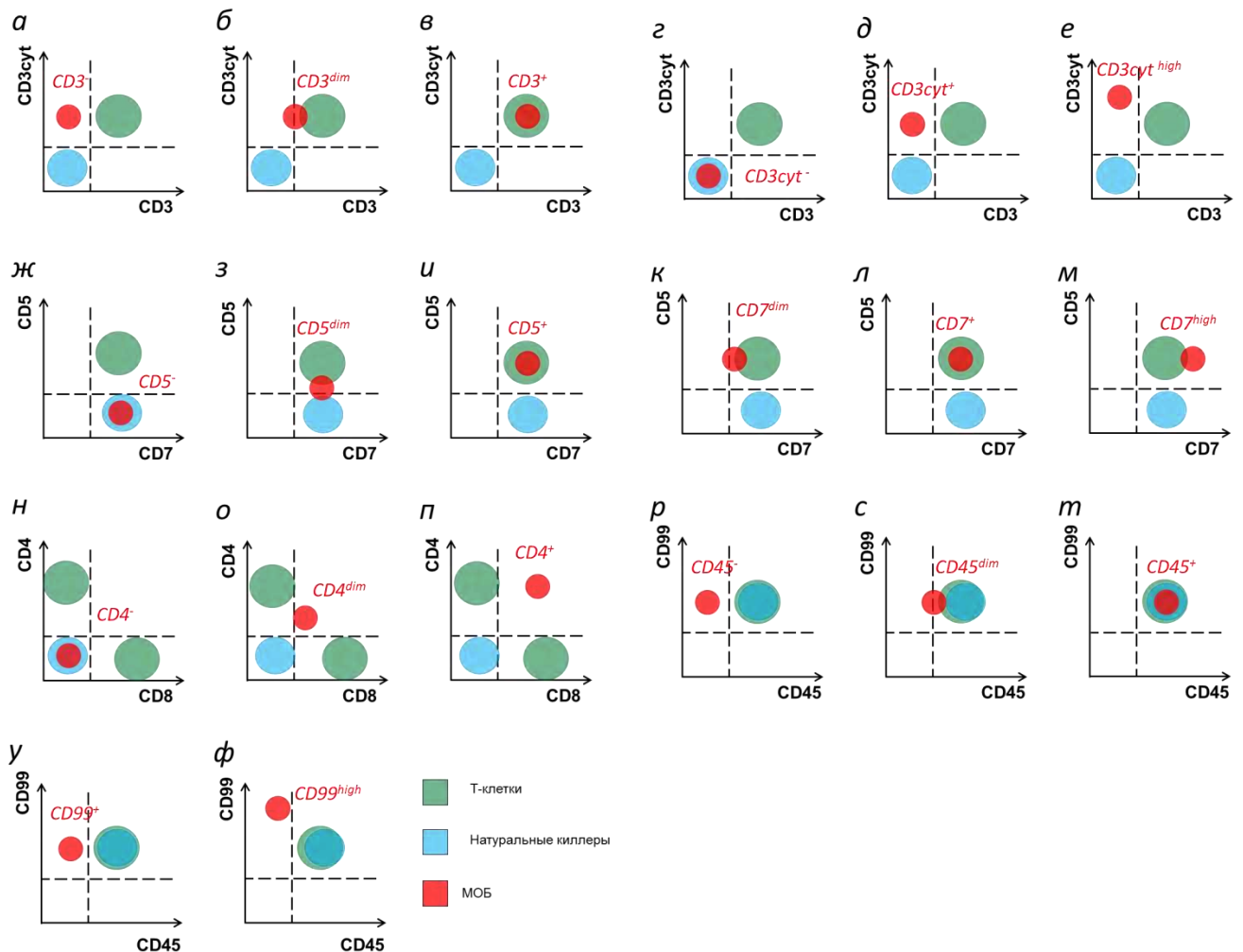


Рисунок 4 – Примеры схематического расположения $CD7^+$ клеток: зрелых Т-клеток, натуральных киллеров и остаточных опухолевых клеток. Описание иммунофенотипа остаточных опухолевых клеток в представленных случаях: *а* – отсутствие поверхностной экспрессии CD3; *б* – слабая поверхностная экспрессии CD3; *в* – наличие поверхностной экспрессии CD3; *г* – отсутствие

цитоплазматической экспрессии CD3; δ – наличие цитоплазматической экспрессии CD3; e – высокая плотность цитоплазматической экспрессии CD3; $ж$ – отсутствие экспрессии CD5; $з$ – слабая экспрессия CD5; $и$ – наличие экспрессии CD5; $к$ – слабая экспрессия CD7; $л$ – наличие экспрессии CD7; $м$ – высокая плотность экспрессии CD7; $н$ – отсутствие экспрессии CD4; $о$ – слабая плотность экспрессии CD4; $п$ – наличие экспрессии CD4; $р$ – отсутствие экспрессии CD45; $с$ – слабая плотность экспрессии CD45; $т$ – наличие экспрессии CD45; $у$ – наличие экспрессии CD99; ϕ – высокая плотность экспрессии CD99

3.5. Цитометрическое исследование основных субпопуляций лимфоцитов

Подготовку образцов проводили по стандартной методике «окрашивание-лизис»: 20-50 мкл цельной венозной крови окрашивали коммерческой смесью антител (Multitest™ 6-Color TBNK, Beckton Dickinson, США). Исследование осуществляли методом МПЦ с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (Beckton Dickinson, США). В результате анализа устанавливали долю следующих субпопуляций от лимфоцитов: Т-клетки ($CD45^+CD3^+$), Т-хэлперы ($CD45^+CD3^+CD4^+$), цитотоксические Т-лимфоциты – ЦТЛ ($CD45^+CD3^+CD8^+$), НК ($CD45^+CD3^-CD16^+CD56^+$), В-клетки ($CD45^+CD3^-CD19^+$). Для определения абсолютного количества лимфоцитов и их субпопуляций использовали двухплатформенный метод с подсчетом абсолютного количества лейкоцитов с помощью геманализатора Abacus Junior (Diatron, Венгрия). В качестве референсного интервала для основных субпопуляций лимфоцитов были выбраны данные, опубликованные в исследовании С.В. Хайдукова с соавторами [12].

3.6. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6, R 3.6.3 и IBM SPSS v.23 (США).

Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для непарных одиночных сравнений применяли критерий Манна-Уитни или парный непараметрический критерий Вилкоксона. Количественные данные в тексте указаны в виде: среднего значения \pm стандартная ошибка среднего или медиана (интерквартильный размах). Сравнение качественных признаков (доля МОБ-позитивных случаев) осуществлялось с помощью точного критерия Фишера.

Анализ общей и безрецидивной выживаемости, а также вероятность развития рецидива выполняли по методу Каплана-Мейера. Вероятность достижения МОБ-негативного статуса у больных ОЛЛ оценивали с помощью право-лево цензурированных оценок Турнбула [87].

Для вычисления порогового значения МОБ выполняли модифицированный ROC-анализ – «ROC survival» с учетом безрецидивной выживаемости больных [86]. В нашем исследовании чувствительность метода МПЦ практически совпадала с пороговым значением МОБ. Пороговое значение МОБ – это расчетный показатель, определенный статистическим методом, и это количественное значение лейкоэмических клеток, которое разделяет больных на две группы в зависимости от вероятности развития рецидива: высокая и низкая вероятность. Традиционные методы ROC-анализа (сокращение от «receiver operating characteristic», рабочая характеристика приёмника) для установления порога не использовали, поскольку целевая переменная представляет собой непрерывный числовой признак – время до события, т.е. длительность ремиссии, и часть наблюдений были цензурированы. Следовательно, был применен новый подход с использованием модифицированного ROC-анализа – «ROC survival» с учетом безрецидивной выживаемости. Данный вид анализа включает математическую оценку оптимального порога и двух типов ошибок на основе данных МОБ [86].

Кластерный анализ остаточных опухолевых клеток, выявленный у больных ОЛЛ на 70-й день по протоколу «ОЛЛ-2016» выполнен с помощью метода «ward.D» пакета «dendextend» в R 3.6.3. Для этого качественное описание

иммунофенотипа опухолевых клеток преобразовывали в числовой эквивалент – вес:

- 1) отсутствие экспрессии – вес «1» ;
- 2) частично-положительная экспрессия – вес «2»;
- 3) слабая экспрессия – вес «3»;
- 4) частично-негативная – вес «4»;
- 5) наличие экспрессии – вес «5»;
- 6) высокая плотность экспрессии – вес «6».

Влияние клиничко-лабораторных факторов на выживаемость больных ОМЛ оценивали с помощью однофакторного анализа (регрессия Кокса) с последующим пошаговым многофакторным анализом.

В разделе исследования посвященном определению иммунного статуса после алло-ТГСК сравнение количеств субпопуляций лимфоцитов между контрольными точками выполняли с помощью метода ANOVA (сокращение от «ANalysis Of VAriance», дисперсионный анализ) с поправкой на множественные сравнения Тьюки для переменных с нормальным распределением или с помощью критерия Краскелла-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения Данна для переменных с ненормальным распределением. На графиках данные представлены в виде «ящиков с усами» по методу Тьюки (линия в середине ящика – медиана; границы ящика - 25-й и 75-й процентиля; верхний «ус» равен сумме 75-го перцентиля и 1,5-кратного межквартильного расстояния (если это значение больше наибольшего, то ус устанавливался на максимуме), значения, больше этого, отображаются в виде точек; нижний «ус» равен разнице 25-го перцентиля и 1,5-кратного межквартильного расстояния (если это значение меньше наименьшего, то «ус» останавливается на минимуме), значения, меньше этого, отображаются в виде точки).

ROC-анализ проводили для определения диагностической значимости значений лейкоцитов и субпопуляций лимфоцитов в отношении наличия повторной госпитализации. ROC-анализ регоспитализаций, произошедших в промежутке от +3 до +6 мес. производили на основании значений

субпопуляционного состава лимфоцитов, определенных на +3 мес., регоспитализаций в промежутке от +6 до +9 мес. - значений субпопуляционного состава лимфоцитов, определенных на +6 мес., регоспитализаций в промежутке от +9 до +12 мес. - на основании значений субпопуляционного состава лимфоцитов, определенных на +9 мес. Диагностически значимым параметр признавали при показателе AUC (сокращение от англ. «area under the curve», площадь под ROC-кривой) более 0,5 при p-уровне значимости менее 0,05.

С помощью ROC-анализа в полученных диагностически значимых параметрах вычисляли порог, относительно которого определяли вероятность повторной госпитализации методом Каплана-Мейера (за начало отсчета принимали +3 мес., +6 мес. и +12 мес., соответственно для интервалов регоспитализаций с +3 мес. по +6 мес., с +6 мес. по +9 мес. и с +9 мес. по +12 мес.). В качестве события учитывался только факт повторной госпитализации. Дата смерти и дата последнего контакта цензурировались. Сравнение кривых проводили с помощью логрангового критерия.

Звездочками на рисунках указывали наличие достоверных отличий между группами пациентов: **** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$.

Статистический анализ проведен совместно с сотрудниками информационно-аналитического отдела ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России под руководством начальника отдела к.т.н. Куликова С.М.

Глава 4. Результаты и их обсуждение

4.1. Анализ костного мозга здоровых доноров, разработка стратегии гейтирования для десятицветной проточной цитометрии

4.1.1. Мониторинг МОБ при В-линейном остром лимфобластном лейкозе

Гейтирование при анализе МОБ начинали с выделения всех CD19⁺ клеток. Гейт ставится с учетом экспрессии CD19 и низких показателей бокового светорассеяния (SSC – side scatter) (Рисунок Б1 в Приложении Б). В выделенный регион попадают гематогоны всех стадий созревания, зрелые В-клетки, плазматические клетки и опухолевые клетки, если они имеются. Затем анализируют диаграммы всех CD-антигенов, антитела против которых содержатся в панели. На Рисунке 5 показаны диаграммы, полученные при анализе КМ здорового донора с помощью МПЦ, показывающие все CD19-положительные (CD19⁺) клетки.

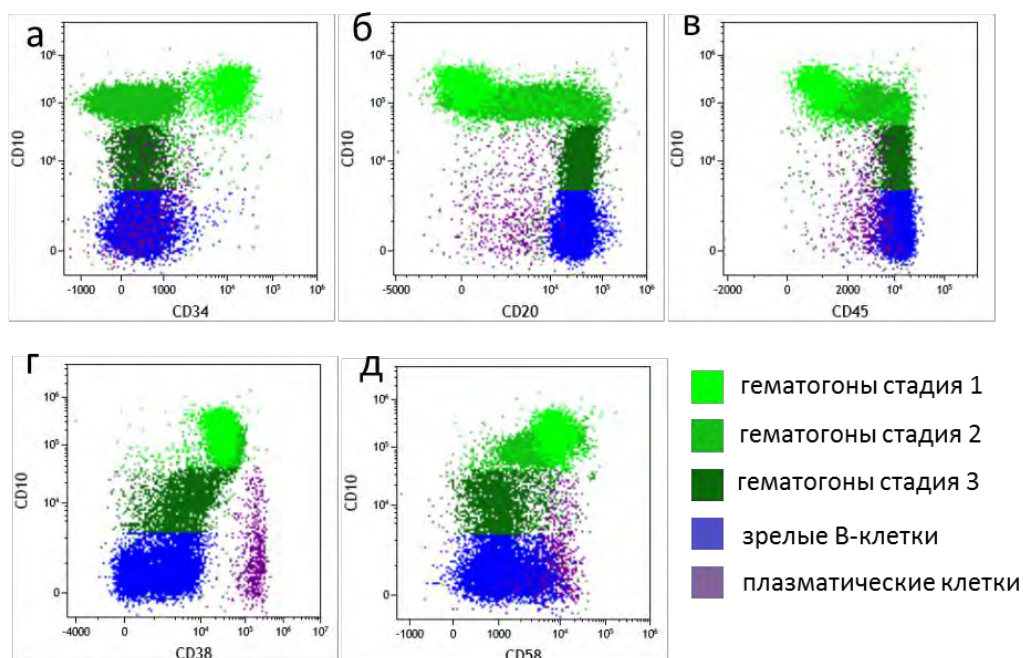


Рисунок 5 – Цитометрические диаграммы, полученные при анализе костного мозга донора стволовых клеток крови, отображающие CD19-положительные клетки: а – CD34 и CD10; б – CD20 и CD10; в – CD38 и CD10; г –

CD58 и CD10. Данные получены на проточном цитометре CytoFlex, 10-цветный анализ

Все гематононы на Рисунке 5 обозначены зеленым цветом. Самые незрелые гематононы относятся к стадии 1 и экспрессируют на своей поверхности CD34, CD10, CD38 и CD58 (Рисунок 5 (а-д)). На их поверхности отсутствует CD20, а CD45 слабо экспрессирован. Содержание этих клеток в норме составляет 0,01%-4,06% от всех ядродержащих клеток [118]. При переходе к стадии 2 гематононы полностью теряют экспрессию CD34, а экспрессия CD10 и CD58 снижается (Рисунок 5(а,д)), экспрессия CD45 и CD38, наоборот, повышается (Рисунок 5(в,г)). На части гематононов 2-ой стадии экспрессирован CD20 (Рисунок 5 (б)). В норме доля этих клеток составляет 0,05–29,59% от всех ядродержащих клеток [118]. Как видно, количество этих клеток сильно варьирует и описана зависимость их количества от возраста: у детей В-клеток и гематононов больше, чем у взрослых [118]. Наиболее зрелая стадия гематононов – стадия 3 – характеризуется низкой экспрессией CD10, наличием CD20, более низкой экспрессией CD38 и высокой – CD45 [7; 160; 202].

Зрелые В-клетки обозначены на Рисунке 5 синим цветом. На них не экспрессируется CD10, CD38 может быть слабо экспрессирован, а CD20 и CD45 высоко экспрессированы. Наиболее дифференцированная стадия В-клеток – это плазматические клетки, которые обозначены на Рисунке 5 фиолетовым цветом. Они имеют наибольшую плотность экспрессии CD38, высокую экспрессию – CD58, экспрессия CD45 ниже по сравнению со зрелыми В-клетками, а CD20 на них не обнаруживаются (Рисунок 5 (б-г)). Иногда можно обнаружить популяцию плазмобластов – промежуточную стадию между зрелыми В-клетками и плазматическими клетками. Плазмобласты имеют невысокую экспрессию CD38, не экспрессируют CD20, а CD45 экспрессирован на них также как на лимфоцитах [7; 160; 197; 202].

Иммунофенотип опухолевых клеток отличается у разных больных, а также на фоне проводимой терапии у ряда больных может измениться антигенный

профиль aberrантных клеток. В приложении Б, на Рисунке Б1 показано несколько случаев МОБ. Для наглядности также представлены диаграммы только с нормальными CD19⁺ клетками КМ (Рисунок Б1 (а–д) в Приложении Б). В первом случае обнаружена популяция аномальных клеток (выделены красным цветом) с гиперэкспрессией CD10 и CD58 и отсутствием CD38 (Рисунок Б1 (е–к)). Во втором случае популяция остаточных опухолевых клеток по сравнению с нормальными предшественниками имеет более высокую экспрессию CD34 и более низкую – CD10 и CD38 (Рисунок Б1 (л–п)). В третьем случае популяция МОБ характеризуется наличием на бластных клетках CD34 при отсутствии CD10 и CD38 (Рисунок Б1 (р–ф)). В первом случае наиболее удобной диаграммой для выделения опухолевых клеток является CD10 против CD38, а во втором и третьем случае – CD10 против CD34. Таким образом, иммунофенотип опухолевых клеток рассмотренных случаев сильно различается между собой и отличается от иммунофенотипа нормальных предшественников В-клеток. Так как в панель моноклональных антител было включено антитело к CD22, то возможность определения остаточных aberrантных клеток в случае последующей, вне протокола, таргетной терапии моноклональными антителами анти CD19 или анти CD22 также реализуема (Приложение А).

Нередко после проведения высокодозной химиотерапии или после выполнения алло-ТГСК на фоне интенсивной регенерации клеток КМ может наблюдаться увеличение количества иммунофенотипически нормальных В-клеточных предшественников (Рисунок Б1 (р–ф)). В-клеточные предшественники имеют морфологию бластных клеток, а обнаружение в миелограмме более 5% таких клеток может быть интерпретировано как рецидив острого лейкоза. Выполнение иммунофенотипического исследования методом МПЦ позволяет выяснить природу этих бластных клеток и исключить рецидив. После окончания интенсивной регенерации КМ количество В-клеточных предшественников приходит в норму, и в миелограмме определяется нормальное количество бластных клеток. Поэтому пункцию КМ для оценки МОБ рекомендуют выполнять при восстановленных показателях периферической крови.

4.1.2 Мониторинг МОБ при T-линейном остром лимфобластном лейкозе

При анализе МОБ гейтирование обычно начинают с выделения всех CD7⁺ клеток с низким показателем бокового светорассеяния. В данный регион попадают зрелые T-клетки, НК, клетки со слабой экспрессией CD7 – субпопуляции ранних миелоидных и лимфоидных предшественников, субпопуляция плазмцитоидных дендритных клеток (ПДК), а также опухолевые клетки в МОБ-положительных образцах [186].

Мы считаем целесообразным не ограничиваться гейтированием только CD7⁺ клеток, а объединить их со всеми клетками с цитоплазматической экспрессией CD3. Это может помочь в случаях, когда опухолевые клетки не экспрессируют или слабо экспрессируют CD7.

Имунофенотипическая характеристика нормальных CD7⁺ и/или CD3^{cyt}⁺ клеток подробно представлена на Рисунке 6. Выделенные CD7⁺ и/или CD3^{cyt}⁺ клетки можно рассмотреть на диаграмме, отображающей поверхностную экспрессию CD3 против внутриклеточной экспрессии CD3 (iCD3 – сокращением от «intracytoplasmic CD3» – внутрицитоплазматическая экспрессия CD3). На этой диаграмме можно выделить 4 группы клеток: CD3^{cyt}⁺CD3⁺, CD3^{cyt}⁺CD3⁻, CD3^{cyt}⁻CD3⁻ и CD3^{cyt}⁻CD3⁺ (Рисунок 6 (а)). Клетки с иммунофенотипом CD3^{cyt}⁺CD3⁺ представляют собой зрелые T-клетки, они характеризуются наличием экспрессии CD2, CD5, высокой плотностью CD45, что хорошо представлено на Рисунке 6 (д-п). На небольшой части нормальных T-клеток экспрессия CD7 может отсутствовать. Часть T-клеток может экспрессировать CD56, образуя субпопуляцию так называемых T-НК-клеток (Рисунок 6 (б, ж,)). На диаграмме CD4 против CD8 T-клетки образуют несколько кластеров: CD4⁺ (T-хэлперы), CD8⁺ (цитотоксические T-клетки), CD4⁺CD8⁺ (дубль-положительные T-клетки) и CD4⁻CD8⁻ T-клетки (дубль-негативные T-клетки), которые на Рисунке 6 (е) выделены бирюзовым цветом. Дубль-негативные T-клетки в основном

представлены субпопуляцией Т-клеток с $\gamma\delta$ -вариантом Т-клеточного рецептора, они также могут иметь слабую экспрессию CD8, слабую – CD5 и высокую – CD3.

Клетки с поверхностной экспрессией CD3, но негативные по цитоплазматическому маркеру CD3 в норме появляются вследствие дефектов пробоподготовки (недостаточная пермеабиллизация мембран клеток и некачественное окрашивание цитоплазматического антигена). Чаще всего они оказываются зрелыми Т-клетками или так называемым дебрисом, т.е. погибшими клетками или клеточными элементами (Рисунок 6 (a)). Тем не менее, при разборе этой группы клеток стоит быть особенно внимательным и рассмотреть расположение событий этого гейта на других диаграммах.

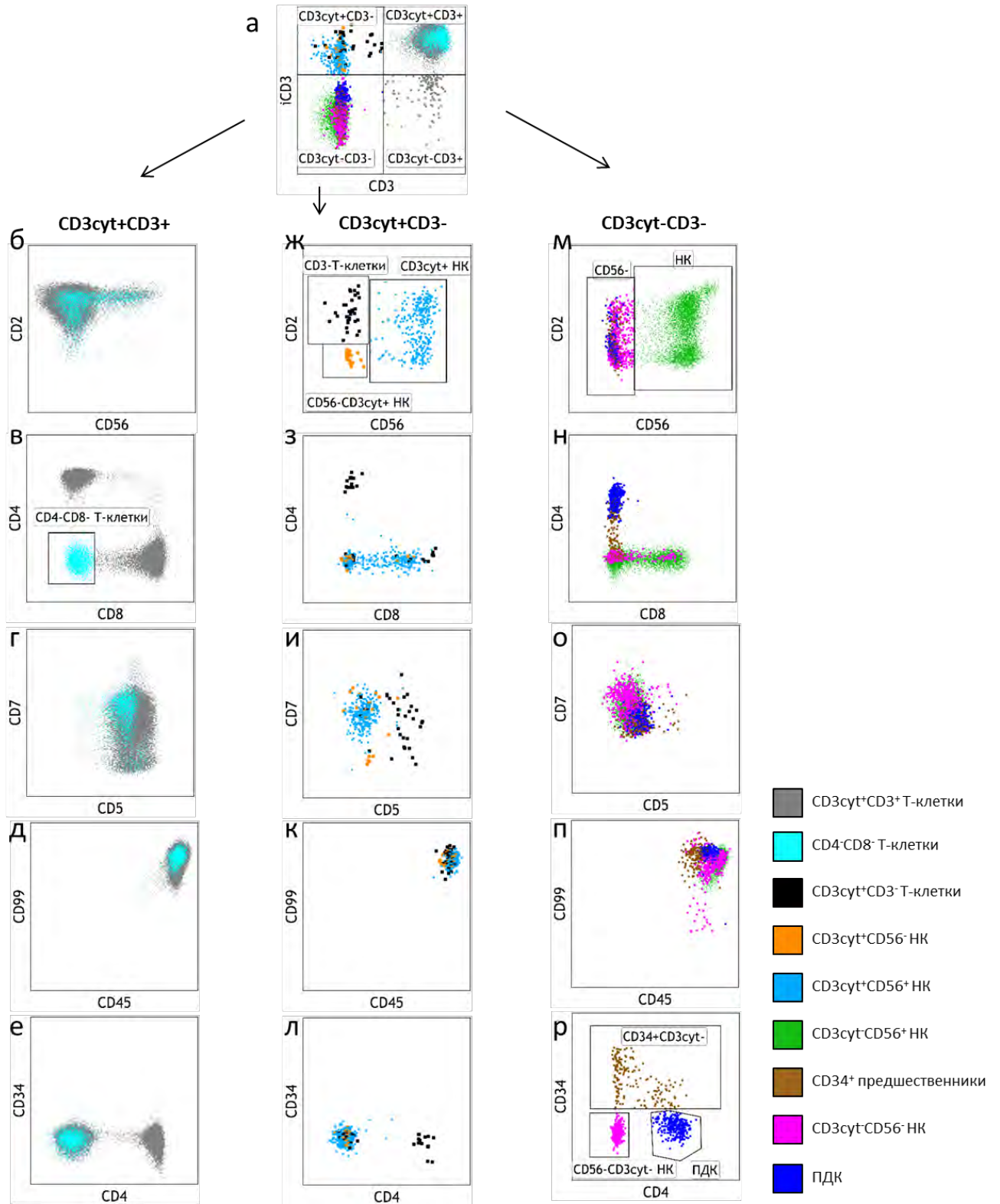


Рисунок 6 – Цитометрический анализ $CD7^+$ и/или $CD3cyt^+$ клеток костного мозга донора стволовых клеток крови: *а* – $CD7^+$ и/или $CD3cyt^+$ клетки на диаграмме, отображающей поверхностную и внутриклеточную экспрессию антигена CD3; *б–е* – диаграммы, показывающие клетки с поверхностной и внутриклеточной экспрессией CD3; *ж–л* – диаграммы, показывающие клетки

только с внутриклеточной экспрессией CD3 без поверхностной экспрессии CD3; *m-p* – диаграммы, показывающие клетки без внутриклеточной и поверхностной экспрессии антигена CD3. Данные получены на проточном цитометре CytoFlex, 11-цветный анализ.

Клетки, экспрессирующие CD7, но не имеющие ни поверхностную, ни внутриклеточную экспрессию CD3, могут быть НК, ранними предшественниками и ПДК. НК могут быть определены по экспрессии CD56 (на Рисунке 6 (*m*) выделены зеленым цветом). Большая часть НК на своей поверхности экспрессирует CD2, хотя в норме обнаруживается и популяция НК без CD2 [92]. НК могут экспрессировать CD8, но экспрессия CD5 отсутствует, а плотность экспрессии CD45 - высокая (Рисунок 6 (*n-n*)). Также в регионе CD3⁻CD3^{cyt} можно обнаружить CD34⁺CD56⁻ популяцию, которая соответствует ранним предшественникам (на Рисунке 6 (*p*) выделены коричневым цветом). На этих клетках отсутствуют маркеры CD8, CD5, плотность экспрессии CD45 – более низкая, а CD99 – более высокая по сравнению со зрелыми НК и Т-клетками. Клетки с иммунофенотипом CD7^{dim}CD3⁻CD3^{cyt}CD34⁻CD4⁺CD8⁻CD5⁻ вероятнее всего соответствуют ПДК (на Рисунке 6 (*p*)). ПДК имеют такую же экспрессию CD99 как зрелые НК и Т-клетки, а экспрессия CD45 на них более низкая [98]. Клетки, выделенные на Рисунке 6 (*p*) розовым цветом, не экспрессируют ни CD56, ни CD34, ни CD4, однако они частично позитивны по CD8, и являются субпопуляцией CD56-негативных НК.

Клетки, имеющие цитоплазматический маркер CD3, но не экспрессирующие его поверхностно, считаются “подозрительными” и требуют дальнейшего изучения, так как по иммунофенотипу могут соответствовать как тимическим предшественникам Т-клеток, так и опухолевым клетками. Однако и в этом регионе в норме есть клетки (Рисунок 6(a)). Большинство клеток из этого региона являются НК с наличием ε-цепи CD3. Такие клетки экспрессируют CD56, не экспрессируют CD5 и частично позитивны по маркеру CD8 (на Рисунке 6 (*ж*) выделены голубым цветом). Также можно обнаружить CD56-негативные НК (на

Рисунке 6 (ж) выделены оранжевым цветом), которые не отличаются от CD56-позитивных НК по экспрессии других маркеров. Оставшиеся клетки на Рисунке 6 ж выделены черным цветом. Наиболее вероятно, они соответствуют зрелым Т-клеткам, так как экспрессируют CD2, CD5, или CD4, или CD8, а экспрессия CD99 и CD45 у них не отличается от зрелых CD3⁺ Т-клеток (Рисунок 6 (ж-л)). Скорее всего, отсутствие поверхностной экспрессии маркера CD3 на них является артефактом и возникает вследствие дефектов пробоподготовки, что встречается и в других исследованиях [186].

На Рисунке Б2 Приложения Б показано несколько примеров обнаружения МОБ методом проточной цитометрии. В данном случае, для простоты описания, гейтирование начинается с выделения всех CD7-позитивных клеток. На Рисунке Б2 (а) показан цитометрический анализ клеток костного мозга здорового донора. Синим цветом во всех случаях выделены зрелые Т-клетки, зеленым – CD7-позитивные клетки, которые не являются зрелыми Т-клетками (НК, предшественники гемопоэза и ПДК). На Рисунках Б2 (е-ф) показаны примеры выявляемой МОБ. Опухолевые клетки выделены красным цветом. В первом случае опухолевые клетки имеют высокую экспрессию CD7 и цитоплазматического маркера CD3, но не имеют поверхностной экспрессии CD3. Доказательствами того, что эти клетки не относятся к НК, является отсутствие CD56, частичная позитивность по CD4, высокая экспрессия CD99 и сниженная – CD45 (Рисунок Б2 (е-к)). Во втором случае опухолевые клетки имеют не только внутриклеточную, но и слабую поверхностную экспрессию CD3. Также эти клетки экспрессируют с высокой плотностью CD4 и CD99 (Рисунок Б2 (л-п)). В третьем случае бластные клетки лежат в регионе CD3⁻CD3^{cyt}⁺, но они дважды негативны по антигенам CD4 и CD8, а небольшая часть из них экспрессирует CD56 (Рисунок Б2 (р-ф)).

Метод выявления МОБ у больных Т-ОЛЛ является не стандартизованным, а пробоподготовка и цитометрический анализ сложны в выполнении, поскольку: 1. включает дополнительный этап пермеабиллизации мембран, 2. необходимо окрашивание цитоплазматического маркера, 3. имеется вероятность появления

дополнительного дедрикса и неспецифического окрашивания, 4. требуется знание этапов нормальной дифференцировки и созревания Т-клеток, чтобы исключить ложноположительные заключения.

4.1.3 Мониторинг МОБ при остром миелоидном лейкозе

Отслеживание МОБ при ОМЛ представляет собой более трудную задачу по сравнению с детекцией МОБ при ОЛЛ. 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.

Для анализа МОБ у больных ОМЛ должна использоваться такое сочетание моноклональных антител, которое позволит выделить клетки основных миелоидных ростков гемопоэза и изучить стадии их созревания. Обычно остаточные опухолевые клетки при анализе ожидают обнаружить в так называемом бластном регионе – области, ограничивающей часть клеток с низкой экспрессией CD45 и низким показателем бокового светорассеяния. В бластный регион попадают нормальные CD34⁺ ранние предшественники, гематопоны, промиелоциты, часть миелоцитов и зрелых нейтрофилов, эритроидные предшественники, базофилы, ПДК, промоноциты, тучные клетки и часть лимфоцитов [209].

Для того чтобы дифференцировать все эти клетки и обнаружить среди них популяцию МОБ, мы провели гейтирование, при котором последовательно изучаются и исключаются уже проанализированные клетки (Рисунок 7).

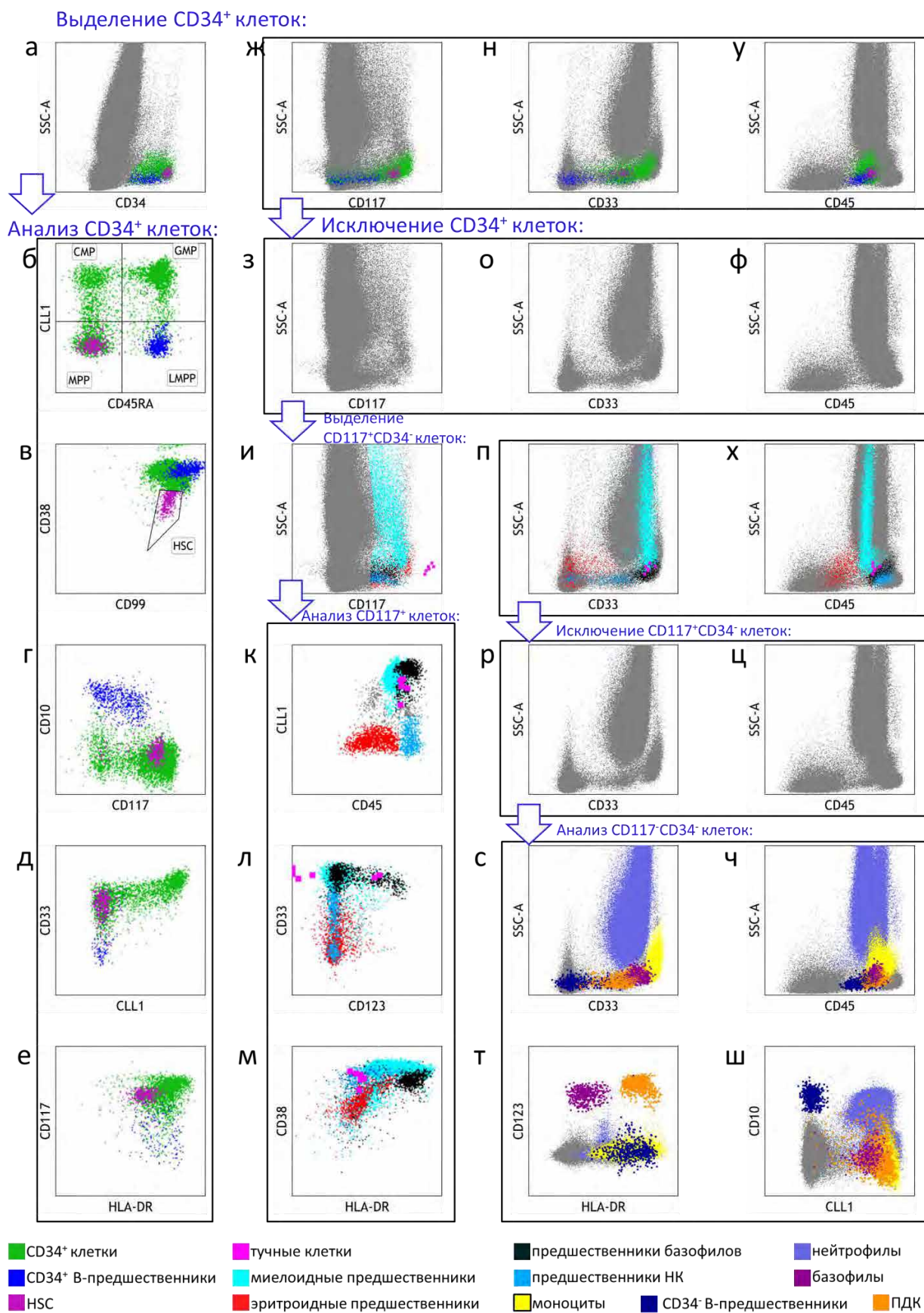


Рисунок 7 – Цитометрический анализ основных клеточных компонентов костного мозга донора стволовых клеток крови. Данные получены на проточном цитометре CytoFlex, 11-цветный анализ.

На первом этапе мы выделяли все CD34⁺ клетки. Эта популяция в норме небольшая и у взрослых составляет не более 2-2,5% от всех клеток костного мозга, но при этом является довольно гетерогенной. Так с помощью антигена CD19 и/или CD10 можно определить популяцию нормальных CD34⁺ В-предшественников (гематогоны стадии 1), которая на Рисунке 7 (а–е) выделена синим цветом. Эта популяция характеризуется наличием экспрессии CD38, HLA-DR, CD45RA, CD99 и отсутствием миелоидных маркеров CD13, CD33, CD117, CD371 (CLL-1 или CLEC12A). Не В-клеточные предшественники выделены зеленым цветом и среди них можно определить несколько субпопуляций разной степени зрелости. Так, по маркерам CD45RA, CLL-1 и CD123 можно выделить четыре основные субпопуляции CD34⁺ клеток: общие миелоидные предшественники (ОМП) (common myeloid progenitors, CMP), гранулоцитарно-макрофагальные предшественники (ГМП) (granulocyte-macrophage progenitors, GMP), лимфоидные мультипотентные предшественники (ЛМП) (lymphoid-primed multipotential progenitors, LMPP) и мультипотентные предшественники (МПП) (multipotential progenitors, MPP) (Рисунок 7 (б)). Среди MPP клетки с наиболее низкой экспрессией CD38 образуют популяцию истинных гемопоэтических предшественников (hematopoietic stem cells, HSC) (Рисунок 7 (в)) [23; 79; 138; 175]. Интересно, что HSC имеют более высокую плотность CD45, хотя они самые незрелые из всех CD34⁺ стволовых клеток крови (Рисунок 7 (г)). Расположение нормальных CD34⁺ клеток на диаграммах других миелоидных и линейно-неограниченных антигенов показано на Рисунке Б3 в приложении А. Более зрелые CD34⁺ клетки могут начинать экспрессировать CD15 и даже CD11b (Рисунок Б3 (з, д)), при этом они продолжают оставаться CD117-позитивными, плотность экспрессии CD34 в процессе дифференцировки на них снижается, а CD33 – увеличивается. Лимфоидные антигены CD19, CD2, CD7 и CD56 присутствуют на нормальных CD34⁺ предшественниках, соответствующие диаграммы показаны на Рисунке Б4 в Приложении Б. При мониторинге МОБ полагаться только на обнаружение CD34⁺ клеток с лимфоидными антигенами

недопустимо, и необходимо обращать внимание, образуют ли кластер эти клетки, как на их поверхности экспрессированы другие маркеры (например, CD45, CD33, CD34, HLA-DR и др.), и насколько эта экспрессия соотносится с нормальными CD34⁺ клетками.

После анализа CD34⁺ клеток с использованием специального программного обеспечения, для анализа цитометрических данных можно исключить все CD34⁺ клетки (Рисунок 7 (з, о, ф)). После этого из оставшихся клеток мы рекомендуем выделить все CD117⁺ клетки (Рисунок 7 (u)). Большую часть из них составляют миелоидные предшественники (выделены голубым цветом на Рисунке 7 (u–м, n, x)), среди них можно различить промиелоциты, которые не экспрессируют HLA-DR и предшественники моноцитов, которые экспрессируют HLA-DR. Другой крупной популяцией CD117⁺ клеток являются эритроидные предшественники (на Рисунке 7 (u–м, n, x) выделены красным цветом). Среди CD117⁺ клеток также можно обнаружить предшественники базофилов, которые CD123-частичнопозитивны, экспрессируют миелоидные маркеры и HLA-DR (на Рисунке 7 (u–м, n, x) выделены черным цветом). Также в изучаемом CD117⁺ регионе можно обнаружить клетки со слабой экспрессией CD117 и CD33, отсутствием CD13, CLL-1 и высокой плотностью экспрессии CD45, которые вероятно соответствуют предшественникам НК (на Рисунке 7 (u–м, n, x) обозначены светло-синим цветом), что подтверждается наличием на их поверхности CD7 [68]. По нашему опыту особенно много таких клеток у больных после алло-ТГСК, что связано с интенсивной регенерацией НК – популяцией, восстанавливающейся быстрее остальных лимфоцитов. У больных после химиотерапии может обнаруживаться большое количество тучных клеток, которые имеют наиболее высокую плотность экспрессии CD117, высокий показатель бокового светорассеяния, экспрессируют миелоидные маркеры и HLA-DR-негативны. Предшественники тучных клеток имеют низкий показатель бокового светорассеяния, а по экспрессии CD117- самые яркие. На Рисунке 7 (u–м, n, x) тучные клетки и их предшественники выделены розовым цветом.

Более детальный анализ расположения $CD117^+CD34^-$ миелоидных и эритроидных предшественников представлен в Приложении Б. Миелоидные предшественники имеют на поверхности маркеры CD13, CD33, CLL-1, CD38, CD99 и частично могут приобретать CD11b. Эритроидные предшественники не экспрессируют CD13, CD33, CLL-1, и лишь очень небольшая часть из них может быть HLA-DR-слабопозитивной (Рисунок Б5). $CD117^+CD34^-$ клетки практически не имеют на своей поверхности антиген CD19, а маркеры CD7, CD56 и CD2 экспрессируются в достаточно большом количестве. $CD7^+/CD56^+ /CD2^+CD117^+CD34^-$ клетки формируют несколько субпопуляций, которые, вероятно, соответствуют предшественникам НК, ПДК и базофилов (Рисунок Б6).

После анализа CD117-позитивных клеток мы рекомендуем их исключить и рассмотреть оставшиеся клетки (Рисунке 7 (*p, y*)). Основную часть из них будут составлять нейтрофилы разной степени зрелости. Они имеют высокий показатель бокового светорассеяния и средний уровень экспрессии CD33, а экспрессия антигенов CD11b, CD16, CD10 и CD45 будет увеличиваться по мере их созревания. Клетки с наибольшей плотностью CD33 образуют популяцию промоноцитов и моноцитов (выделены желтым цветом на Рисунке 7 (*c, m, ч, ш*)). По мере созревания на поверхности моноцитов увеличивается плотность экспрессии CD11b, CD14 и уменьшается HLA-DR. На части этих клеток обнаруживается высокая экспрессия CD16. Минорными популяциями, обнаруживаемыми среди CD117-негативных клеток в бластном регионе, являются базофилы, ПДК и гематогаоны. Базофилы и ПДК характеризуются наличием CD123. Отличием ПДК от базофилов является более высокая экспрессия CD123, более низкая экспрессия CD33 и наличие HLA-DR. На рисунке 5 базофилы выделены фиолетовым цветом, а ПДК – оранжевым. CD34-негативные гематогаоны, обнаруживаются по высокой экспрессии CD10 (выделены темно-синим цветом на Рисунке 7 (*c, m, ч, ш*)).

В приложении Б показаны несколько примеров детекции МОБ у больных ОМЛ. На Рисунках Б6 и Б7 показаны случаи $CD34^+$ остаточных опухолевых клеток, причем последовательность диаграмм такая же, как на Рисунке Б3, где

отображены нормальные клетки здорового донора. В первом случае у больного после проведения 1-го курса химиотерапии среди анализируемых CD34⁺ клеток обнаружены нормальные миелоидные предшественники, которые на Рисунке А6 отображены зеленым цветом, В-клеточные предшественники отсутствуют, при этом определена довольно большая популяция аномальных клеток, выделенных красным цветом. Клетки этой популяции имеют асинхронную коэкспрессию CD11b на CD34⁺ клетках (Рисунок Б6 (д)), при отсутствии CD117, HLA-DR и низкой экспрессии CD38 (Рисунок Б6 (б, ж)). Интересно, что на этой популяции частично экспрессирован CD10 (Рисунок Б6 (л)) и можно их перепутать с В-клеточными предшественниками. Доказательством того, что эти клетки не являются В-клеточными предшественниками, является наличие на них миелоидных маркеров CD13, CLL-1 и CD33 (Рисунок Б6 (в, з)).

Во втором случае у больного ОМЛ после 2-х курсов химиотерапии обнаруживается популяция аномальных CD34⁺ клеток, которые по иммунофенотипу ближе всего к мультипотентным стволовым клеткам (MPP) (Рисунок Б7 (з)). Эта популяция преобладает среди всех CD34⁺ клеток, а В-клеточные предшественники отсутствуют, так же как в предыдущем случае. Опухолевые клетки имеют низкую экспрессию CD38, HLA-DR, CD33, а экспрессия CD13 на них отсутствует (Рисунок Б7 (б, в, ж)).

В последнем примере показан случай детекции МОБ среди CD117⁺CD34⁻ клеток у больной ОМЛ в 1ПР, готовившейся к выполнению алло-ТГСК (Рисунок Б8). Последовательность диаграмм такая же, как на Рисунке А5, где отображены нормальные клетки здорового донора. Отличием опухолевых клеток от нормальных миелоидных предшественников явилось отсутствие HLA-DR, сниженная экспрессия CD13, при этом клетки обладают яркой экспрессией CD33 и CD99, а также частично позитивны по маркеру CD123 (Рисунок Б8 (б, в, е, з)).

Таким образом, детекция МОБ у больных ОМЛ является одной из самых непростых задач, стоящих перед специалистом по проточной цитометрии. Анализ цитометрических данных требует экспертного знания иммунофенотипа всех клеточных компартов КМ. Вследствие того, что опухолевые клетки при ОМЛ

могут быть гетерогенны и значительно различаться у разных больных, а иммунофенотип их иногда незначительно отличается от нормальных клеточных аналогов, необходим многоцветный анализ, а именно ≥ 8 -10-цветный.

4.2. Анализ используемых наборов моноклональных антител

Применяемая для анализа МОБ у больных В-ОЛЛ 6-цветная панель включала антитела против всех минимально необходимых для анализа МОБ CD-антигенов (Таблица А1). К недостаткам 6-цветной панели можно отнести отсутствие антитела против CD45 во второй пробирке, а также необходимость полного пересмотра панели, если больному проводили терапию анти-CD19 препаратами. Этому недостатку полностью лишены 9-ти и 10-цветные сочетания антител, которые включали CD22 и CD24, что упрощало мониторинг МОБ после применения блинатумомаба. Также эти панели включали дополнительные реагенты: Syto41 – нуклеотропный краситель, позволяющий окрасить все ядродержащие клетки, или 7-AAD – краситель, позволяющий исключать нежизнеспособные клетки (Таблица А2). Эти реагенты позволяют уменьшить количество возможных артефактов, нередко возникающих при анализе.

Недостатком 6-цветной панели для анализа МОБ у больных Т-ОЛЛ являлось отсутствие маркеров НК, таких как CD56, CD16, что затрудняло дифференцировку МОБ и CD3^{cut}⁺ НК. Пробирка с маркером CD1a не давала никакой дополнительной информации, а для анализа преимущественно использовались первые две пробирки (Приложение А, Таблица А1). С конца 2019-го года мы начали использовать 11-цветный анализ. Подобранный панель выгодно отличалась от 6-цветной, так как позволяла более подробно изучить состав CD7⁺ клеток КМ. Однако недостатком ее явилось не оптимально подобранные пары антитело-флуорохром. Вследствие этого было подобрано новое сочетание моноклональных антител, которое позволило улучшить анализ экспрессии изучаемых антигенов (Приложение А, Таблица А2).

Общим принципом при составлении панелей для мониторинга МОБ у больных ОМЛ явилось то, что некоторые антигены (CD7, CD19, CD56, CD2, CD4, CD11a) исследуются лишь в случае их информативности, определяемой при анализе первичного иммунофенотипа бластных клеток, изученного до начала терапии ОМЛ (например, если бластные клетки экспрессировали CD56 в дебюте заболевания, то и после терапии нужно анализировать CD56, а не CD2, экспрессии которого изначально на бластных клетках не было).

С 2016-го по 2018-ый гг. применяли 6-цветную панель, состоящую из 4 пробирок, которая имела несколько недостатков: недостаточно четкое отделение CD34-позитивной популяции, антитело против CD117 присутствовало только в одной пробирке, поэтому не было возможности выполнить детальный анализ CD117⁺ клеток, анализ промоноцитов и моноцитов так же не был достаточно глубоким, кроме того отсутствовали маркеры для отделения ПДК и базофилов (Таблица А1). С 2019-ый по 2020-ый гг. мы обновили 6-цветную панель, которая стала включать 6 пробирок. Мы поменяли антитело против антигена CD34 (конъюгат с флуорохромом фикоэритрин-цианин 7 на конъюгат с флуорохромом алофикоцианин), 4 из 6 пробирок содержали антитела против CD34 и CD117, в результате анализ незрелых предшественников был более детальным. Также мы подобрали сочетания моноклональных антител для анализа моноцитов, базофилов и ПДК. Но в такой панели сложно было анализировать ранние клетки и более зрелые клетки одновременно, поскольку технические характеристики цитометра позволяли нам исследовать только 6 цветов одновременно. С 2020-го года мы начали применять 11-цветную панель, которая на данном этапе исследования удовлетворяет требованиям международных рекомендаций и может рассматриваться как оптимальная (Таблица А2).

4.3. Кинетика остаточных опухолевых клеток у больных острыми лимфобластными лейкозами, включенных в протокол «ОЛЛ-2016»

Мониторинг МОБ в лечении острых лейкозов преследует две основные цели: оценка ответа на терапию, что становится критерием выбора терапевтической тактики, и раннее обнаружение рецидива заболевания на этапе поддерживающего лечения. В зависимости от заболевания этап мониторинга до получения эффекта от лечения может длиться до 3-4 мес. Этап мониторинга по оценке сохранения ремиссии и контроля признаков рецидива начинается, соответственно, от момента получения ремиссии и может длиться неограниченно долго в соответствии с рекомендованным временным регламентом. Как будет показано далее, цель мониторинга МОБ на разных этапах существенным образом влияет на временной регламент лабораторных измерений, цену ошибки оценки МОБ-статуса, алгоритм решения, выбор порога и т.д.

В этом разделе мы рассмотрим основные особенности мониторинга МОБ у больных ОЛЛ на этапе индукции и консолидации с целью оценки динамики ответа на терапию и прогноза долгосрочных результатов лечения.

Первый вопрос, который нас будет интересовать – это характеристики динамики регресса опухолевого клона, его численные оценки, зависимости их от варианта ОЛЛ и т.д.

Кинетика МОБ отражает биологические свойства лейкемических клеток, их чувствительность к применяемым цитостатическим и биологическим препаратам, и зависит от интенсивности терапии. Определение МОБ выполняли только в ПР на дни +36 (индукция I), +70 (индукция II), +105 (консолидация II), +133 (консолидация III), +162 (консолидация IV), +190 (консолидация V) и на протяжении поддерживающей терапии протокола «ОЛЛ-2016» (Таблица 7). Схема протокола в Приложении Б (Рисунок Б9). К началу поддерживающей терапии большинство больных, включенных в протокол «ОЛЛ-2016» находилось в МОБ-негативном статусе (91,4 %).

Таблица 7 – Дни оценки МОБ у больных ОЛЛ в ПР, включенных в протокол «ОЛЛ-2016»

Вариант ОЛЛ	+70 день	+133 день	+190 день	поддерживающая терапия
В (n=102)	95	81	78	36
Т (n=84)	78	71	59	35
Смешанно-клеточный (n=8)	7	6	6	0

Мы сопоставили частоты достижения МОБ-негативности по данным международных протоколов терапии ОЛЛ (Рисунок 8). Индукционный этап терапии по протоколу «GMALL» (German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia) [81] немецкой группы исследователей сравним по интенсивности цитостатического воздействия с протоколом «ОЛЛ-2016», и к концу индукции доля МОБ-негативных больных В-ОЛЛ, включенных в протокол «GMALL» (день 71), составила 68,6 % [81], а в «ОЛЛ-2016» (день 70) – 60,4 %. При лечении же импульсными высокодозным курсами по программе «hyperCVAD» (hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin (Adriamycin), dexamethasone) [158], применяемой в MD Anderson Cancer Center, к 90-му дню терапии у 93 % пациентов была достигнута МОБ-негативная ремиссия заболевания [158]. Протокол «GMALL» включает высокодозные курсы консолидации, но доля пациентов с МОБ-негативным статусом в этом периоде сопоставима с результатами, полученными на протоколе «ОЛЛ-2016» (доля МОБ-негативных больных В-ОЛЛ после консолидации по протоколу «GMALL» составила 70%, а по протоколу «ОЛЛ-2016» – 68,6%) [81]. Однако результаты определения МОБ зависят не только от протокола лечения, но и от метода детекции остаточных опухолевых клеток, его чувствительности и специфичности. Среди представленных данных на Рисунке 8 только в исследованиях «PETHEMA ALL-AR-03 Trial» (The Programa Español de Tratamientos en Hematología) [161] и «hyperCVAD» использовался метод МПЦ, а в остальных – ПЦР. И если сравнить показатели МОБ, определяемой только методом МПЦ, то к 16-19-й неделе

терапии доля МОБ-негативных больных на протоколе ОЛЛ-2016 была сопоставима с протоколом испанской группы «PETHEMA ALL-AR-03 Trial» (85,3% и 86%) [161] и на 24-27 неделе – с программой «hyperCVAD» (91,4% и 96% соответственно) [158], несмотря на отсутствие блоков высокодозной консолидации.

Таким образом, при наличии различий между протоколом «ОЛЛ-2016» (низкая интенсивность воздействия, непрерывность лечения) 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

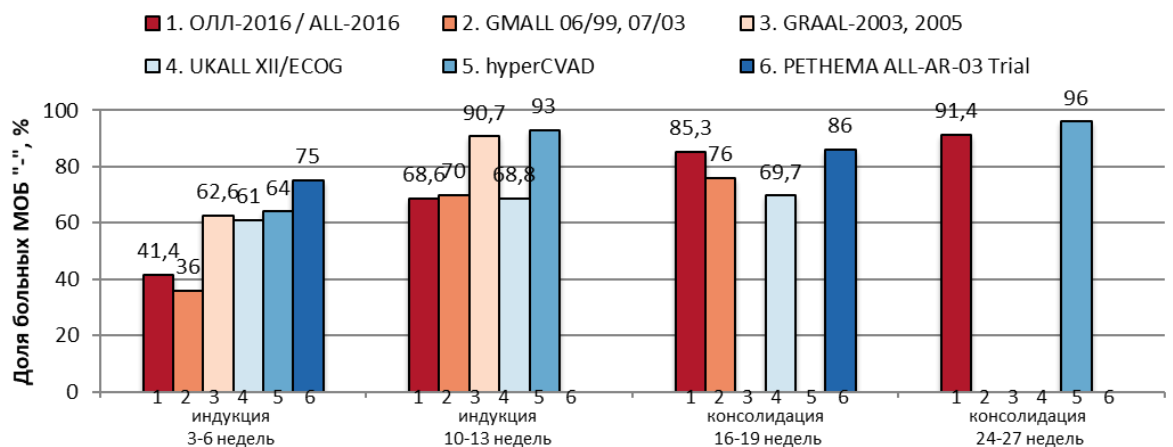


Рисунок 8 – Группы клинических исследований и частоты достижения МОБ-негативного статуса у взрослых больных острым лимфобластным лейкозом (GMALL – German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia [81]; GRAAL – Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia [22]; UKALL XII/ECOG – United Kingdom arm of the international ALL trial XII/ Eastern Cooperative Oncology Group [143], PETHEMA – The Programa Español de Tratamientos en Hematología [161])

Описание динамики МОБ с помощью вычисления доли больных, достигших МОБ-негативного статуса на разных сроках от начала терапии не позволяет

ответить на вопрос о том, отличается ли динамика ответа на терапию у больных Т-ОЛЛ и В-ОЛЛ. Поэтому далее мы попробовали проанализировать динамику МОБ, опираясь на исходные числовые измерения доли опухолевых клеток и используя интервальные оценки времени достижения МОБ-негативного статуса.

Для анализа возможности использования количества опухолевых клеток в качестве индикатора ответа на терапию были проанализированы значения МОБ в зависимости от времени. У больных ОЛЛ, вошедших в протокол «ОЛЛ-2016», было выполнено 974 исследований МОБ на разных сроках терапии: 491 исследование у больных В-ОЛЛ и 442 – у больных Т-ОЛЛ.

Здесь возможны два варианта «привязки» измерения МОБ к моменту времени: использование условного времени контрольной точки или использование реальной даты взятия биологического материала для измерения МОБ. Фактический день протокола не всегда соответствует реальным (календарным) дням лечения (Рисунок 9).

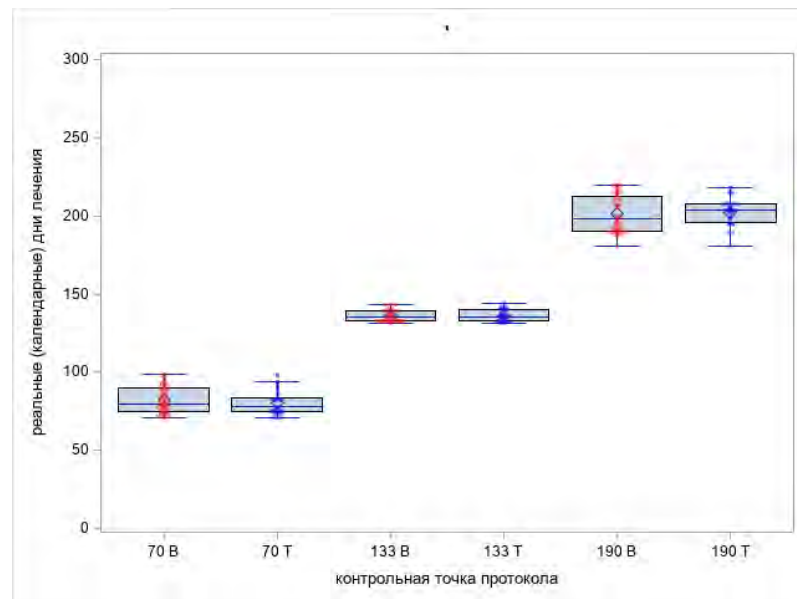


Рисунок 9 – Сопоставление контрольных дней протокола «ОЛЛ-2016» и реальных (календарных) дней лечения больных В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ, в которые выполнялось исследование МОБ

У части больных исследование МОБ на +70, +133 и +190 дни протокола было выполнено позже, чем календарные 70-й, 133-й и 190-й дни лечения. Так,

медиана времени исследования МОБ в конце индукции составила 78 дней, медиана времени исследования МОБ в конце консолидации III составила 134 дня, а в конце консолидации IV – 196,5 дней. Значимых отличий в реальных (календарных) днях исследования МОБ у больных В- и Т-ОЛЛ не было.

В связи тем, что реальные сроки выполнения исследования отличаются от дней протокола, динамику значений МОБ изучали с использованием как реальной временной шкалы (время от даты начала терапии до взятия образца), так и с использованием номера условной контрольной точки (+70, +133 и +190 день протокола).

Таблица 8 – Сопоставление контрольных дней протокола и реальных дней лечения

Дни протокола	Реальные дни лечения, медиана (диапазон)
+70 день	78 (71-99)
+133 день	134 (131-144)
+190 день	196,5 (181-220)

После оценки соотношения реальных и календарных дней контрольных точек исследований МОБ был проанализирован клиренс аберрантных опухолевых клеток в течение терапии. Для анализа усредненных динамик значений МОБ был использован аппарат регрессионного анализа. Для более наглядного графического представления и более надежных статистических оценок динамических параметров нулевое значение МОБ было заменено на $\frac{1}{2}$ чувствительности. В качестве целевой переменной использовался десятичный логарифм доли (процент) аберрантных клеток. В точке начала терапии за значение МОБ был принято количество бластных клеток в пунктате костного мозга в дебюте заболевания.

На Рисунках 10 и 11 приведены результаты регрессионного анализа (с учетом повторных измерений) динамики показателей МОБ для больных, достигших полной ремиссии на 70 день протокола. На Рисунке 10 изображены индивидуальные кривые динамики больных В-ОЛЛ (красный цвет) и Т-ОЛЛ

(синий цвет) и соответственно, жирные линии – усредненные регрессионные линии в группах В-ОЛЛ (красный цвет) и Т-ОЛЛ (синий цвет). Значение МОБ уменьшается ($p < 0,0001$), и расчеты показывают, что клиренс (угол наклона) регрессионных прямых в группах В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ отличаются не существенно ($p = 0,11$).

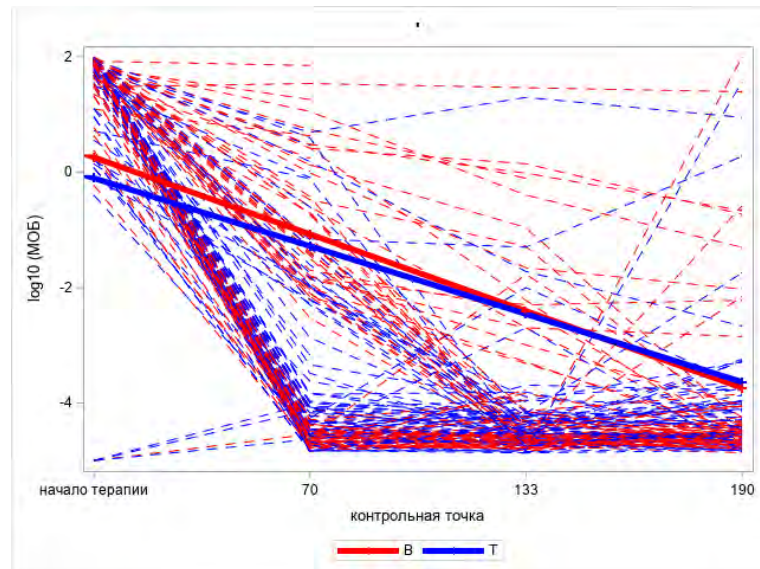


Рисунок 10 – Индивидуальные динамики изменения уровня МОБ для больных, достигших полной ремиссии на +70 день протокола, и усредненные регрессионные зависимости от контрольной точки по протоколу

В дальнейшем мы выполнили анализ с использованием реальной временной шкалы, т.е. точных дат проведения измерений МОБ (Рисунок 11). Дате начала терапии соответствует нулевая точка. Так же как и на Рисунке 10 здесь красные линии соответствуют группе больных В-ОЛЛ, синие – Т-ОЛЛ. Результат этого анализа полностью аналогичен анализу в условной временной шкале, различий в клиренсе МОБ у больных с В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ не выявлено ($p = 0,23$).

Этот анализ позволяет также оценить значение клиренса МОБ. В среднем значение МОБ, как для В-ОЛЛ, так и для Т-ОЛЛ, снижается примерно на 3 десятичных логарифма за первые 100 дней.

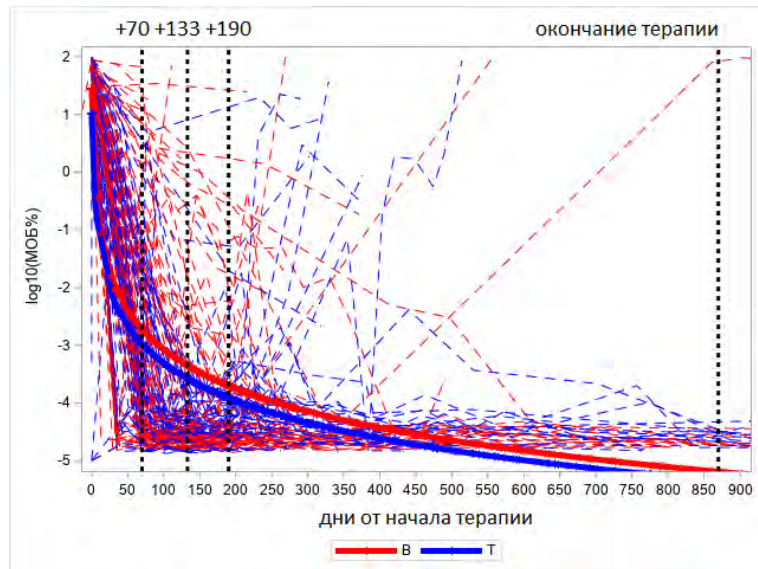


Рисунок 11 – Индивидуальные динамики изменения показателей МОБ и усредненные регрессионные зависимости от реального измерения времени. МОБ уменьшается в течении терапии ($p < 0,0001$), но не обнаружено статистически достоверных отличий в динамике МОБ в зависимости от варианта ОЛЛ ($p < 0,23$). Дате начала терапии соответствует нулевая точка

Таким образом, как в анализе с условной временной шкалой, так и при использовании реальных дат не было обнаружено достоверных отличий в клиренсе опухолевой массы в зависимости от варианта острого лейкоза на терапии по протоколу «ОЛЛ-2016».

Как видно при визуальном анализе индивидуальных кривых динамики, группы больных не однородны по характеру снижения МОБ. Присутствуют две суб-фракции: больные, у которых относительно быстро (к 70-му дню) достигаются низкие значения МОБ, и больные с медленной динамикой.

Для демонстрации гетерогенности исследуемой популяции опухолевых клеток у больных ОЛЛ по отношению к динамике клиренса опухолевой массы мы разделили больных В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ на группы, у которых достигнут и не достигнут показатель МОБ 0,01% в контрольной точке +70 день, и проанализировали динамику МОБ после 70 дня.

На Рисунке 12 изображена динамика МОБ после 70-го дня у больных В-ОЛЛ в группах, у которых достигнут низкий показатель МОБ на +70 день $\leq 0,01\%$

(синие линии) и не достигнут $> 0,01\%$ (красные линии). Из Рисунка 12 видно, что для В-ОЛЛ с низким значением МОБ ($\leq 0,01\%$) к 70-му дню дальнейшее уменьшение МОБ замедляется. В группе МОБ₇₀ $> 0,01\%$ после 70-го дня снижение МОБ продолжается. Клиренс – примерно 3 логарифма за 900 дней (2,5 года).

В-ОЛЛ

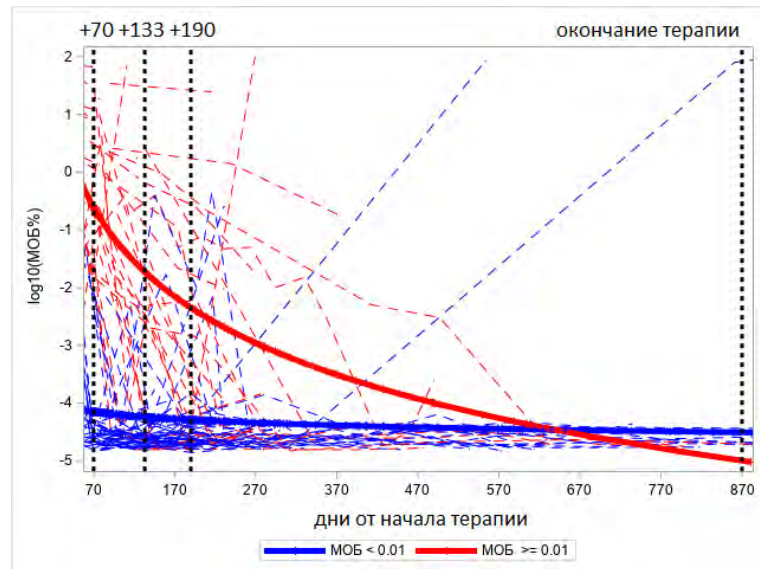


Рисунок 12 – Динамика МОБ после +70 дня у больных В-ОЛЛ в группах, достигших низкого уровня МОБ₇₀ $\leq 0,01\%$ (синие линии) и не достигших низкого уровня МОБ₇₀ $> 0,01\%$ (красные линии)

На Рисунке 13 изображена динамика МОБ после 70-го дня у больных Т-ОЛЛ в группах, у которых достигнуты низкие значения МОБ₇₀ $\leq 0,01\%$ (синие линии) и не достигнуты $> 0,01\%$ (красные линии). Из Рисунка 13 видно, что аналогично В-ОЛЛ, у больных Т-ОЛЛ с МОБ менее $0,01\%$ к 70-му дню дальнейшая динамика МОБ существенно замедляется. Однако в отличие от В-ОЛЛ в группе МОБ₇₀ $> 0,01\%$ после 70 дня у больных Т-ОЛЛ снижение МОБ остается медленным – порядка 1,1 логарифма за 900 дней (2,5 года).

Т-ОЛЛ

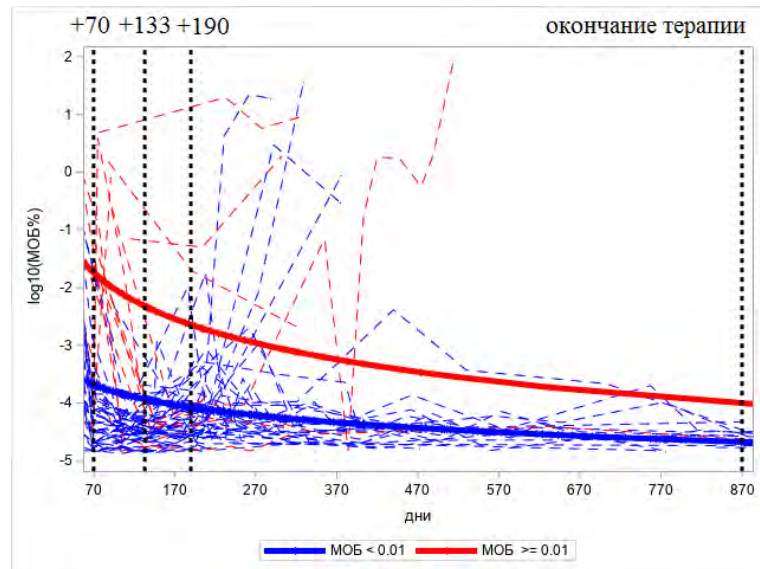


Рисунок 13 – Динамика МОБ после +70-го дня у больных Т-ОЛЛ с низкими значениями $МОБ_{70} \leq 0,01\%$ (синие линии) и $МОБ_{70} > 0,01\%$ (красные линии)

Состав групп больных в разные временные интервалы мониторинга МОБ-статуса меняется (Таблица 9). Это происходит в силу естественных причин: смерти пациентов, часть пациентов просто еще не дожили до контрольных точек, а также есть пропуски в данных.

Таблица 9 – Доля больных ОЛЛ на+70, +133, +190 дни протокола с МОБ-позитивным или -негативным статусом

Вариант ОЛЛ	+70 день	+133 день	+190 день
В	n=95 МОБ+ 37 (39%) МОБ- 58 (61%)	n=81 МОБ+ 14 (17%) МОБ- 67 (83%)	n=78 МОБ+ 10 (13%) МОБ- 68 (87%)
Т	n=78 МОБ+ 18 (23%) МОБ- 60 (74%)	n=71 МОБ+ 5 (7%) МОБ- 66 (93%)	n=59 МОБ+ 4 (7%) МОБ- 55 (93%)
смешанноклеточный	n=7 МОБ+ 2 (29%) МОБ- 5 (71%)	n=6 МОБ+ 0 МОБ- 6 (100%)	n=6 МОБ+ 0 МОБ- 6 (100%)

Поэтому простой частотный анализ не является адекватным способом анализа динамики МОБ. Вместо частотного анализа в заданных временных интервалах можно использовать аппарат событийного анализа. Однако интервалы между определением МОБ-статуса, во-первых, достаточно большие, а во вторых – неодинаковые. Поэтому вместо традиционных лево-цензурированных оценок Каплана-Майера удобнее и более корректно использовать интервальные (право-лево цензурированные оценки Турнбула) [87]. С использованием аппарата интервальных оценок были получены вероятности достижения МОБ-негативного статуса для больных В- и Т-ОЛЛ (Рисунок 14).

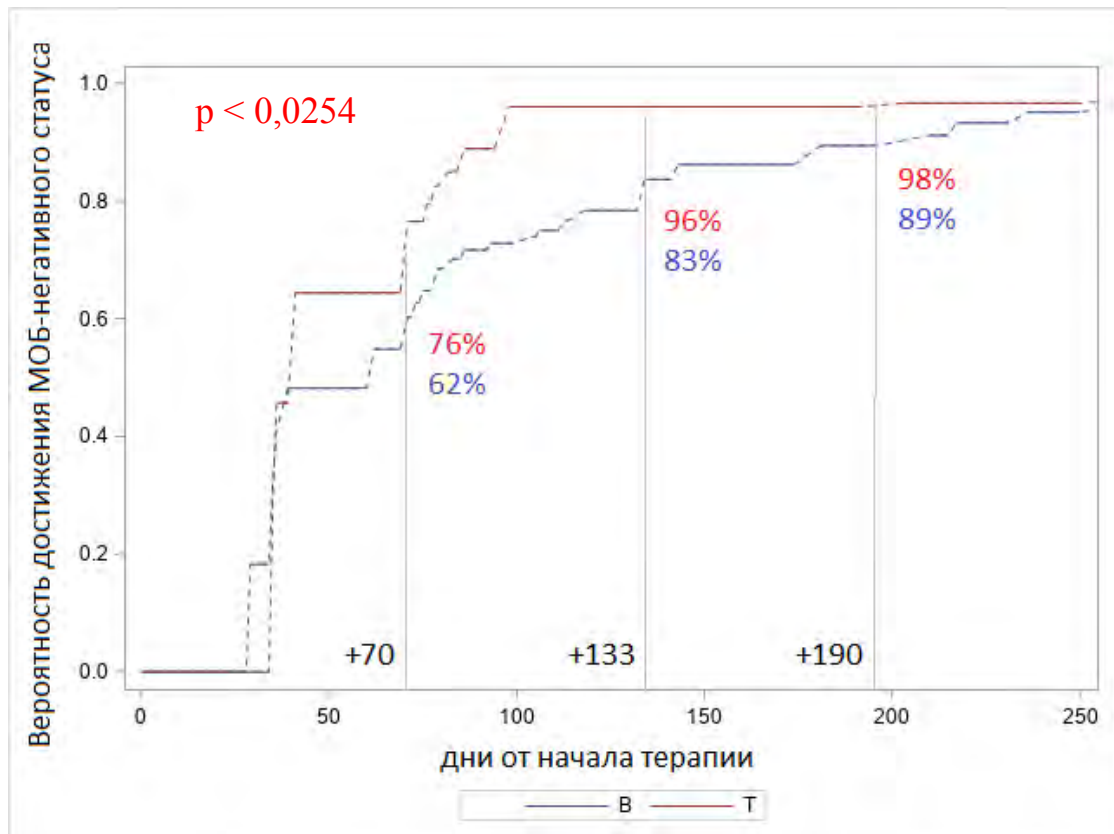


Рисунок 14 – Вероятность достижения МОБ-негативного статуса у больных В- и Т-ОЛЛ, проходящих терапию по протоколу «ОЛЛ-2016»

На 70-74-й дни вероятность достижения МОБ-негативного статуса для В-ОЛЛ составила 0,62, на 133-141-й дни – 0,83, на 181-196-й дни – 0,89. Для Т-ОЛЛ на сроке 71-75 дней вероятность достижения МОБ-негативного статуса составила 0,76, на сроке 111-132-й – 0,96, на 190 день – 0,98. Обнаружены статистически

достоверные отличия в оценках вероятности достижения МОБ-негативного статуса в зависимости от варианта острого лейкоза ($p = 0,0254$). Больные Т-ОЛЛ достигают МОБ-негативного статуса быстрее.

На этапе поддерживающей терапии протокола «ОЛЛ-2016» был выполнен мониторинг МОБ 73 больным, включающий 319 исследований МОБ: 153 исследования при В-ОЛЛ ($n=36$) и 153 – при Т-ОЛЛ ($n=35$), 13 исследований при смешанноклеточном варианте ($n=2$). Медиана количества исследований на одного больного составила 4 (диапазон 1-12 исследований), длительность мониторинга от 195 дня до 4 лет после начала терапии. Медиана времени между исследованиями одного больного составила 3,4 месяца, минимальный срок между исследованиями для одного больного составил 10 дней (повторное выполнение исследования МОБ в случае невалидных результатов), максимальный срок 18,3 месяца. У 13 больных один или более раз подтверждался МОБ⁺ статус на этапе поддерживающей терапии (Таблица 10).

Таблица 10 – Количество исследований МОБ у больных ОЛЛ после окончания индукции и консолидации

Сроки наблюдения	195-365 день (до 1 года)	365-730 день (от 1 года до 2 лет)	730-1470 день (от 2 лет до 4 лет)
Кол-во исследований	102	145	68
МОБ ⁻ кол-во исследований	88	132	63
МОБ ⁺ кол-во исследований	14	13	5
Число больных МОБ ⁺ :			
В-ОЛЛ	2	4	1
Т - ОЛЛ	4	3	1
Комментарии	3 больных - дата МОБ ⁺ совпала с датой рецидива 1 больной - МОБ ⁺ , исследование предшествовало рецидиву, 1 больной - МОБ ⁺ , исследование выполнено после рецидива, 1 больной - МОБ ⁺ , но рецидив не подтвержден	1 больной - дата МОБ ⁺ исследования совпала с датой рецидива, 2 больных - МОБ ⁺ , рецидив не констатировали, 4 больных - МОБ ⁺ , исследование выполнено после рецидива	для всех больных дата МОБ ⁺ исследования совпала с датой рецидива

Был проведен анализ оценки необходимости мониторинга МОБ на этапах поддерживающей терапии с целью более раннего выявления признаков рецидива. На Рисунке 15 на временной оси изображены результаты мониторинга МОБ и событий у больных ОЛЛ с положительным МОБ статусом на этапе поддерживающей терапии (n=13).

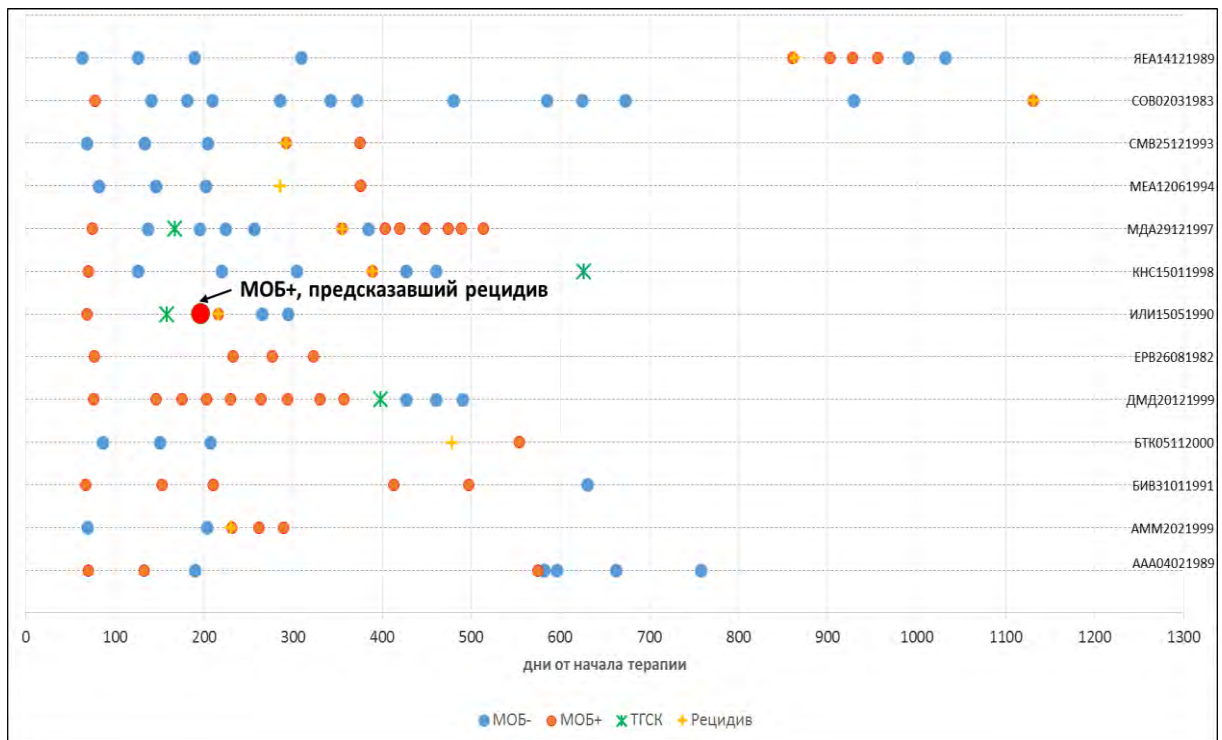


Рисунок 15 – Результаты мониторинга МОБ и события у больных ОЛЛ с положительным МОБ статусом на этапе поддерживающей терапии

Из 319 исследований МОБ, выполненных в период поддерживающей терапии (после 190 дня до окончания протокола и затем в течение 1,5 лет наблюдения после окончания терапии), только для одного больного В-ОЛЛ обнаружение МОБ положительного статуса предшествовало рецидиву (больной ИЛИ15051990, разница между датой МОБ⁺ исследования и датой рецидива после алло-ТГСК составила 3 недели), для 6 больных даты подтверждения МОБ положительного статуса совпали с датами рецидива. У 2 больных В-ОЛЛ с МОБ положительным статусом рецидив не развился на этапе поддерживающей терапии: у первого больного однократно выявляли МОБ положительный статус

(+19,2 месяцев МОБ⁺ 0,027%), у второго больного дважды определяли МОБ положительный статус (+13,7 месяцев МОБ⁺ 0,005%, +16,5 месяцев МОБ⁺ 0,003%). Таким образом, целесообразность проведенного мониторинга МОБ на отдаленных этапах терапии остается неуточненной вследствие того, что определения МОБ на поддерживающей терапии были не систематическими и выборочными. И, следовательно, возможно, более регламентированные исследования МОБ на поддерживающей терапии предоставят возможность выявить значимость мониторинга остаточных опухолевых клеток на отдаленных этапах терапии.

4.4. Мониторинг минимальной остаточной болезни для прогноза общей и безрецидивной выживаемости больных острыми лимфобластными лейкозами, включенных в протокол «ОЛЛ-2016»

На этапе оценки ответа на проводимую противоопухолевую терапию определение МОБ-статуса является необходимым для прогноза долгосрочных результатов лечения больных ОЛЛ и определения необходимости выполнения трансплантации аллогенных гемопоэтических СКК.

При проведении событийного анализа для общей выживаемости точка начала отсчета определялась в зависимости от типа проводимого анализа (от даты начала терапии или от даты мониторинга МОБ (при проведении ланд-марк анализа)). При анализе общей выживаемости временной интервал отсчитывался от даты начала отсчета до даты смерти (событие) или даты последнего контакта (цензурирование).

Для безрецидивной выживаемости точка начала отсчета определялась в зависимости от типа проводимого анализа (от даты получения ремиссии или от даты мониторинга МОБ (при проведении ланд-марк анализа)). При анализе безрецидивной выживаемости временной интервал отсчитывался от даты начала отсчета до даты первого неблагоприятного события (рецидив/смерть) или даты последнего контакта (цензурирование).

Начало исследования было инициировано 01.04.2016 г., а набор больных в диссертационное исследование закончен 31.03.2022. Общая выживаемость к 12, 24 и 48 мес. терапии у больных В-ОЛЛ составила 88%, 79% и 75%, а у больных Т-ОЛЛ – 91%, 83%, 79% соответственно (Рисунок 16).

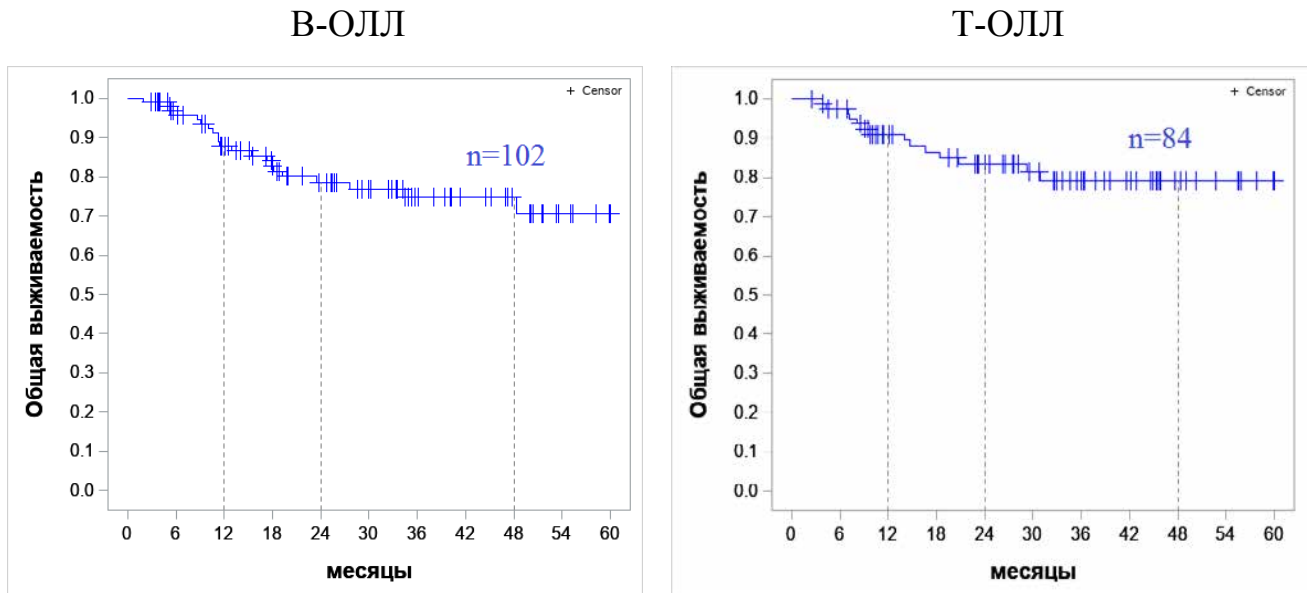


Рисунок 16 – ОВ у больных острыми В- и Т-линейными лимфобластными лейкозами, вошедших в протокол «ОЛЛ-2016»

Для установления значимости статуса МОБ на +70, +133, +190 дни протокола определяли общую и безрецидивную выживаемость. Был выполнен ланд-марк анализ и точкой отсчета для ОВ и БРВ служила контрольная точка исследования МОБ.

У больных В-линейным ОЛЛ наличие МОБ на +70 и +133 и +190 ассоциировано с показателями БРВ и ОВ (Рисунок 17). При обнаружении МОБ на +70 день оценки БРВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев от даты исследования составили 70%, 54% и 37% соответственно, в случае отсутствия МОБ – 94%, 90%, 78% соответственно, $p < 0,0001$. При обнаружении МОБ на +70 день оценки ОВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев составили 72%, 61% и 45%, в случае отсутствия МОБ 96%, 91%, 88% соответственно, $p < 0,0001$.

При обнаружении МОБ на +133 день оценки БРВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев от даты исследования составили 86%, 84% и 74%, в случае отсутствия МОБ – 92%, 84%, 48% соответственно, $p < 0,064$. При обнаружении МОБ на +133 день оценки ОВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев составили 92%, 68% и 54%, в случае отсутствия МОБ – 93%, 89%, 86% соответственно, $p < 0,0553$.

При обнаружении МОБ на +190 день оценки БРВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев от даты исследования составили 70%, 58% и 19%, в случае отсутствия МОБ – 93%, 86%, 78% соответственно, $p < 0,0323$. При обнаружении МОБ на +190 день оценки ОВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев составили 70%, 58% и 58%, в случае отсутствия МОБ 93%, 86%, 78% соответственно, $p < 0,0553$.

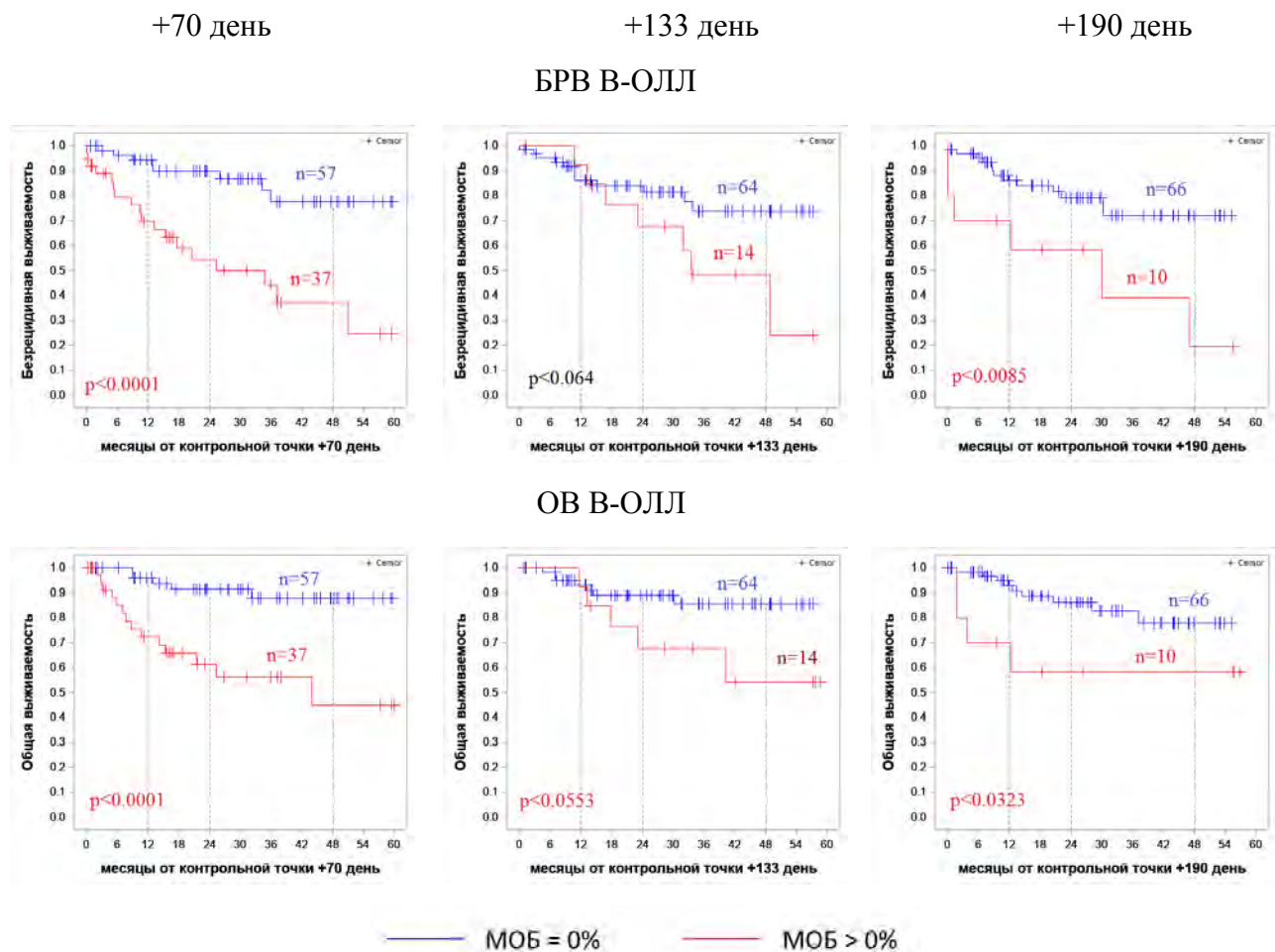


Рисунок 17 – Оценки БРВ и ОВ у больных В-ОЛЛ в зависимости от наличия МОБ в контрольные временные точки протокола «ОЛЛ-2016» (+70, +133, +190 дни).

У больных Т-линейным ОЛЛ наличие МОБ на +70 и +133 ассоциировано с показателями БРВ и ОВ (Рисунок 18). При обнаружении МОБ на +70 день оценки БРВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев от даты исследования составили 76%, 59% и 25% соответственно, в случае отсутствия МОБ – 87%, 83%, 80%, $p < 0,0025$. При обнаружении МОБ на +70 день оценки ОВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев составили 83%, 75% и 64%, в случае отсутствия МОБ – 91%, 84%, 82%, соответственно, $p < 0,163$.

На 133-й и 190-й день количество больных в группе с МОБ позитивным статусом составило менее 5 человек, но при обнаружении МОБ на +133 день оценки БРВ на сроках 12, 24 месяца от даты исследования составили 50%, 25%, в случае отсутствия МОБ 90%, 82% соответственно, $p < 0,0063$.

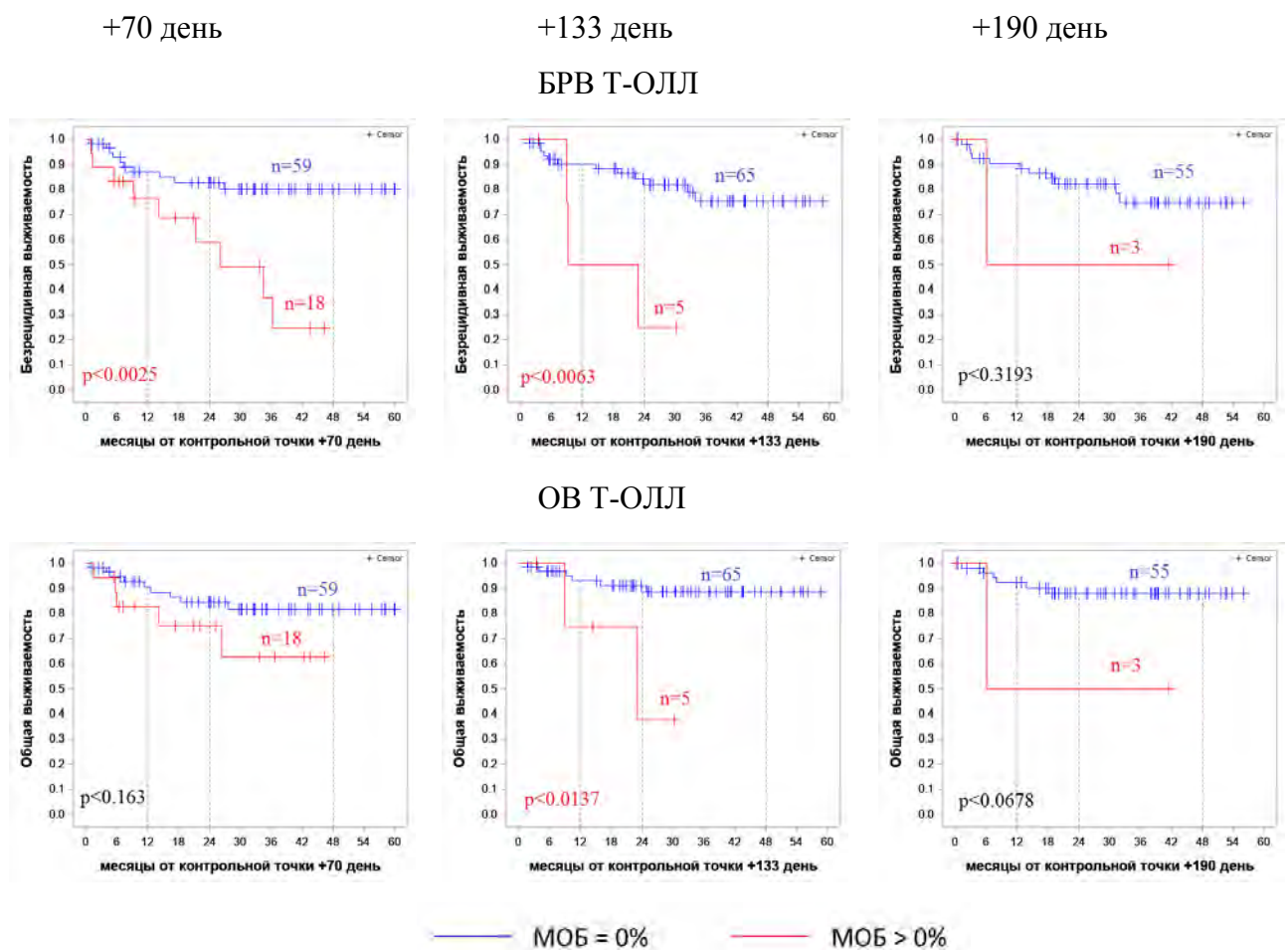


Рисунок 18 – БРВ И ОВ у больных Т- ОЛЛ в зависимости от наличия МОБ в контрольные временные точки протокола «ОЛЛ-2016» (+70, +133, +190 дни)

Представленные выше данные получены при разделении больных на две группы: больные, у которых не определялась МОБ вообще (МОБ = 0%), и больные, у которых выявлялась положительная МОБ (МОБ > 0%).

У немецкой группы исследователей индукционный этап терапии по протоколу «GMALL» [81], как было сказано, сравним по интенсивности цитостатического воздействия с протоколом «ОЛЛ-2016», и после индукции на +71 день доля МОБ-негативных больных В-ОЛЛ составила 68,6 % [81], а в «ОЛЛ-2016» (день 70) – 60,4 %. Протокол «GMALL» отличается от протокола «ОЛЛ-2016» высокодозными курсами консолидации, но МОБ-негативный статус был подтвержден для одинаковой доли больных на этапе консолидации (70% после консолидации по протоколу «GMALL» ,а по протоколу «ОЛЛ-2016» – 68,6%) [81]. В протоколе «GMALL» пятилетняя ОВ и БРВ у больных с МОБ негативным статусом на +71 день была достигнута у 79% и 63% больных соответственно.

Самые лучшие результаты были показаны на протоколе с высокодозными курсами по программе «hyperCVAD» [158], где к 90-му дню терапии у 93 % пациентов была достигнута МОБ-негативная ремиссия заболевания. Но трехлетняя ОВ и БРВ составили 70% и 65%, соответственно, у МОБ-негативных больных [158].

Остаются невыясненными следующие вопросы: есть ли дополнительная прогностически значимая информация в исходном измеренном числовом значении МОБ, является ли порог 0% оптимальным в плане минимизации ошибок клинически важных решений, следует ли изменять порог в зависимости от контрольной точки, т.е. на разных этапах терапии, какое заключение о МОБ-статусе делать при плохой чувствительности, т.е. низком количестве измеренных клеток.

Помимо поиска клинически значимого порога МОБ, необходимо оценить его соотношение с лабораторной чувствительностью измерения МОБ. Чувствительность (лабораторная) измерения МОБ – это минимальный процент опухолевых клеток в биологическом образце, которое можно уверенно идентифицировать, как остаточный лейкоэмический клон.

Чувствительность измерения МОБ в каждом конкретном тесте зависит от числа клеток в образце. В неблагоприятной ситуации, неудачной подготовке образца число клеток может снижаться до нескольких тысяч и соответственно чувствительность ухудшаться до 0,1-1%.

При низкой чувствительности измерение уровня МОБ дает фактически ответ не в виде точного числового значения, а в виде неравенства или интервальной оценки, т.е. процент лейкозных клеток меньше показателя чувствительности. Для таких случаев важно сформулировать формальное правило для заключения о МОБ-статусе. Как мы увидим далее, для этапа мониторинга ответа на терапию после индукции важнее не сделать ложного заключения о наличии МОБ, чем ошибиться при заключении об отсутствии МОБ. Поэтому при низкой чувствительности дается заключение, что значение $МОБ = 0\%$, но сопровождается оговоркой о низкой чувствительности.

Очевидно, что клинический порог МОБ не может быть ниже лабораторной чувствительности. Клинический порог – это порог, с помощью которого выносятся клинические заключения о наличии МОБ, и он определяется при минимизации ошибок ложноположительности и ложноотрицательности, а точнее при минимизации взвешенной суммы ошибок 1-го и 2-го рода, так как на разных этапах лечения цена ошибок может меняться. Остается вопрос о клинической значимости выделения группы с низким уровнем МОБ, но выше лабораторной чувствительности. Т.е. надо ли устанавливать порог при определении МОБ выше лабораторной чувствительности и если да, то на сколько.

В качестве первого этапа для установления порога МОБ мы оценивали прогностическую значимость нескольких пороговых значений по отношению к оценкам выживаемости.

Для выбора порога мы установили следующие пороговые значения МОБ на +70 день: 0,1%; 0,01% и 0,005%. В- и Т-ОЛЛ анализировали отдельно, пороговое значение 0,001% не оценивали, так как не было случаев $МОБ < 0,001\%$. Формально в группы с нулевым уровнем МОБ могут входить больные, биологические образцы которых содержали низкое количество исследуемых

клеток, т.е. характеризовались низкой лабораторной чувствительностью. Поэтому из группы МОБ-негативных больных были исключены больные, у которых числовые значения чувствительности превышали пороговые значения МОБ (т.е. исключены невалидные результаты).

На Рисунках 19 и 20 приведены оценки ОВ и БРВ в группах: $МОБ=0$, $0 < МОБ < \text{порога}$, $МОБ > \text{порога}$. Три панели рисунка (столбцы) соответствуют 3 разным значениям порогов МОБ (0,1%; 0,01% и 0,005%).

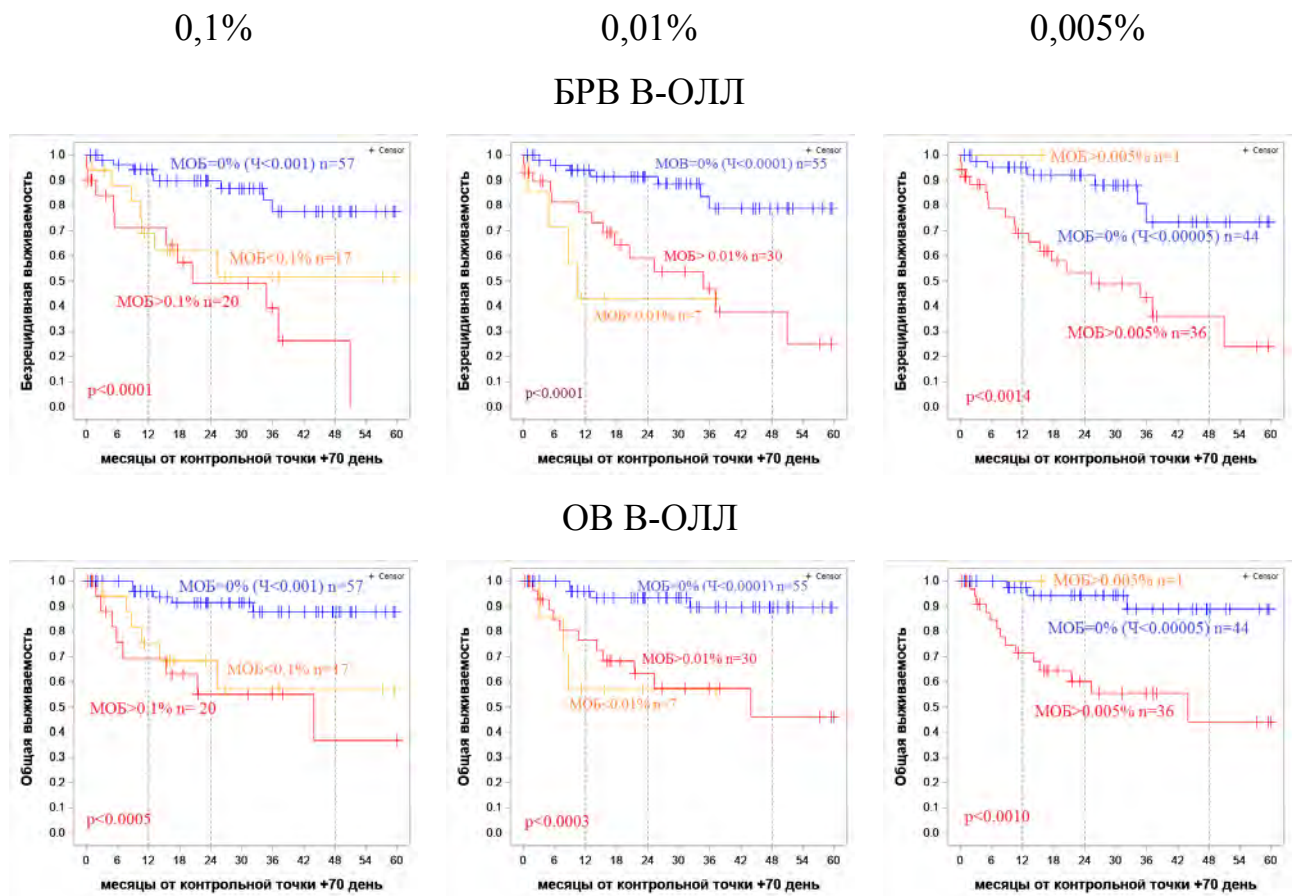


Рисунок 19 – БРВ и ОВ больных В-ОЛЛ в зависимости от величины порога МОБ на +70 день протокола

Визуальный анализ множества кривых несколько затруднен, некоторые подгруппы малочисленны и оценки выживаемостей недостаточно точны. Тем не менее достаточно уверенно можно сделать следующие выводы:

1. Выживаемость больных В-ОЛЛ с $МОБ = 0$ значительно лучше, чем у больных с $МОБ > 0$.

2. Группы: « $0 < \text{МОБ} < \text{порога}$ », « $\text{МОБ} > \text{порога}$ » мало отличимы при любом пороге выше 0. Нет очевидного смысла выделять группу с низким уровнем МОБ.

Отсюда можно сделать осторожный вывод о том, что для больных В-ОЛЛ не существует клинически релевантного порога, отличного от 0, т.е. лабораторной чувствительности.

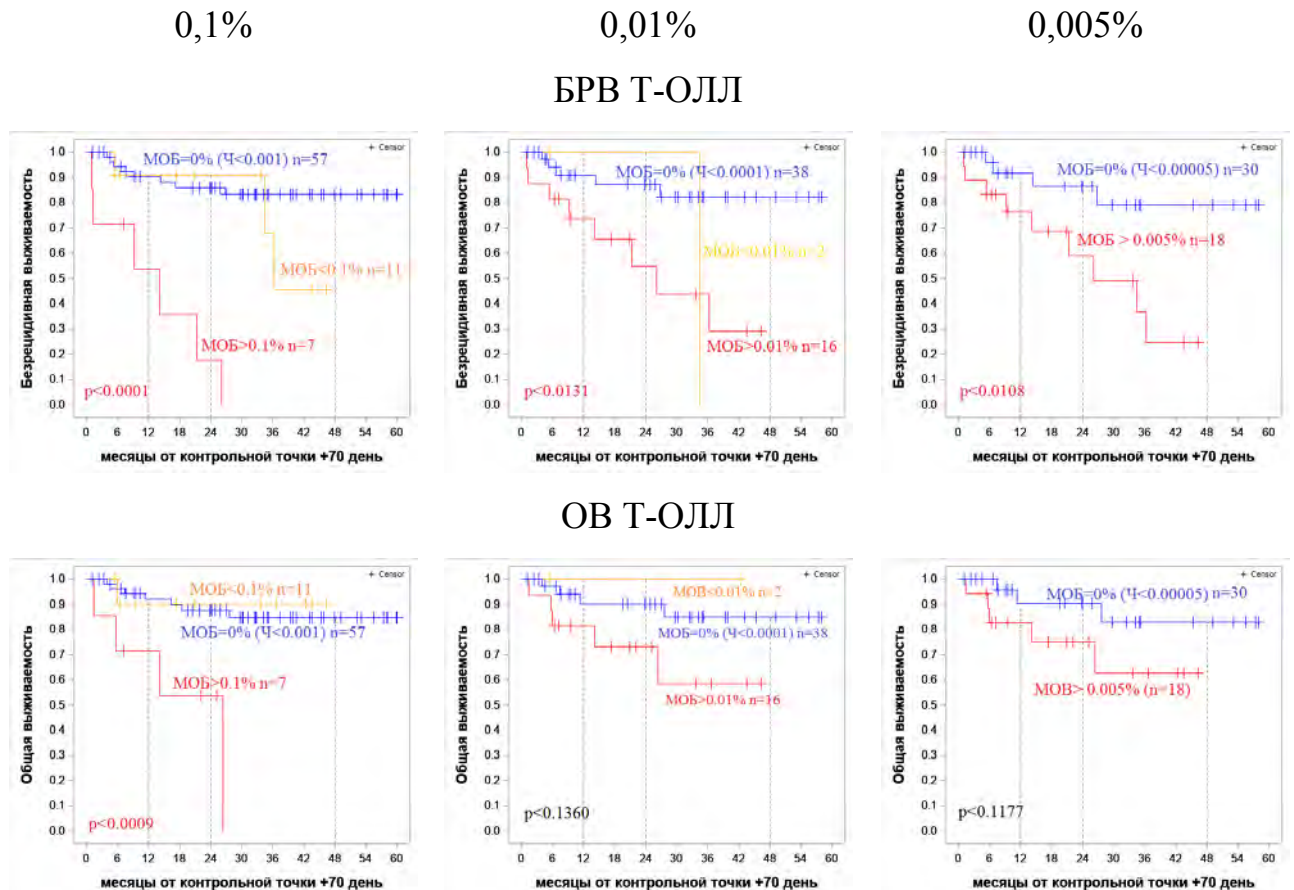


Рисунок 20 – БРВ и ОВ больных Т-ОЛЛ в зависимости от величины порога МОБ на +70 день протокола

Для больных Т-ОЛЛ, в отличие от В-ОЛЛ, нельзя с уверенностью утверждать, что промежуточная группа $0 < \text{МОБ} < 0,1\%$ имеет неблагоприятный прогноз и может быть объединена с группой $\text{МОБ} \geq 0,1\%$, однако эта группа малочисленна, и вывод о ее выделении делать преждевременно. В случае установления порога МОБ 0,1% на +70 день протокола выявляются достоверные

различия в БРВ. И, следовательно, +70 день терапии Т-ОЛЛ может служить важной точкой мониторинга МОБ.

Учитывая, что цитогенетические аномалии являются значимыми факторами, влияющими на прогноз заболевания при В ОЛЛ, мы решили исследовать сочетанное влияние цитогенетических рисков и МОБ статуса на общую и безрецидивную выживаемость.

Цитогенетическое исследование в дебюте заболевания было выполнено 92 больным В-ОЛЛ, у 11 больных не были получены митозы. Больные В-ОЛЛ с информативными цитогенетическими исследованиями (n=81) с учетом цитогенетических рисков были разделены на следующие группы:

- 1) Наличие транслокации $t(4;11)(q21;q23)$ с вовлечением локуса гена КМТ2А (MLL) И/ИЛИ транслокации $t(1;19)(q23;p13)$ И/ИЛИ гиподиплоидии;
- 2) Наличие других аномалий кариотипа, не перечисленных в пункте 1;
- 3) Комплексный кариотип при отсутствии аномалий, перечисленных в пункте 1;
- 4) Гипердиплоидия без других аномалий;
- 5) Нормальный кариотип.

На Рисунке 21 представлена БРВ в зависимости от обнаруженных цитогенетических аномалий.

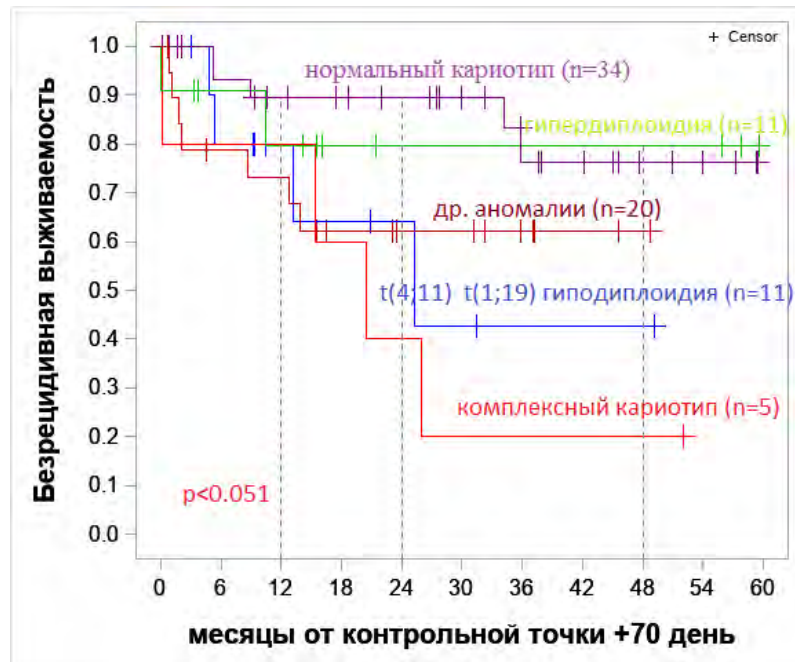


Рисунок 21 – БРВ в зависимости от обнаруженных цитогенетических аномалий

Экспертный визуальный анализ позволяет предположить, что пациенты с наличием любых аномалий кариотипа кроме гипердиплоидии относятся к группе неблагоприятного прогноза, поэтому было принято решение объединить их в группу высокого цитогенетического риска, а пациентов с гипердиплоидией и нормальным кариотипом в группу стандартного цитогенетического риска. На Рисунке 22 представлена БРВ в зависимости от сформированной группы цитогенетического риска.

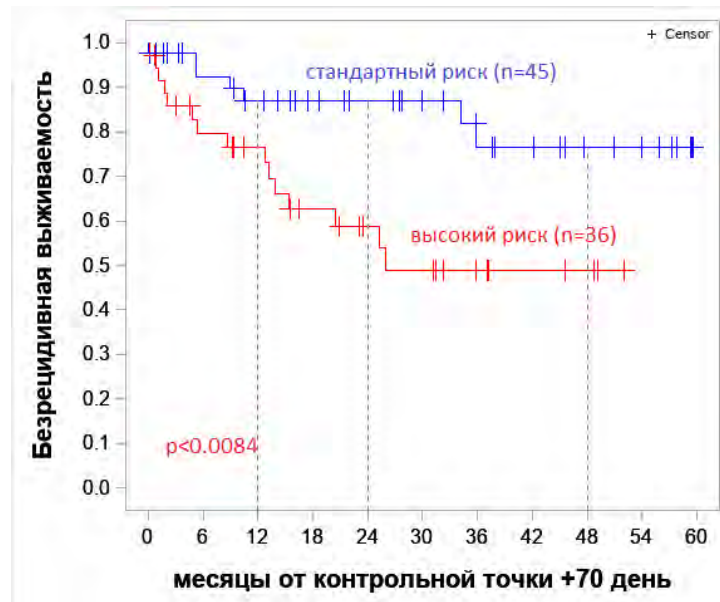


Рисунок 22 – БРВ в зависимости от группы риска по цитогенетическим аномалиям

Информация о МОБ статусе на +70 день и результатах цитогенетического исследования была доступна для 74 больных В-ОЛЛ. Была проанализирована БРВ в зависимости от сочетания МОБ-статуса на +70 день и выявленных цитогенетических аномалий (Рисунок 23).

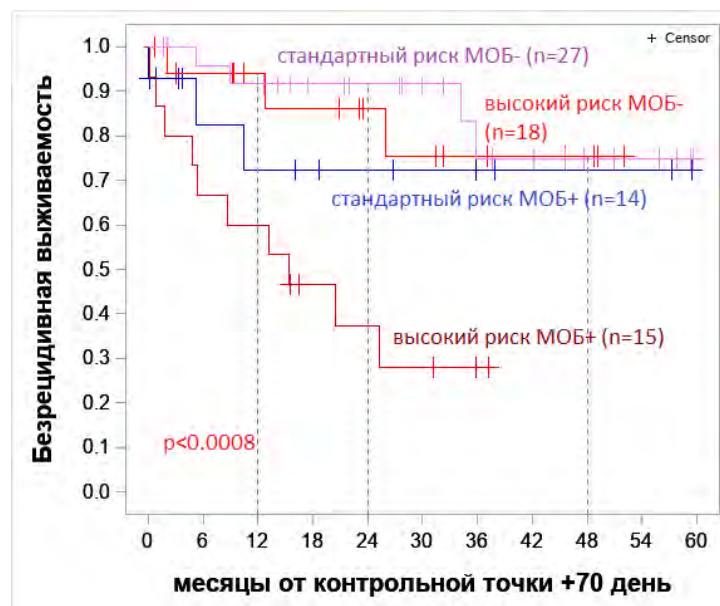


Рисунок 23 – БРВ в зависимости от сочетания группы риска по цитогенетическим аномалиям и МОБ-статуса на +70 день

На следующем этапе на основе регрессионной модели Кокса изучено совместное влияние ключевых факторов прогноза на БРВ: группы цитогенетического риска и МОБ-статуса на +70 день. На графике, отображающем гипотетические (модельные) оценки БРВ в зависимости от сочетаний значений этих факторов, видно, что достижение МОБ-негативного статуса обладает большей прогностической значимостью по сравнению с группой риска по цитогенетике, и является существенным прогностическим фактором как в группе высокого цитогенетического риска, так и в группе стандартного цитогенетического риска. (Рисунок 24).

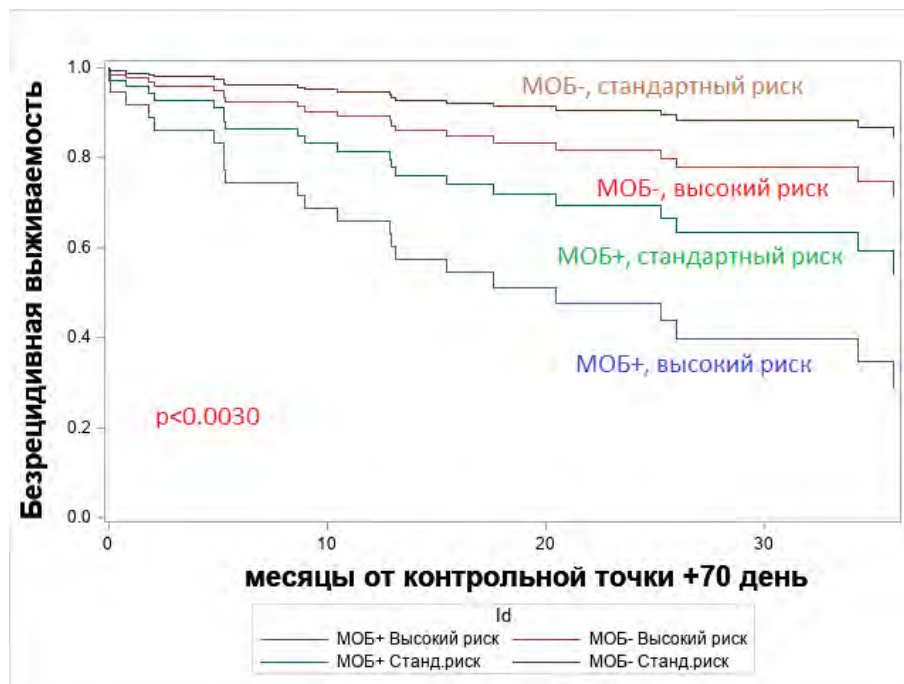


Рисунок 24 – Модельные оценки БРВ больных в ПР с МОБ-негативным и МОБ-позитивным статусом после 1-го курса индукции из разных групп риска по цитогенетике

Индивидуальный клиренс МОБ у больных В-ОЛЛ в группах низкого (синие линии) и высокого (красные линии) цитогенетического риска представлен на Рисунке 25. Начальный уровень в точке 0 (мы за него принимали количество бластных клеток в пунктате костного мозга в дебюте заболевания) был выше в группе больных высокого цитогенетического риска ($p < < .0001$). С течением времени значения МОБ снижались в обеих группах ($p < < .0001$), но не было

обнаружено статистически достоверных различий в динамике значений МОБ в группах высокого и стандартного цитогенетического риска ($p < 0,2179$).

В-ОЛЛ

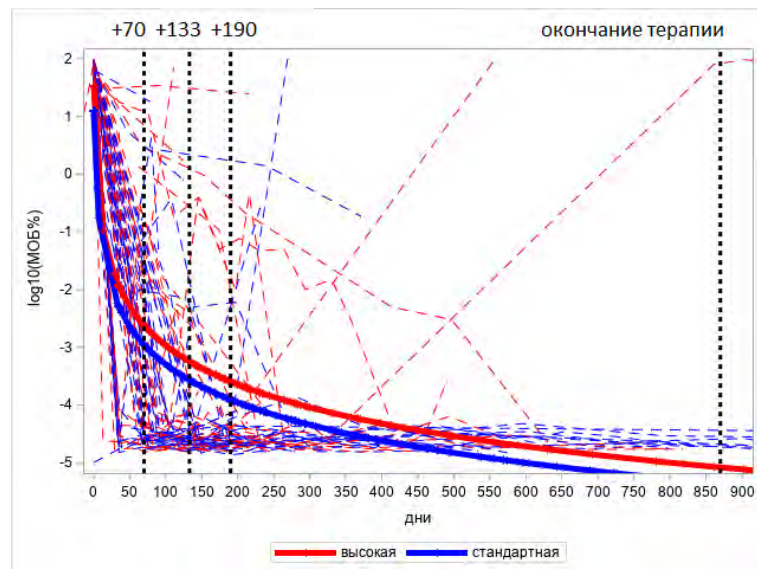


Рисунок 25 – Динамика МОБ при В-ОЛЛ в зависимости от группы риска по цитогенетике (высокая и стандартная)

В следующей части для выбора оптимального клинически значимого порога был проведен ROC-анализ.

В классическом ROC-анализе на основании сравнения численного уровня теста делается предсказание бинарного значения целевой переменной статуса больного (болен – не болен, жив – не жив). Очевидно, что предсказанное значение отличается от истинного. Есть ошибки 1 и 2 рода – гипер- и гиподиагностики. На основании оценок этих ошибок строятся зависимости чувствительности и специфичности теста в зависимости от порога.

В нашем случае МОБ-тест используется для предсказания неблагоприятного клинического исхода: рецидив или смерть. Тогда статистическая чувствительность определяется по формуле 4.

$$\text{Чувствительность(статистическая)} = \frac{\text{число больных с правильно предсказанным неблагоприятным исходом}}{\text{число всех больных с предсказанным неблагоприятным исходом}}$$

(4)

А специфичность – по формуле 5.

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{число больных с правильно предсказанным благоприятным исходом}}{\text{число всех больных с предсказанным благоприятным исходом}}. \quad (5)$$

Сложность проведения классического ROC-анализа в том, что есть цензурированные наблюдения, состав исследуемых групп меняется со временем и неблагоприятные события происходят в разное время. В модификации классического «ROC survival» анализе вместо частот в контрольной точке, используются оценки вероятности прожить без неблагоприятных событий к этой временной точке [73].

Для вычисления порогового значения МОБ на 70-й день протокола был проведен «ROC survival» анализ (Рисунок 26). Исходной переменной для предсказаний неблагоприятных событий являлся показатель количества МОБ-положительных клеток. Затем нужно было выбрать временную контрольную точку, статус в которой предсказывается с помощью значения МОБ. Таким образом, на 70-й день измеряем МОБ, а в другой отстоящей точке прогнозируем статус. Была рассчитана совокупность ROC-кривых в различных временных точках (6, 12, 18, 24 и 36 месяцев) и выбрана для анализа временная точка, для которой площадь под кривой AUC являлась максимальной – 36 месяцев. Для увеличения мощности анализа были объединены когорты больных Т-ОЛЛ (n=78) и В-ОЛЛ (n=95). С учетом того, что существует порог лабораторной чувствительности, то любой МОБ-отрицательный результат можно трактовать как некую вероятностную интервальную оценку (то есть опухолевые клетки могут быть, но их количество не более, чем достигнутое значение чувствительности). Поэтому всем отрицательным результатам были приписаны значения МОБ, равные половине чувствительности исследования. Поскольку оптимальный порог находится справа, экстраполяция ROC-кривых и кривых чувствительности-специфичности в левую область является гипотетической и выполняется для экстраполяции математической модели за пределы лабораторной чувствительности.

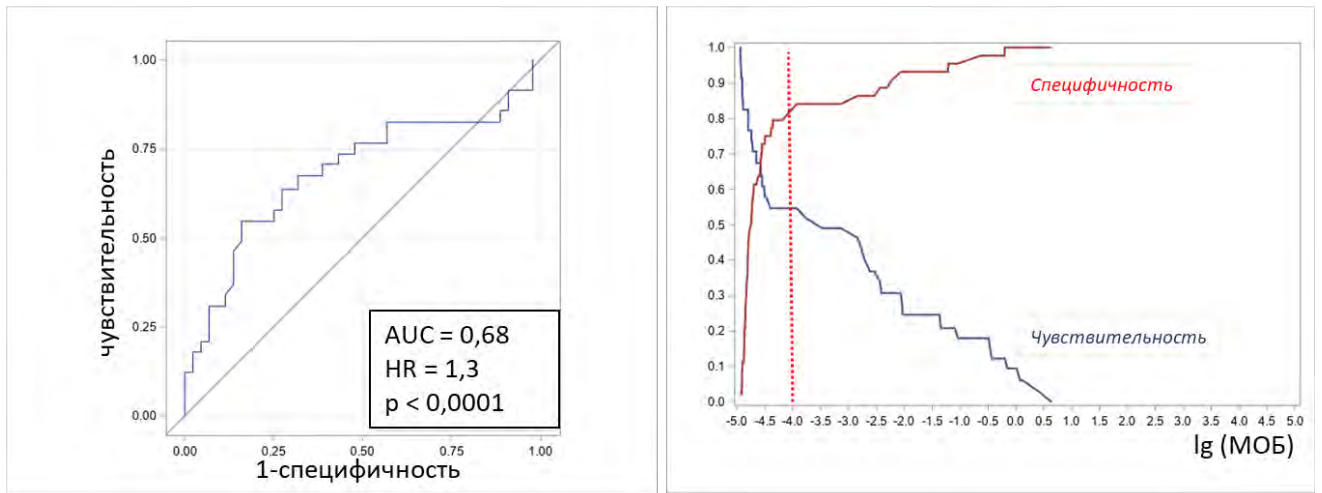


Рисунок 26 – Результаты «ROC survival» анализа, проведенного для вычисления порогового значения МОБ на 70-й день протокола «ОЛЛ-2016» (AUC – area under the curve (площадь под кривой), HR – Hazard ratio (отношение рисков))

Более удобным представлением ROC-кривой является изображение на одном графике чувствительности и специфичности в зависимости от численного значения исходной переменной (Рисунок 26). При увеличении порога увеличивается специфичность (снижается вероятность ложноположительных предсказаний неблагоприятного исхода), но и уменьшается чувствительность (увеличивается вероятность пропусков, непредсказанных неблагоприятных событий). При снижении порога повышается чувствительность (то есть снижается вероятность пропуска предсказанного рецидива), но повышается вероятность ложного неблагоприятного прогноза.

Анализ поведения кривых чувствительности-специфичности позволяет решить до-оптимизационную задачу (найти диапазон значений порога для исходной переменной, в которой и специфичность, и чувствительность одновременно достаточно высоки). При анализе кривых чувствительности-специфичности мы обнаружили, что при пороге МОБ близком к нулю, специфичность сильно падает, а при этом чувствительность не сильно растет. Однако эта область очевидно уже находится за пределами лабораторной чувствительности.

ROC-анализ сам по себе не решает проблему выбора конкретного значения порога, а дает базу для решения оптимизационной задачи. Точное ее решение подразумевает знание цен ошибок 1-го и 2-го рода. Тогда оптимизация заключается в выборе порога, при котором минимизируются потери, выраженные в стоимости ошибок 1-го и 2-го рода. В рассматриваемой задаче получить экспертные оценки весов ошибок 1-го и 2-го рода достаточно сложно.

Сложно даже выбрать единицы измерения потерь от ошибочных решений – финансовые затраты, жизни, дни госпитализаций, риски осложнений. Однако клинический опыт коллег показывает, что заключение о сохраняющейся МОБ может привести к решению о смене терапии, связанной с увеличенными рисками осложнений. Поэтому решение о МОБ-положительном статусе является ответственным решением и ошибки в нем нежелательны.

Так как выбор порога - это компромисс и баланс двух ошибок, было решено уделить больше внимания ложному обнаружению МОБ, чем его пропуску.

В качестве порога было принято значение 0,01% (10^{-4}). При этом пороге, как следует из ROC зависимости, соотношение рисков ошибок (ложной положительности к ложной отрицательности) примерно 1 к 2,8. Это хорошо согласуется с эмпирическим клиническим опытом принятия решений в ФБГУ НМИЦ гематологии. По экспертной оценке цена ложного заключения о МОБ-положительном статусе примерно в 3 раза более весомая, чем ложно-отрицательный результат анализа МОБ, так как обнаружение МОБ влечет за собой принятие ответственных терапевтических решений о возможной смене тактики терапии с дополнительными рисками для больного. Для более точной оценки соотношения рисков нужна дополнительная информация и более подробный фармако-экономический анализ.

В исследовании AALL0232, М. Боровиц и соавторы [27] при определении МОБ методом МПЦ пороговое значение составило 0,01% на постиндукционном этапе. В протоколе испанской группы PETHEMA ALL-AR-03, Х. Рибера и соавторы [161], где также применялся метод МПЦ для оценки МОБ пороговое значение в конце индукции было установлено 0.1%, а в конце консолидации

0,05%. В протоколе терапии ОЛЛ для детей и подростков AIEOP-BFM-ALL 2000 (NCT00613457) исследование МОБ оценивали на 15-й день индукции методом МПЦ у 830 больных и было выявлено три группы больных: с количеством аберрантных клеток на 15-й день $< 0,1\%$ (42 % от всей когорты больных); от 0,1 % до 10 % (47 % больных) и более 10 % (11 % больных). Пятилетняя кумулятивная вероятность рецидива у них составила 7,5 %, 17,5 % и 47,2 % соответственно [20]. Приведенные работы, и собственные результаты исследования показывают, что пороги МОБ определяются в рамках проводимого протокола терапии и целесообразно устанавливать порог МОБ и оценивать МОБ на более ранних этапах, а именно на этапе индукции/консолидации, чтобы выполнять стратификацию больных на группы риска и проведение соответствующей химиотерапии.

Таким образом, пороговое значение МОБ у больных ОЛЛ, проходящих терапию в рамках протокола «ОЛЛ-2016», с учетом оптимального по соотношению чувствительности/специфичности достигается на границе лабораторной чувствительности метода и составляет 0,01%. Первой ключевой точкой определения МОБ является +70 день протокола и которая может служить точкой стратификации дальнейшей терапии. Порог 0,01%, который был установлен на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» может и должен применяться в следующих ключевых точках определения МОБ, так как нет оснований, подтверждающих его увеличение, а изменение порога в сторону уменьшения могут быть в случае увеличения когорты больных, что на отдаленных этапах терапии маловероятно.

Случаи, в которых МОБ не детектируется, но значение лабораторной чувствительности превышает установленный порог МОБ, следует признать невалидными и рекомендовать через 1-2 недели проведение повторного исследования вследствие вероятности получения ложно-отрицательного результата о наличии МОБ. За этот период времени возможно восстановление кроветворения после курса химиотерапии и, следовательно, достижение

требуемой чувствительности исследования (достаточное количество клеток в анализе).

4.5. Характеристика иммунофенотипа клеток, формирующих остаточную опухолевую популяцию

Остаточные опухолевые клетки в конце 2-ой фазы индукции (70-й день) по протоколу «ОЛЛ-2016» были выявлены у 37 больных В-ОЛЛ и 18 больных Т-ОЛЛ.

Для этой группы больных была доступна информация не только о количестве опухолевых клеток, но и их качественной характеристике, а именно плотности экспрессии антигенов, изучаемых в ходе анализа МОБ. Полуколичественная оценка плотности экспрессии антигенов была преобразована в числовой эквивалент: 1 – «-» (отсутствие экспрессии), 2 – «-/» (частично-положительная экспрессия), 3 – «dim» (слабая экспрессия), 4 – «+/-» (частично-негативная экспрессия), 5 – «+» (положительная экспрессия), 6 – «high» (высокая экспрессия). Подробно алгоритм определения плотности экспрессии антигенов представлен в Главе 3.4 (материалы и методы). Для анализа структуры полученных данных был проведен кластерный анализ с помощью метода «ward.D» пакета «dendextend» в R 3.6.3. Т.е. была сделана попытка сформировать группы (кластеры) больных с похожим профилем экспрессии антигенов.

В-ОЛЛ.

В результате кластерного анализа построена дендрограмма кластеров опухолевых популяций и тепловая карта уровня экспрессии в кластерах больных (Рисунок 28). Для проверки возможности использования информации об иммунофенотипе остаточных опухолевых клеток для прогноза клинического выхода были построены оценки БРВ в кластерах.

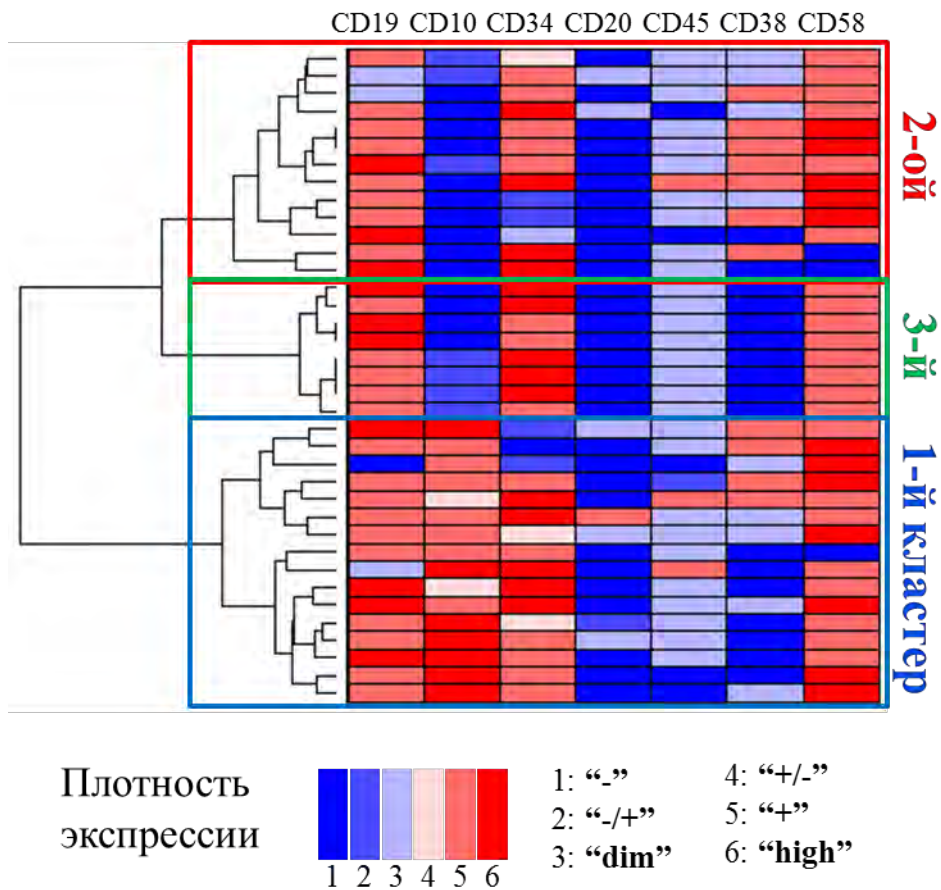


Рисунок 28 – Дендрограмма и тепловая карта, построенные на основе иммунофенотипа опухолевых клеток В-ОЛЛ на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» (плотность экспрессии преобразована в числовой эквивалент: 1 – «-» (отсутствие экспрессии), 2 – «-/+» (частично-положительная экспрессия), 3 – «dim» (слабая экспрессия), 4 – «+/-» (частично-негативная экспрессия), 5 – «+» (положительная экспрессия), 6 – «high» (высокая экспрессия))

В зависимости от характеристик иммунофенотипа опухолевых клеток было выделено три кластера остаточных опухолевых клеток у больных В-ОЛЛ (n=37). Первый кластер определен у 16 больных: остаточные опухолевые клетки экспрессировали антиген CD10 (CD10^{+/-} – выявлен у 2 больных, CD10⁺ – у 7, CD10^{high} – у 7). Вторым и третьим кластер сформированы остаточными клетками В-ОЛЛ с отсутствием или низкой экспрессией CD10: 2-й кластер определен у 13 больных (10 больных с CD10⁻ иммунофенотипом остаточных бластных клеток, у 3 больных – CD10^{+/-}); 3-й кластер определен у 8 больных (4 больных – CD10⁻, у 4 больного – CD10^{+/-}). Вторым и третьим кластерами отличались преимущественно по

экспрессии маркеров CD38 и CD58. Второй кластер включал 7 больных с иммунофенотипом остаточных опухолевых клеток CD38⁺, 4 – CD38^{dim} и 2 – CD38⁻, в то время как в третьем кластере во всех случаях иммунофенотип соответствовал CD38⁻. Высокая плотность экспрессии CD58 определялась в 5 случаях во втором кластере, а в третьем – ни в одном случае не встречалась (Рисунок 28). Таким образом, второй кластер характеризовался более высокой экспрессией CD38 и CD58, чем третий.

Доли остаточных опухолевых клеток значимо не отличались во всех трех кластерах: в 1-ом кластере медиана доли опухолевых клеток составила 0,13%, во 2-ом – 0,06%, в 3-ем – 0,10% ($p = 0,97$). БРВ больных В-ОЛЛ зависела от принадлежности остаточной опухолевой популяции к кластерам полученной дендрограммы (Рисунок 29).

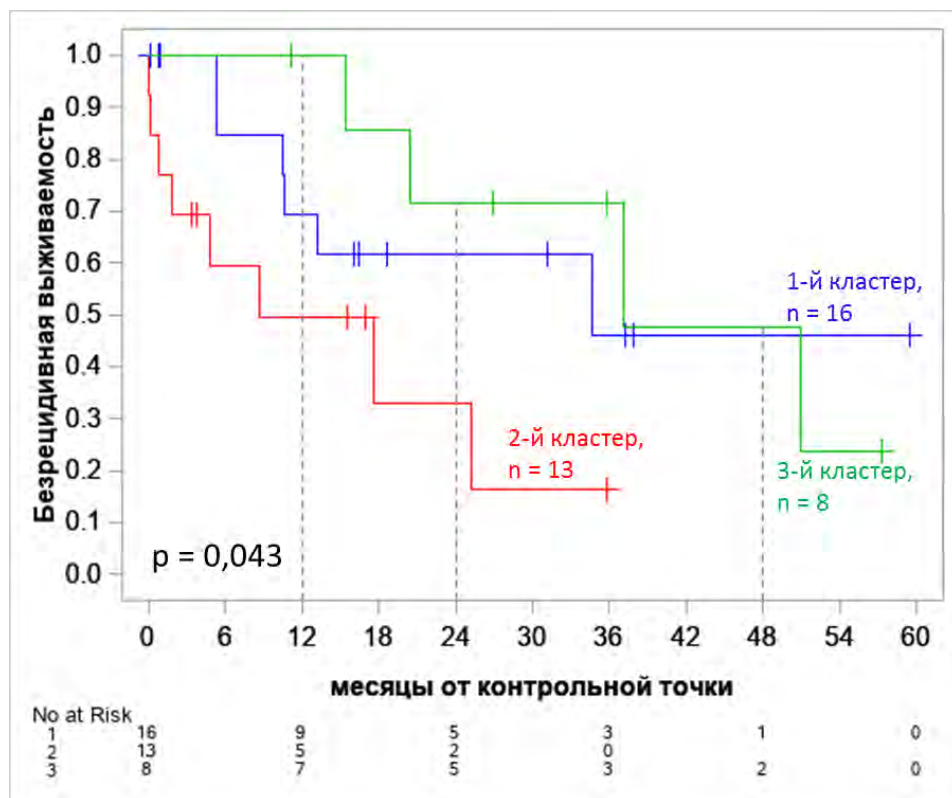


Рисунок 29 – БРВ больных В-ОЛЛ на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» в зависимости от принадлежности к кластеру остаточных опухолевых клеток полученной дендрограммы (1-й кластер CD10⁺CD38^{-dim/+}CD58^{+high}; 2-й кластер CD10⁻CD38⁺CD58^{high/+}; 3-й кластер CD10⁻CD38^{-dim}CD58⁺)

Медиана БРВ у больных с остаточными опухолевыми клетками второго кластера составила 8,7 мес., у больных с остаточными клетками третьего кластера медиана БРВ составила 37,1 мес., а у больных с остаточными клетками первого кластера – составила 34,7 мес. (Рисунок 29). Таким образом, при отсутствии CD10 на остаточных бластных клетках, прогноз, вероятно, зависит от экспрессии CD38 и CD58. Если CD38 экспрессируется и/или CD58 экспрессируется в высокой плотности на остаточных опухолевых клетках – то прогноз и БРВ хуже, чем в случаях, когда CD38 не экспрессируется или CD58 экспрессируется, но не в высокой плотности.

У 14 больных В-ОЛЛ на остаточных опухолевых клетках полностью отсутствовала экспрессия CD10, а у остальных 23 больных экспрессия CD10 варьировала от частичной до высокой: CD10^{-/+} – у 7 больных, CD10^{+/-} – у 2 больных, CD10⁺ – у 7 больных, CD10^{high} – у 7 больных. Мы разделили больных на две группы: с полным отсутствием CD10 – CD10«-» и наличием любой позитивной экспрессии CD10 – CD10«+». Доли опухолевых клеток в этих группах значимо не отличались, и медианы составили 0,11% и 0,07% для групп CD10«-» и CD10«+» соответственно ($p = 0,67$). Медиана БРВ в группе CD10«+» не достигалась, а в группе CD10«-» составила 15,4 мес. ($p = 0,004$) (Рисунок 30).

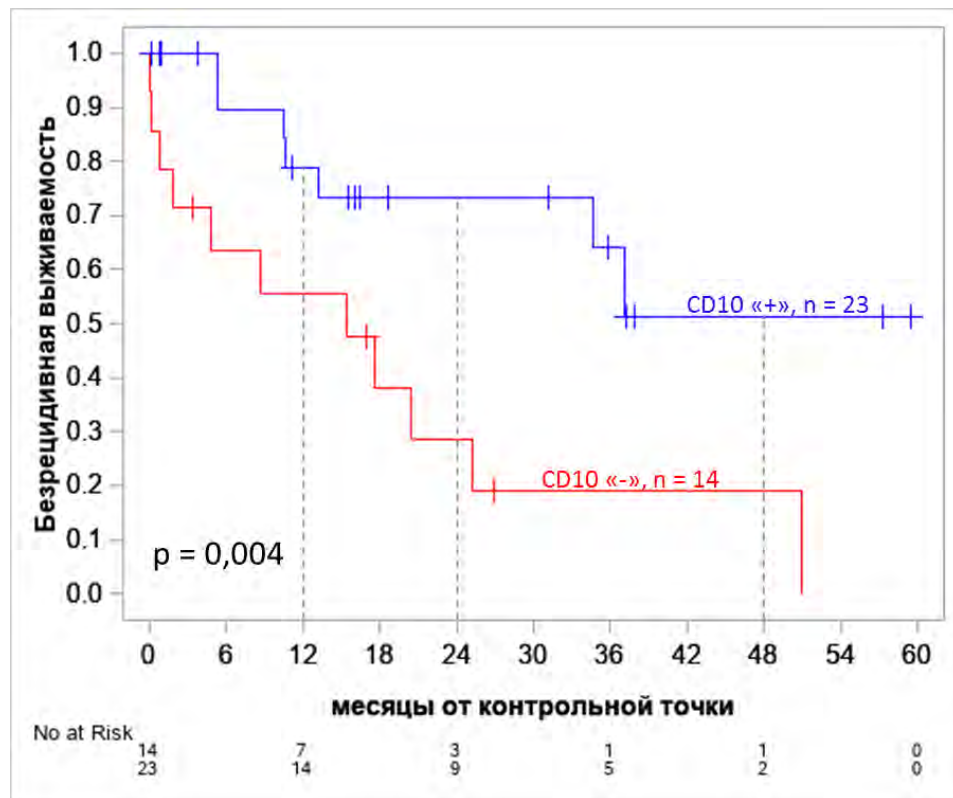


Рисунок 30 – БРВ больных В-ОЛЛ в зависимости от экспрессии CD10 на остаточных опухолевых клетках на +70 день протокола «ОЛЛ-2016»

Среди 37 больных В-ОЛЛ с выявленной МОБ на 70-й день протокола «ОЛЛ-2016» CD38 не экспрессировался на бластных клетках (CD38⁻) в 17 случаях, слабая плотность экспрессии CD38 (CD38^{dim}) наблюдалась в 9 случаях, и в 11 случаях антиген CD38 экспрессировался (CD38⁺). Доли опухолевых клеток не отличались значимо в зависимости от экспрессии CD38: медиана доли опухолевых клеток, не экспрессирующих CD38 составила 0,06%, медиана доли CD38^{dim} клеток – 0,16%, медиана доли CD38⁺ клеток – 0,17% (p = 0,98).

У больных В-ОЛЛ с наличием CD38 на остаточных опухолевых клетках оценка БРВ была наихудшей, медиана составила 5,3 мес., в то время как у больных с низкой экспрессией CD38 бластными клетками медиана была 50,9 мес. (p < 0,001) (Рисунок 31).

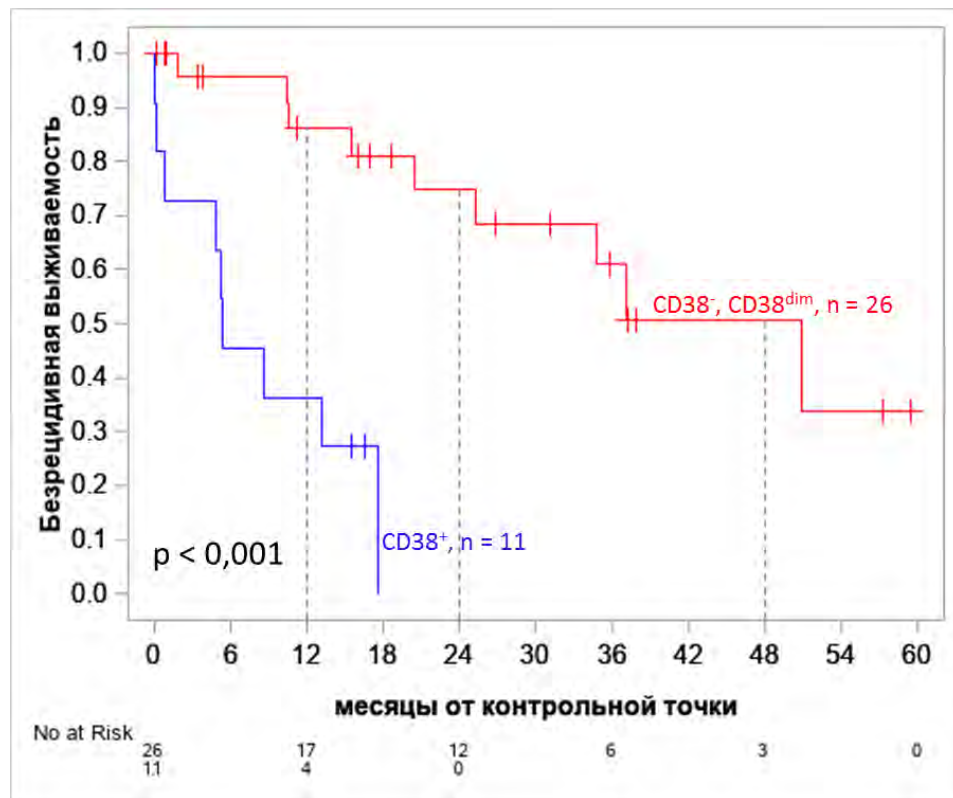


Рисунок 31 – БРВ больных В-ОЛЛ в зависимости от экспрессии CD38 на остаточных опухолевых клетках на +70 день протокола «ОЛЛ-2016»

Высокая плотность экспрессии CD58 (CD58^{high}) на остаточных опухолевых клетках отмечалась у 12 больных В-ОЛЛ, средняя экспрессии CD58 (CD58⁺) была у 22 больных, и слабая (CD58⁻) – у 3 больных. Мы разделили больных В-ОЛЛ на две группы: с высокой плотностью экспрессии CD58 – CD58 «high» и остальные – CD58 «+». Количество опухолевых клеток у больных в этих группах не отличалось: медиана доли остаточных бластных клеток в группе CD58 «high» составила 0,03%, а в группе CD58 «+» – 0,16% ($p = 0,51$). БРВ была ниже в группе CD58 «high», чем в группе CD58 «+» (медиана 8,7 мес. против 37,1 мес., $p = 0,02$) (Рисунок 32).

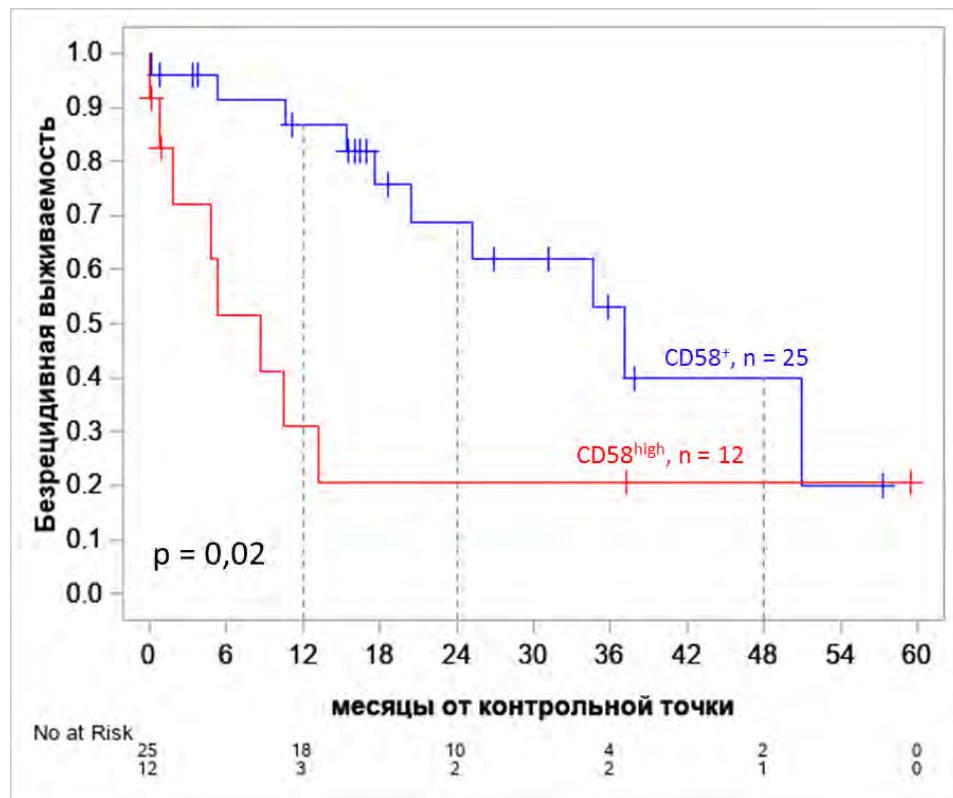


Рисунок 32 – БРВ больных В-ОЛЛ в зависимости от экспрессии CD58 на остаточных опухолевых клетках на +70 день протокола «ОЛЛ-2016»

Как известно, антиген CD38 не является линейно-ограниченным, и его можно обнаружить на многих клетках крови и костного мозга. Наибольшая плотность экспрессии CD38 характерна для плазматических клеток, также этот маркер обнаруживают на В - и Т-клетках, НК, миелоидных клетках [37].

CD38 – это многофункциональный трансмембранный гликопротеин, который обладает ферментной активностью и может выступать в роли рецептора. CD38 принимает участие в метаболизме никотинамид динуклеотида, а также является регулятором гомеостаза внутриклеточного содержания кальция [93].

CD38 принимает участие в В-клеточной дифференцировке и пролиферации, и экспрессия этого маркера на гематогонах достаточно высокая. В отличие от своих здоровых аналогов опухолевые В-лимфоциты в большинстве случаев имеют сниженную экспрессию CD38 [101].

Действительно, в проведенном нами исследовании в 26 (70%) случаях выявленной МОБ на 70-й день протокола экспрессия CD38 на остаточных бластных клетках отсутствовала или была низкой. В случаях наличия CD38 на остаточных бластных клетках у больных В-ОЛЛ БРВ была хуже. Нам не удалось найти исследований, посвященных влиянию экспрессии CD38 на прогноз больных В-ОЛЛ, что подчеркивает уникальность полученных данных. Однако значение экспрессии CD38 на опухолевых клетках хорошо изучено у больных лимфопролиферативными заболеваниями. Например, у 27-46% больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) экспрессия CD38 обнаруживается на опухолевых В-клетках [92; 146]. Наличие CD38 при ХЛЛ ассоциировано с худшим прогнозом выживаемости, а возрастание плотности экспрессии CD38 на опухолевых клетках отражает переключение на более агрессивный фенотип ХЛЛ [43].

Экспрессия антигена CD58 отличается на гематогонах и бластных клетках у больных В-ОЛЛ, что делает этот маркер полезным при мониторинге МОБ. Было показано, что CD58 нередко с большей плотностью экспрессируется на опухолевых В-лимфобластах, чем на нормальных В-клеточных предшественниках [44; 98; 196].

CD58 представляет собой молекулу межклеточной адгезии и связывается с антигеном CD2, который экспрессируется на Т-клетках. Экспрессия CD58 обнаруживается на многих гемопоэтических и негемопоэтических клетках, клетках злокачественных новообразований, включая ХЛЛ, лимфому Ходжкина, множественную миелому и острые миелоидные лейкозы [112].

Предполагается, что высокая плотность экспрессии CD58 приводит к увеличению адгезионных свойств опухолевых клеток, что влияет на их пролиферативную активность и склонность к апоптозу, однако до конца биологическая значимость экспрессии CD58 опухолевыми клетками не ясна. В результате проведенных нами исследований, было показано, что высокая плотность экспрессии CD58 остаточными опухолевыми клетками у больных В-ОЛЛ связана с худшей БРВ. Также отмечено, что высокая плотность экспрессии

CD58 часто встречалась с высокой экспрессией маркера CD38, и именно при такой комбинации антигенов длительность БРВ больных В-ОЛЛ была наиболее короткой.

Т-ОЛЛ.

На +70 день протокола «ОЛЛ-2016» МОБ была обнаружена у 18 больных Т-линейным ОЛЛ. Аналогично случаям В-ОЛЛ для больных Т-ОЛЛ была выполнена кластеризация на основе поверхностной и внутриклеточной экспрессии антигена CD3, а также экспрессии маркеров CD7, CD5, CD45, CD99, CD4, CD8. В результате выполненного анализа построена дендрограмма, включающая 3 кластера (Рисунок 33).

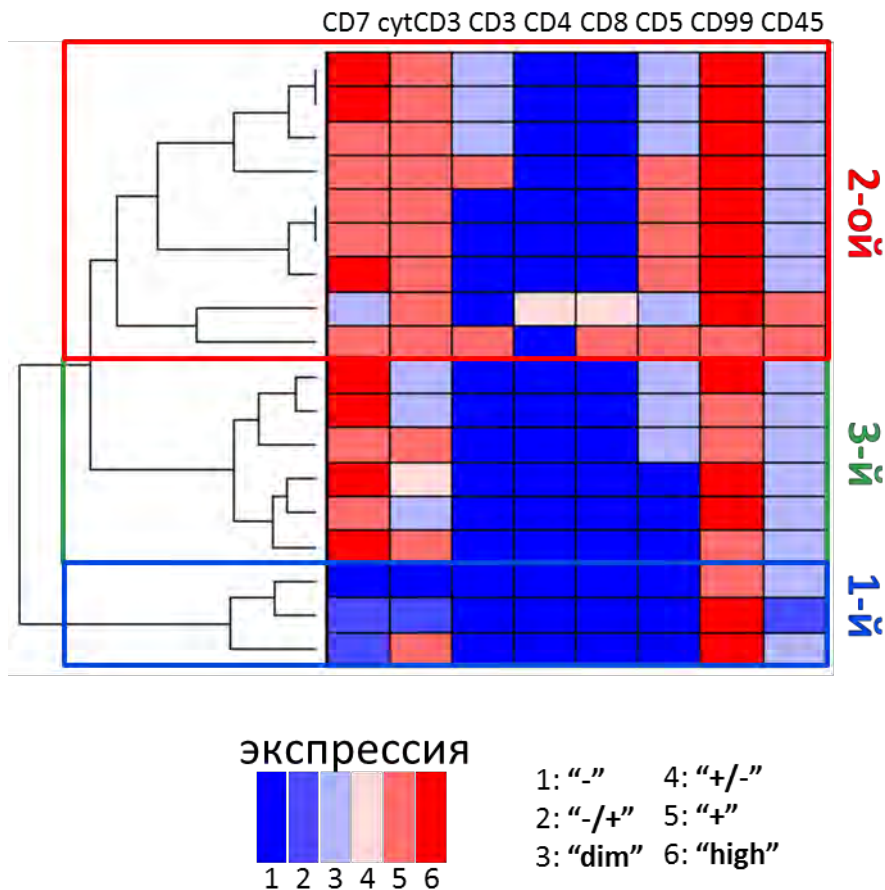


Рисунок 33 – Дендрограмма и тепловая карта, построенные на основе иммунофенотипа опухолевых клеток Т-ОЛЛ на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» (плотность экспрессии преобразована в числовой эквивалент: 1 – «-» (отсутствие экспрессии), 2 – «-/+» (частично-положительная экспрессия), 3 – «dim» (слабая

экспрессия), 4 – «+/-» (частично-негативная экспрессия), 5 – «+» (положительная экспрессия), 6 – «high» (высокая экспрессия))

Первый кластер включал 3 пациента и характеризовался отсутствием экспрессии CD7. Вторым и третьим кластерами различались преимущественно по поверхностной экспрессии CD3 и экспрессии маркера CD5. Во 2-м кластере во всех случаях определялась экспрессия CD5, а в 5 случаях присутствовала также и поверхностная экспрессия CD3. Во 3-ом кластере ни в одном случае поверхностная экспрессия CD3 не определялась, и у 3 отмечалась слабая экспрессия CD5 (Рисунок 33).

Доля Т-линейных остаточных опухолевых клеток в кластерах значимо не отличалась (медианы 0,81%, 0,08% и 0,01% соответственно, $p = 0,15$). БРВ больных Т-ОЛЛ была лучше в 3-м кластере (медиана не достигалась), чем в 1-м (медиана – 9,2 мес.) и 2-м (медиана – 21,3 мес.) ($p = 0,015$) (Рисунок 34).

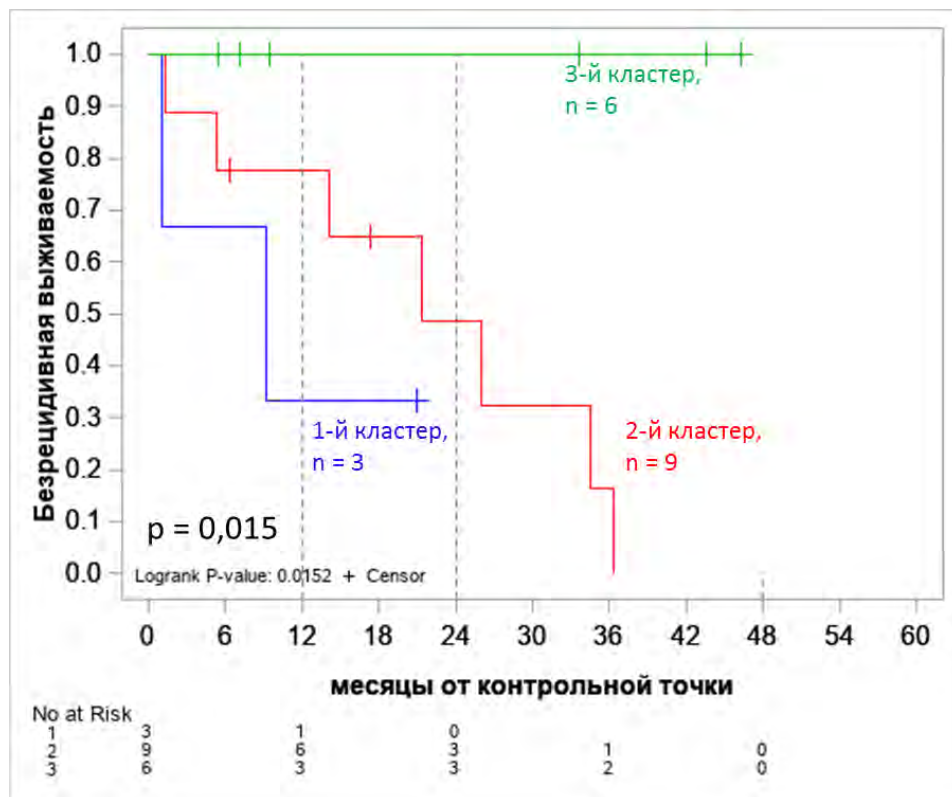


Рисунок 34 – БРВ больных В-ОЛЛ на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» в зависимости от принадлежности к кластеру остаточных опухолевых клеток

полученной дендрограммы (1-й кластер CD7⁻; 2-й кластер CD7⁺CD5⁺CD3^{+/-}; 3-й кластер CD7⁺CD5^{-dim}CD3⁻)

Из 18 больных Т-ОЛЛ с выявленной на +70 день протокола МОБ наличие экспрессии CD5 на остаточных опухолевых клетках наблюдалось у 5 больных, и у 13 больных CD5 не экспрессировался или экспрессировался слабо. Доли остаточных опухолевых клеток в этих группах больных не отличались (медианы 0,25% и 0,05% соответственно, $p = 0,116$). БРВ была хуже у больных с наличием экспрессии CD5⁺ (медиана 14,1 мес. против 34,5 мес., $p = 0,049$) (Рисунок 35).

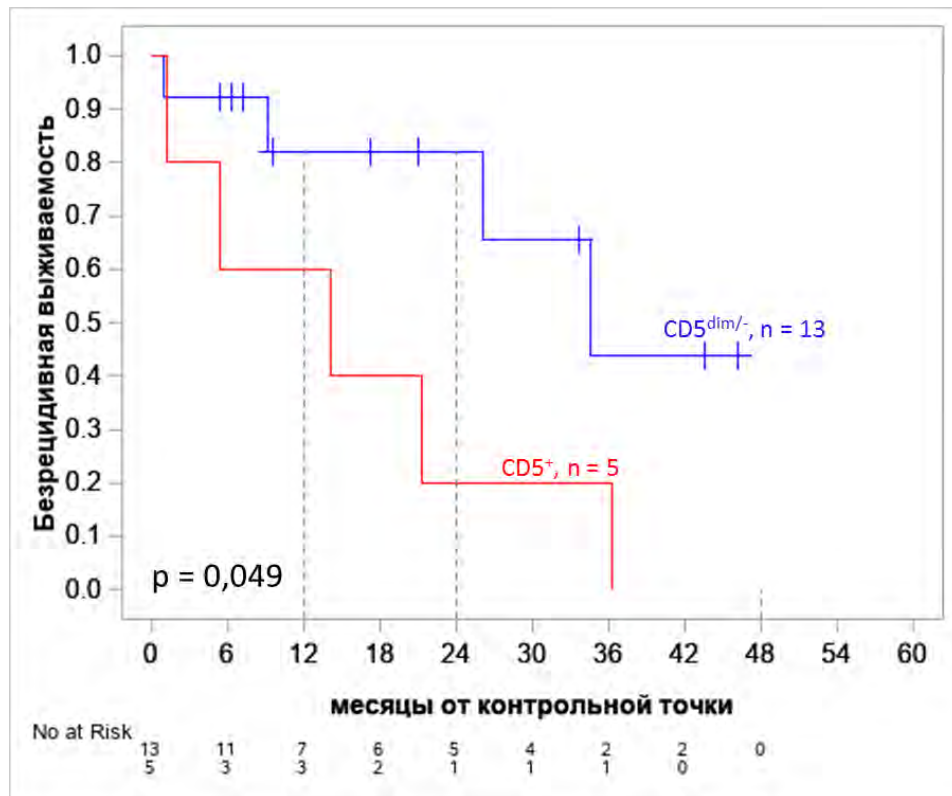


Рисунок 35 – БРВ больных В-ОЛЛ в зависимости от экспрессии CD5 на остаточных опухолевых клетках на +70 день протокола «ОЛЛ-2016»

Поверхностная экспрессия CD3 остаточными опухолевыми клетками определялась у 5 больных. Количество МОБ (0,08% против 0,068%, $p = 0,33$) и БРВ (26,0 мес. против 36,3 мес., $p = 0,185$) не отличались в зависимости от наличия поверхностной экспрессии CD3.

Таким образом, иммунофенотип остаточных опухолевых клеток, обнаруженных у больных ОЛЛ на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» имеет значение. Экспрессия антигенов CD38⁺ и /или CD58^{high/+} на остаточных опухолевых клетках при В-ОЛЛ и CD5 при Т-ОЛЛ является дополнительным фактором неблагоприятного прогноза у больных с МОБ-позитивным статусом на +70 день.

4.6. Изменение количества зрелых В-клеток, В-клеточных предшественников и плазматических клеток у больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом, включенных в протокол «ОЛЛ-2016»

Определение количества зрелых В-клеток, В-клеточных предшественников и плазматических клеток у больных В-ОЛЛ было инициировано необходимостью оценки особенностей восстановления этих клеток по следующим причинам. В основе протокола «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. С другой стороны, после проведения программной химиотерапии наступает миелотоксический агранулоцитоз и последующая интенсивная регенерация клеток КМ и нормальных В-клеточных предшественников. В ряде случаев В-клеточные предшественники принимают за опухолевые В-клетки и констатируют рецидив заболевания. Выполнение иммунофенотипического исследования методом МПЦ позволяет провести дифференциальную диагностику между аберрантными лейкоэмическими клетками и нормальными В-клетками на разных стадиях созревания.

Созревание Т-клеток происходит в тимусе, поэтому в норме в аспирате КМ можно обнаружить только зрелые Т-клетки, и при анализе МОБ не нужно дифференцировать нормальные Т-клеточные предшественники и бластные клетки. Обнаружение популяции клеток с иммунофенотипом Т-клеточных предшественников в КМ является патологией, а сама популяция признается опухолевой.

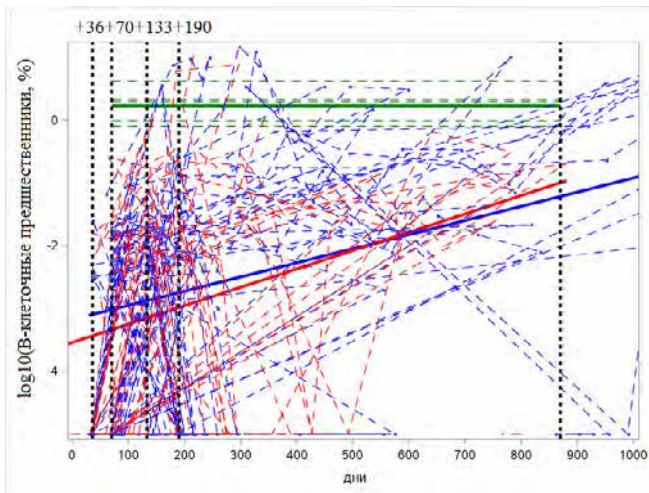
У 88 больных В-ОЛЛ помимо определения МОБ во всех точках протокола и на этапе поддерживающей терапии мы оценивали количество В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток. Количество этих клеток определялось по отношению ко всем клеткам костного мозга. Перечисленные клеточные популяции были подсчитаны также у 5 здоровых доноров.

Для анализа динамики изменения количества клеток были построены регрессионные зависимости с учетом повторных измерений количества В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток в зависимости от МОБ-статуса на 70-й день терапии (Рисунок 36). В связи с большим разбросом числовых значений в качестве целевых переменных использовали десятичный логарифм доли (процент) нормальных В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток.

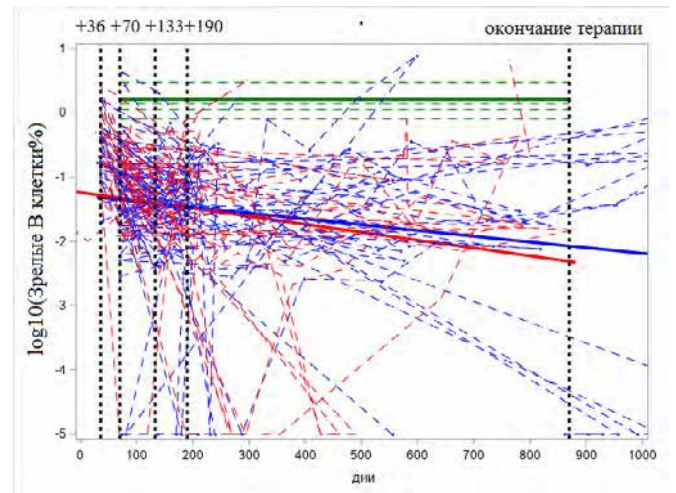
Можно сделать вывод, что в течение терапии достоверно изменяется количество В-клеточных предшественников и зрелых В-клеток ($p < 0,0001$), но не обнаружено существенных отличий в динамике количества этих клеток в МОБ-положительной и МОБ-отрицательной группах ($p > 0,05$).

У больных В-ОЛЛ практически на всех этапах терапии доля В-клеточных предшественников и зрелых В-клеток была меньше, чем у доноров. На ранних этапах терапии у половины больных В-клеточные предшественники отсутствовали, и только в течение поддерживающей терапии количество этих клеток постепенно нарастало, но не достигало нормальных значений (Рисунок 36).

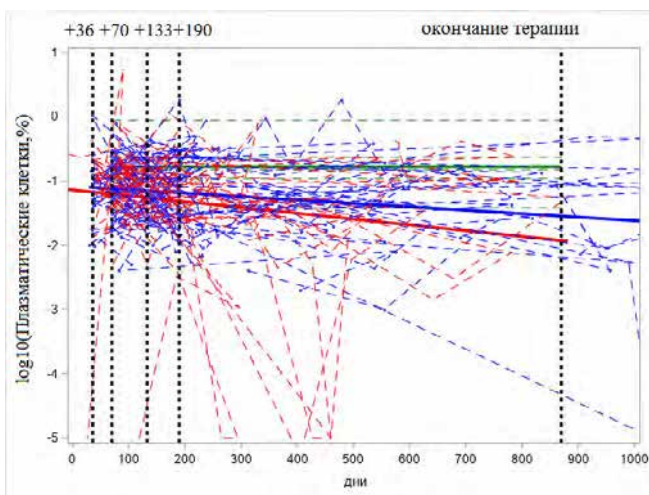
В-клеточные предшественники



Зрелые В-клетки



Плазматические клетки



- Доноры
- МОБ- больные В-ОЛЛ
- МОБ+ больные В-ОЛЛ

Рисунок 36 – Индивидуальные и усредненные динамики изменения количества В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток в зависимости от МОБ-статуса на +70 день терапии по протоколу «ОЛЛ-2016» у больных В-ОЛЛ

У больных В-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 полихимиотерапия значимо

снижает количество В-клеточных предшественников, но их регенерация происходит между курсами и в конце полихимиотерапии [114; 199].

В исследование Феунисен П.М. с соавт. (2017) был включен 81 больной В-ОЛЛ (1-18 лет), которым проводили терапию по протоколу DCOG (Dutch Childhood Oncology Group) ALL10 или ALL1 (ключевые препараты: преднизолон, дексаметазон, метотрексат, винкристин, даунорубицин, аспарагиназа, циклофосфамид, цитарабин, меркаптопурин, доксорубицин) [190]. В указанном исследовании было продемонстрировано, что 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 в терапии были недостаточно длинными для полной В-клеточной дифференцировки [190]. Интересно отметить, что так же, как и в нашем исследовании, уменьшение количества нормальных плазматических клеток не происходило, что указывает, вероятно, на резистентность данной популяции клеток к проводимой химиотерапии [190].

В исследовании Лиао Х. с соавт. (2019), включившем 113 больных В-ОЛЛ, которым проводили индукционную терапию по программе VDCLP (vincristine, daunorubicin, cyclophosphane, L-asparaginase, prednisone) [113], у 78 (69%) больных В-клеточные предшественники выявляли в конце индукционной терапии (день 28). Безрецидивная выживаемость была выше у больных с МОБ-негативным статусом, в случае, когда В-клеточных предшественников было не менее 0,1 % ($p = 0,001$) [113]. Таким образом, было показано, что не только МОБ, но и сохранение и восстановление В-клеточных предшественников имеет прогностическую значимость.

В течение терапии количество В-клеточных предшественников было меньше, чем у доноров, но количество 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.

4.7. Выживаемость больных острыми миелоидными лейкозами в зависимости от наличия или отсутствия минимальной остаточной болезни, оцененной на этапах индукции ремиссии

Результаты протокола терапии «ОМЛ-2017»

За время выполнения исследования в протокол было включено 73 больных ОМЛ. Результаты эффективности протокола «ОМЛ-2017» представлены в Таблице 11. Полная ремиссия после двух курсов индукции была подтверждена у 65 (89,1%) из 73 больных ОМЛ, при этом ПР после первого курса индукции была у 58 (79,5%) больных. Аспират костного мозга исследовался на МОБ после первого и второго курсов терапии в полной ремиссии, когда восстанавливались показатели периферической крови.

В группе благоприятного прогноза у 6 больных был МОБ⁺ статус после 1-го курса, 2 из этих больных после 2-го курса достигли МОБ⁻ статуса, у одного больного МОБ⁻ статус, который был установлен после 1-го курса изменился на МОБ⁺ после 2-го курса. В группе неблагоприятного прогноза у 2 больных МОБ⁻ статус после 1-го курса изменился на МОБ⁺ статус после 2-го курса терапии, а 3 больных с МОБ⁺ статусом после 1-го курса МОБ после 2-го курса не выявлялась. Оценка МОБ-статуса после 1-го курса индукции была проведена у 57 из 60 больных ОМЛ в ПР после 1-го курса, и у 38 больных (64%) подтвержден МОБ-негативный статус. После 2-го курса статус МОБ был оценен у 59 из 62 больных в ПР, при этом МОБ-негативный статус определен у 44 (71%) больных ОМЛ.

Таблица 11 – Эффективность терапии и события в период ремиссии у больных ОМЛ в зависимости от прогноза по классификации ELN-2017, которым выполнялось лечение по протоколу протокола «ОМЛ-2017»

Параметр	Прогноз по классификации ELN 2017			Всего
	благоприятный	промежуточный	неблагоприятный	
Число больных, n	34	26	13	73
Достижение ПР, n (%)	33 (97,1%)	23 (88,5%)	9 (69,2%)	65 (89,1%)
Достижение ПР после 1-го курса индукции, n (%)	31 (91,2%)	18 (69,2%)	9 (69,2%)	58 (79,5%)
Достижение ПР после 2-го курса индукции, n (%)	2 (5,9%)	5 (19,2%)	0	7 (9,6%)
Рефрактерность, n (%)	0	3 (11,5%)	3 (23,1%)	6 (8,2%)
Ранняя летальность, n (%)	1 (2,9%)	0	1 (7,7%)	2 (2,7%)
МОБ-негативный статус после 1-го курса индукции, n (%)	24 (80%) из 30	10 (55,6%) из 18	4 (33%) из 12	38 (64%) из 60
МОБ-негативный статус после 2-го курса индукции, n (%)	22 (81,5%) из 27	17 (71%) из 24	5 (45%) из 11	44 (71%) из 62
Алло-ТГСК в 1-й ПР, n (%)	11 (33,3%) из 33	12 (52,2%) из 23	6 (66,7%) из 9	29 (44,6%) из 65

Изменение количества остаточных опухолевых клеток, определенных после 1-го и 2-го курсов индукции, показано на Рисунке 37. Значения МОБ после 1-го курса индукции было в пределах от 0,009% до 8% (медиана – 0,43%), а после 2-го курса – от 0,006% до 4% (медиана – 0,18%).

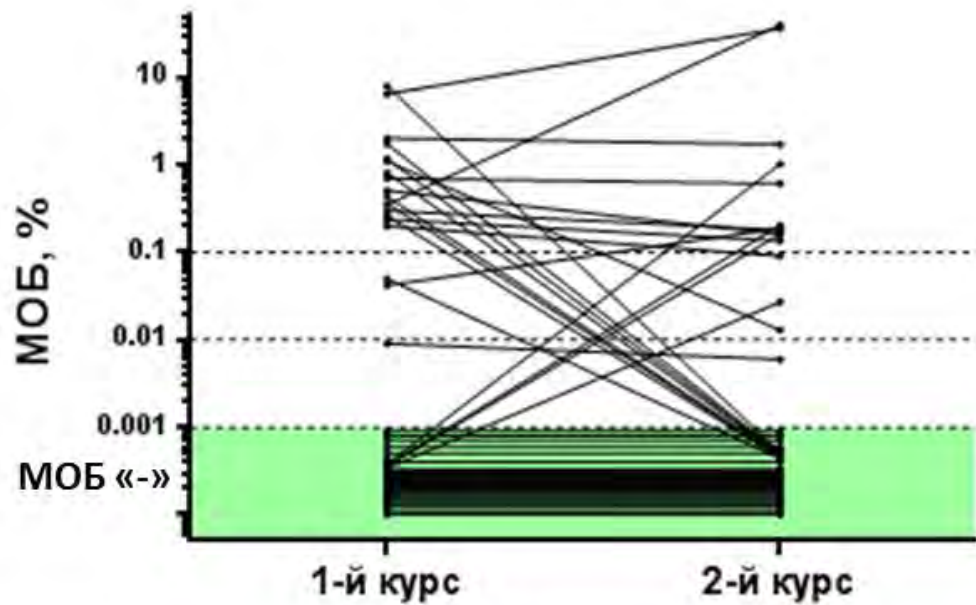


Рисунок 37 – Индивидуальные динамики значений МОБ у 73 больных ОМЛ, включенных в протокол «ОМЛ-2017»

Был проведен однофакторный анализ показателей ОВ, ВРР и БРВ больных ОМЛ в зависимости от следующих клинико-лабораторных параметров: пол, возраст, молекулярно-генетический риск по ELN-2017, концентрация ЛДГ, МОБ-статус после 1-го и 2-го индукционных курсов (Таблица 12). ОВ значимо зависит от пола и наличия МОБ после 1-го курса или в момент ПР. На ВРР и БРВ значимо оказывало влияние наличие МОБ после 1-го и 2-го курсов индукции или в ПР (Таблица 12, Рисунок 38). Для оценки результатов была взята точка 20 месяцев от начала терапии, так как в этой точке 50% больных, включенных в исследование, оставались под наблюдением и оценки выживаемости были достаточно надежны.

Таблица 12 – Показатели ОВ, ВРР, БРВ в зависимости от демографических и клинико-лабораторных факторов (результаты однофакторного анализа)

Параметр	ОВ на 20 мес.	ВРР на 20 мес.	БРВ на 20 мес.
Пол (женский vs мужской)	66,1% vs 91,7% (p = 0,03)	35,7% vs 17,8% (p = 0,1)	60,2% vs 82,2% (p = 0,053)
Риск ELN-2017 (благоприятный, промежуточный, неблагоприятный)	90,5% vs 65,3% vs 59,3% (p = 0,052)	24,5% vs 31,3% vs 33,3% (p = 0,36)	72,8% vs 65,5% vs 66,7% (p = 0,43)
Возраст (младше 40 лет vs старше 40 лет)	80,1% vs 68,8% (p = 0,57)	29,2% vs 26,8% (p = 0,63)	70,8% vs 65,9% (p = 0,87)
ЛДГ (<800 Ед/л vs >800 Ед/л)	63,9% vs 81,5% (p = 0,36)	31,8% vs 27,2% (p = 0,7)	64,2% vs 71,1% (p = 0,9)
МОБ после курса 1 (не выявлена vs выявлена)	95,8% vs 51,8% (p = 0,0007)	16,0% vs 45,3% (p = 0,0008)	84,0% vs 47,4% (p = 0,0001)
МОБ после курса 2 (не выявлена vs выявлена)	85,2% vs 58,3% (p = 0,09)	14,1% vs 55,0% (p = 0,002)	83,9% vs 40,0% (p = 0,001)
МОБ в момент ПР (выявлена vs не выявлена)	53,1% vs 94,4% (p < 0,0001)	48,7% vs 17,1% (p = 0,0004)	45,5% vs 83,0% (p < 0,0001)
Нейролейкемия (нет vs есть)	78,8% vs 66,7% (p = 0,54)	27,7% vs 33,3% (p = 0,074)	69,2% vs 66,7% (p = 0,76)
Доля бластов (<60% vs ≥60%)	68,4% vs 79,4% (p = 0,72)	21,5% vs 31,0% (p = 0,58)	74,4% vs 67,0% (p = 0,74)
Количество лейкоцитов (<100 × 10 ⁹ /л vs ≥100 × 10 ⁹ /л)	76,1% vs 76,5% (p = 0,71)	27,0% vs 31,1% (p = 0,81)	69,5% vs 68,8% (p = 0,97)
Цитогенетический риск (благоприятный vs промежуточный vs неблагоприятный)	86,2% vs 72,3% vs 80,0% (p = 0,48)	15,4% vs 34,0% vs 20,0% (p = 0,30)	84,6% vs 62,5% vs 80,0% (p = 0,21)
Мутация FLT3-ITD (нет vs есть)	81,4% vs 63,2% (p = 0,1)	30,0% vs 22,1% (p = 0,58)	70,1% vs 66,7% (p = 0,78)
Аллельная нагрузка FLT3-ITD (<50% vs ≥50%)	50,0% vs 62,5% (p = 0,69)	16,7% vs 28,6% (p = 0,5)	62,5% vs 71,4% (p = 0,75)

В результате проведенного многофакторного анализа с пошаговым отбором единственным достоверным признаком, влияющим на ОВ и БРВ, оказался МОБ-статус в момент ПР. Анализ включал в качестве исходных следующие факторы: статус МОБ в момент ремиссии, пол, возраст старше 40 лет, наличие нейролейкемии, доля бластных клеток в дебюте заболевания (более 60%), ЛДГ > 800 Ед/мл, лейкоцитоз более 100×10⁹/л, риск по ELN-2017, цитогенетический риск, наличие мутации FLT3-ITD и аллельная нагрузка FLT3-ITD более 0,5.

Достижение МОБ-негативности в ПР существенно (в 10-12 раз) снижает риск летального исхода и рецидивов (для ОВ – относительный риск 0,09; $p=0,001$), для БРВ – 0,16; $p = 0,0002$).

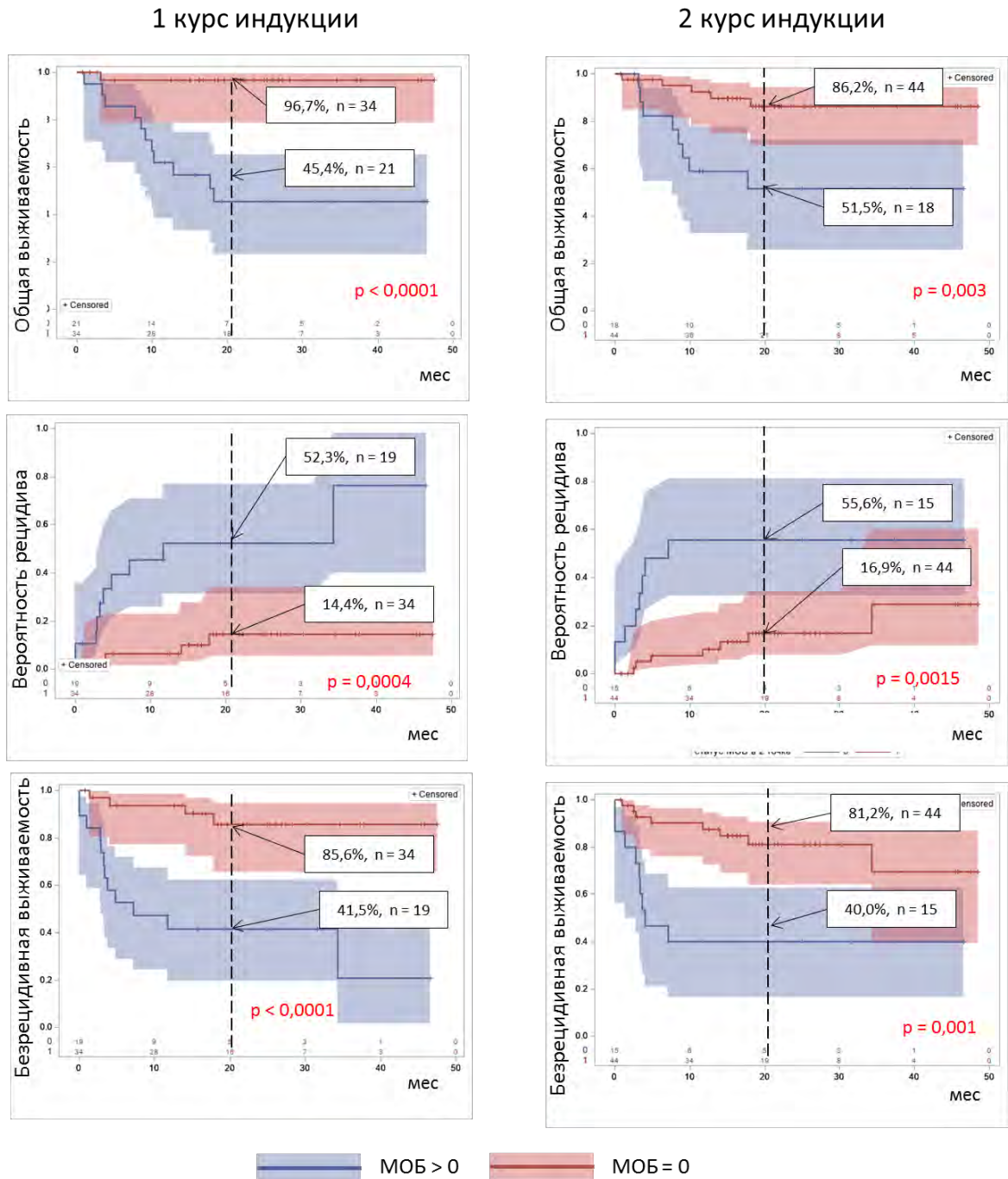


Рисунок 38 – ОВ, ВРР, БРВ у больных ОМЛ в ПР в зависимости от МОБ-статуса после 1-го и 2-го курсов индукции

В Таблице 13 представлена частота достижения МОБ-негативного статуса в группах риска ELN после первого и после второго курса индукции. Частоты достижения МОБ-негативного статуса после первого и после второго курса ассоциированы с группой риска ELN.

Таблица 13 – Частота достижения МОБ-негативного статуса в группах риска ELN после первого и после второго курса индукции

МОБ-статус	Группа риска ELN			p
	Благоприятный	Промежуточный	Неблагоприятный	
МОБ ⁻ после 1 курса	24/30 (80%)	10/18 (56%)	4/12 (33%)	0,013
МОБ ⁻ после 2 курса	22/27 (81%)	17/24 (71%)	5/11 (45%)	0,09

Далее было проведено исследование факторов, влияющих на отдаленный прогноз заболевания. По литературным данным известно, что наиболее информативным прогностическим фактором является группа риска ELN, поэтому на основе регрессионной модели Кокса исследовано сочетанное влияние ключевых факторов на БРВ: группы риска ELN-17, время достижения МОБ-отрицательности (после 1-го курса). На графике, отображающем гипотетические (модельные) оценки БРВ в зависимости от сочетаний значений этих факторов, видно, что достижение МОБ-негативности фактически нивелирует значение фактора по риску ELN-17 на момент начала терапии (высокий риск МОБ положительного статуса, ОР = 5,5 (ДИ 2–14,7), p=0,0007) (Рисунок 39).

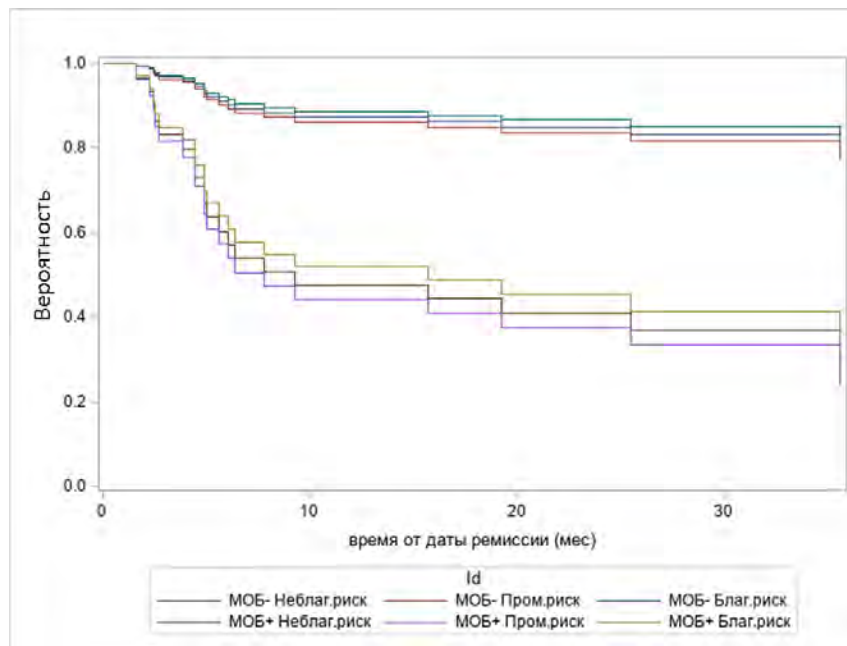


Рисунок 39 – Модельные оценки БРВ больных в ПР с МОБ-негативным и МОБ-позитивным статусом после 1-го курса индукции из разных групп риска ELN-17

Таким образом, обнаружение МОБ, т.е. положительный МОБ-статус, после индукционных курсов ассоциируется с худшей ОВ, БРВ, ВРР больных и увеличивает риск развития рецидивов, а МОБ-негативный статус после 1-го курса индукции нивелирует значение фактора по риску ELN-17 на момент начала терапии.

Оптимальный временной регламент измерения МОБ у больных ОМЛ.

Определение порогового значения МОБ для оценки статуса МОБ

Измерение МОБ и оценка МОБ-статуса методом проточной цитометрии сопряжено со значительными финансовыми затратами, поэтому минимизация количества проводимых исследований и выбор оптимальных контрольных точек исследования является актуальным. Исходя из описанных ранее результатов, МОБ-положительный статус после 1-го и после 2-го курсов оказался фактором неблагоприятного прогноза долгосрочных результатов терапии ОМЛ. Поэтому встали следующие вопросы: какая из этих точек определения МОБ более

информативная, и можно ли ограничиться одним измерением. Кроме этого остается вопрос уточнения клинически значимого порога для вынесения уверенного заключения о МОБ-положительном статусе.

В качестве первого шага оценки прогностической значимости МОБ-статуса в 1-й и 2-й контрольной точке для предсказания рисков неблагоприятных событий после 2-й контрольной точки мы сравнили оценки ОВ и БРВ в 4 группах.

Сочетание МОБ статусов в двух контрольных точках определяет следующие четыре группы больных ОМЛ:

1) больные, у которых подтверждался МОБ-негативный статус и после 1-го, и после 2-го курсов индукции ($МОБ_{1,2}=0$), $n=30$;

2) больные, с МОБ положительным статусом и после 1-го, и после 2-го курсов ($МОБ_{1,2} > 0$), $n=11$;

3) больные, у которых МОБ выявлялась после 1-го курса, но не выявлялась после 2-го курса ($МОБ_1 > 0$), $n=8$;

4) больные, у которых МОБ выявлялась после 2-го курса, но не выявлялась после 1-го курса ($МОБ_2 > 0$), $n=4$.

В этом анализе проверялась основная базовая гипотеза: для событий после 2-й контрольной точки имеет ли остаточную информативность предыдущий МОБ-статус, т.е. статус в предыдущей точке или важен только текущий статус, достигнутый ко 2-й точке.

Оценки ОВ, БРВ и ВРР этих групп больных показаны на Рисунке 31, точка отсчета временных интервалов (ланд-марк) – на момент восстановления показателей периферической крови после 2-го курса. Для оценки выживаемости и рецидива взята точка 30 месяцев, так как 2/3 больных ОМЛ, включенных в исследование оставались еще под наблюдением, а оценки выживаемости уже достоверно различались.

Наиболее благоприятный прогноз отмечался у больных ОМЛ, у которых МОБ не определялась ни после 1-го, ни после 2-го курсов индукции. ОВ к 30 мес. этой группы больных составила 100%, БРВ – 90,5%, а ВРР – 0,9%. При обнаружении МОБ характеристики клинического исхода были значимо хуже вне

зависимости от того, когда МОБ была выявлена – после 1-го курса, после 2-го курса или после обоих курсов индукции (Рисунок 40). Так, ВРР на 30 мес. после начала 2-го курса у больных с $МОБ_{1,2} > 0$ составила 56%, при $МОБ_1 > 0$ ВРР составила 52%, при $МОБ_2 > 0$ – 50%. ОВ у больных с $МОБ_{1,2} > 0$ составила 53%, при $МОБ_1 > 0$ ОВ составила 33,3%, при $МОБ_2 > 0$ – 66,7%.

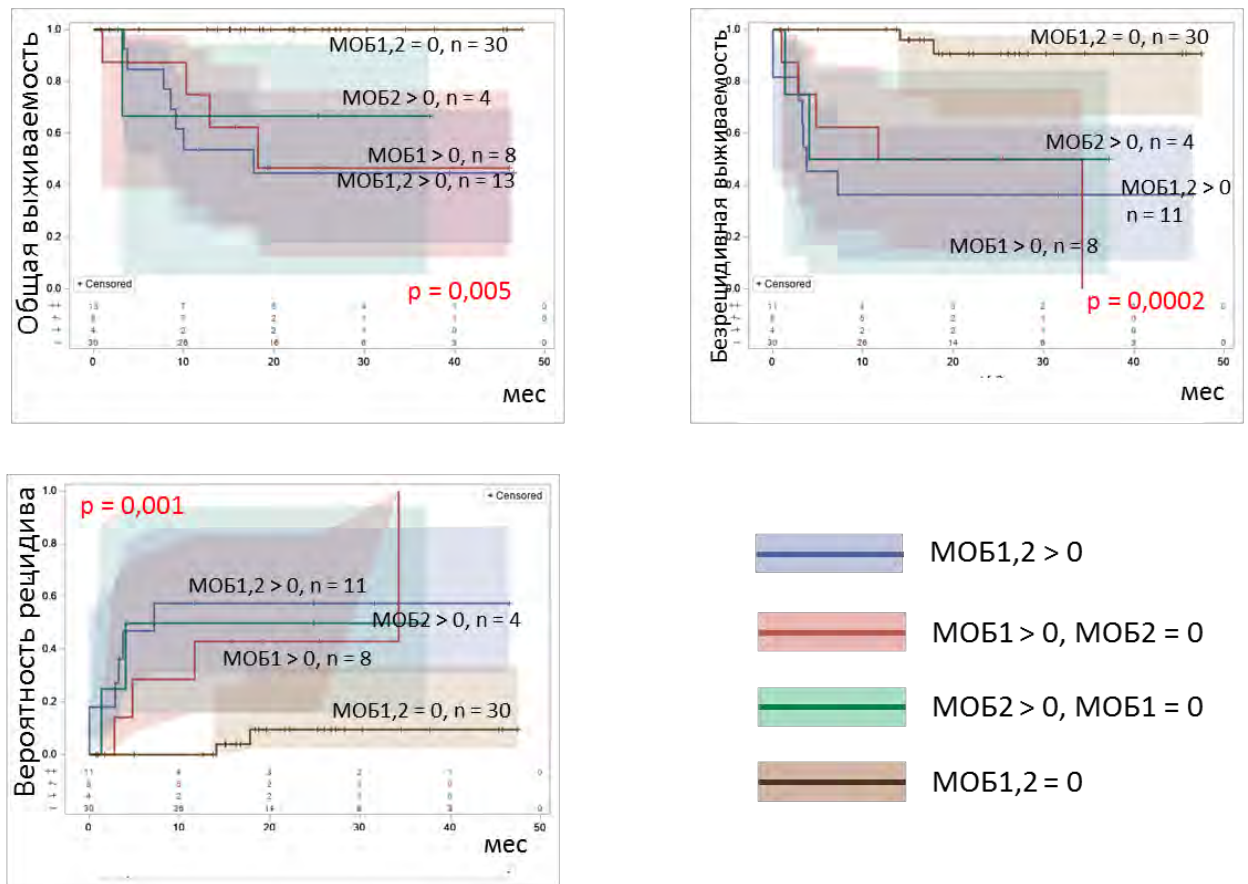


Рисунок 40 – ОВ, БРВ, ВРР у больных ОМЛ в ПР в зависимости от сочетания МОБ-статусов после 1-го и 2-го курсов индукции, время – на момент восстановления показателей периферической крови после 2-го курса

На основании анализа оценок, приведенных на Рисунке 40 можно прийти к достаточно уверенному выводу, что раннее достижение и сохранение МОБ-отрицательности значительно улучшает прогноз. Недостижение или позднее достижение МОБ-отрицательности не сильно отличается по прогнозу риска неблагоприятных событий.

Изучение сравнительной прогностической значимости 1-го и 2-го измерения МОБ было продолжено на двухфакторной модели Кокса. Дополнительно на ней также был изучен вопрос о возможности уточнения порога заключения о МОБ положительности. В Таблице 14 приведены результаты двухфакторной регрессионной модели Кокса с включением измерений значений МОБ после 1-го и 2-го курсов у больных ОМЛ. Показано, что МОБ-положительный статус в первой контрольной точке увеличивает риск неблагоприятного события в 1,68 раза, а МОБ-положительный статус после 2-го курса индукции увеличивает риск неблагоприятного события в 1,63 раза.

Таблица 14 – Результаты двухфакторной регрессионной модели Кокса с включением измерений уровня МОБ после 1-го и 2-го курсов у больных ОМЛ

курс	Фактор	Относительный риск*	p
1	логарифм МОБ после 1-го курса	1,68	0,013
2	логарифм МОБ после 2-го курса	1,63	0,014

*Относительный риск показывает во сколько раз повышается вероятность неблагоприятного события при условии наличия этого фактора

Как видно из Таблицы 14, относительный риск, показывающий вес факторов, входящих в прогностическую модель для МОБ-1 и МОБ-2 примерно одинаков. Значит, несмотря на то, что прогнозируются вероятности неблагоприятных исходов после 2-й контрольной точки, информация о МОБ в первой точке столь же важна. Это подтверждает результаты анализа на основе Каплан-Мейера оценок выживаемости в 4 группах по статусу МОБ. С помощью оценок Каплан-Мейера и модели Кокса в нашем случае решали одну задачу двухфакторного анализа, в ходе которого проверялся и оценивался вклад в прогностическую модель измерения МОБ в 1-й и 2-й точках терапии на этапе индукции. И гипотеза, что измерение МОБ во 2-й точке нивелирует прогностическое значение измерения в 1-й точке, не подтвердилась.

Если обобщить, невозможно сделать окончательный вывод о том, что измерение МОБ в какой-то одной точке является исчерпывающим и обладает максимальной прогностической значимостью. Необходимо оценивать МОБ-статус у больных ОМЛ в двух точках: после 1-го и 2-го курсов терапии. Как видно на Рисунке 40, фактически формируется две группы: МОБ-негативные в 1-й и 2-й точках и все остальные больные.

Для определения пороговых значений МОБ при ОМЛ были также использованы специальные методы рок-анализа – «ROC-survival», который является выходом из Кокс-анализа.

В нашем случае, для проведения «ROC-survival» в качестве стартовой точки для вычисления интервала времени до неблагоприятного события (рецидив или смерть) была взята дата восстановления показателей периферической крови после 2-го курса, контрольная временная точка построения ROC-зависимостей через 18 мес. после 2-го курса. Факторы, включенные в ROC-логистическую модель – логарифмы от значений МОБ после 1-го и 2-го курсов. Временная точка прогноза жизненного статуса и наличия рецидивов была принята временная точка 18 месяцев, соответствующая точке с наибольшей площадью под ROC-кривой. Результаты анализа представлены на Рисунке 41.

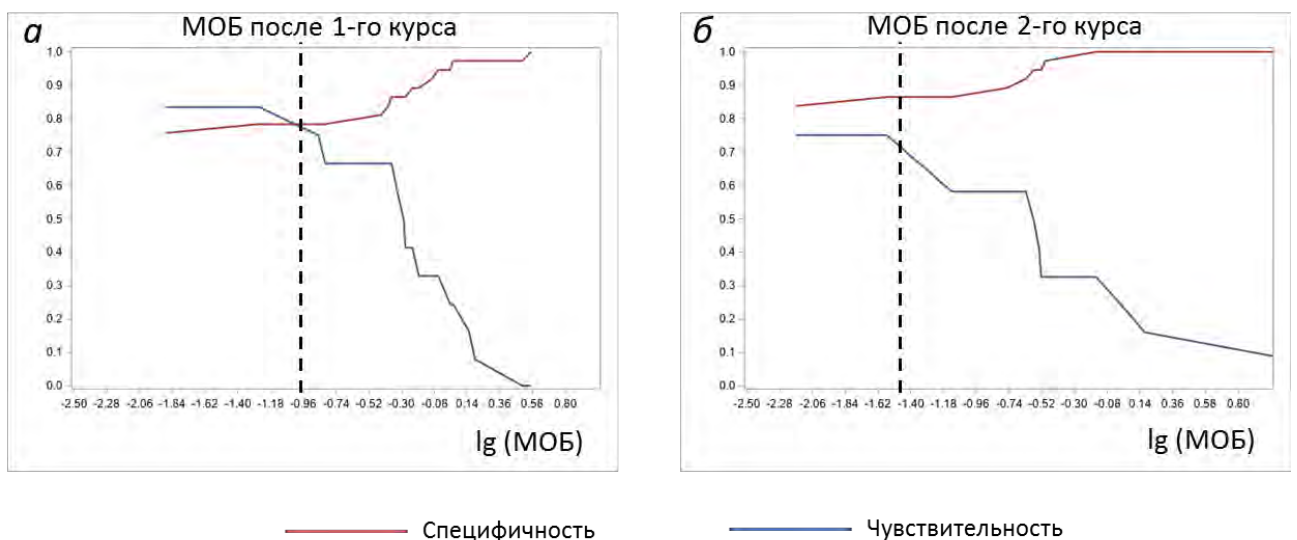


Рисунок 41 – Результаты «ROC-survival» анализа. Чувствительность и специфичность 18-месячного прогноза БРВ в зависимости от порога определения МОБ-статуса, а) после 1-го курса индукции; б) после 2-го курса индукции

На Рисунке 41а до отметки 0,1% ($\lg(\text{МОБ}\%) = -1,0$), чувствительность и специфичность изменяются мало, но при увеличении порога выше 0,1% ($\lg(\text{МОБ}\%) = -1,0$) чувствительность достаточно резко начинает падать. На Рисунке 41б до отметки 0,03% ($\lg(\text{МОБ}\%) = -1,5$), чувствительность и специфичность изменяются мало, но при увеличении порога выше 0,03% чувствительность достаточно резко начинает падать. Это свидетельствует о том, что оптимальный порог МОБ находится в интервале от 0% до 0,1% или даже от 0 до 0,03% для второго измерения МОБ. После 1-го курса индукции МОБ менее 0,1% определялась лишь у трёх больных, а после 2-го курса – у 4-х. Поэтому точное определение оптимального порогового значения МОБ, который будет клинически релевантный для уверенного заключения о МОБ-положительности требует продолжение набора данных. Но можно с достаточной мерой уверенности утверждать, что он не должен быть выше 0,1%.

В различных исследованиях, приведенных ранее в обзоре литературы, пороговое значение МОБ варьирует в диапазоне от 0 до 0,1%. Кроме того порог 0,1% рекомендован в опубликованном консенсусе ELN-2017 [172]. Различия в получаемых порогах могут быть вызваны многими причинами, такими как: разная интенсивность химиотерапевтических подходов, разные контрольные точки исследования, применяемый метод исследования (ПЦР или проточная цитометрия), квалификация сотрудников, оценивающих МОБ, наборы моноклональных антител, а также методология исследования МОБ. На выбор порога могут оказать влияние «веса» ошибок 1-го и 2-го рода, т.е. ложного заключения о положительном статусе МОБ и пропуске МОБ⁺ статуса, т.е. ложном заключении о МОБ⁻ статусе. Как правило, заключение о МОБ⁺ может влечь за собой, в зависимости от конкретного протокола, изменение терапевтической тактики, связанное с ее интенсификацией. Поэтому цена ошибки ложного заключения о МОБ⁺ статусе может быть выше, чем ошибки пропуска. Ответственность и консервативность заключения о МОБ⁺ статусе влечет за собой осторожность в снижении порога.

В зарубежной и отечественной литературе мы не обнаружили работ, посвященных необходимости детекции МОБ в двух точках на этапе индукции/консолидации. Ряд авторов доказывали необходимость мониторинга МОБ двумя методами ПЦР и МПЦ, но в одной точке исследования [196].

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно заключить, что оптимальным является исследование МОБ в двух точках протокола «ОМЛ-2017» – в конце 1-го и 2-го курсов индукции. Выявление МОБ в любой из этих точек исследования является крайне неблагоприятным фактором и ассоциировано с высоким риском рецидива. Пороговое значение МОБ не превышает 0,1%, и для его конкретизации необходимо проведение дальнейшего сбора данных и анализа.

4.8. Минимальная остаточная болезнь и результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови у больных острыми лейкозами

В исследование был включен 241 больной острыми лейкозами (ОМЛ – 143 больных, ОЛЛ – 98 больных). Пятилетняя ОВ у больных ОМЛ составила 71%, БРВ и ВРР в течение пяти лет после алло-ТГСК были 59% и 23% соответственно. Пятилетняя ОВ у больных ОЛЛ составила 57%, БРВ и ВРР в течение пяти лет после алло-ТГСК были 50% и 30% соответственно (Рисунок 42).

ОМЛ

ОЛЛ

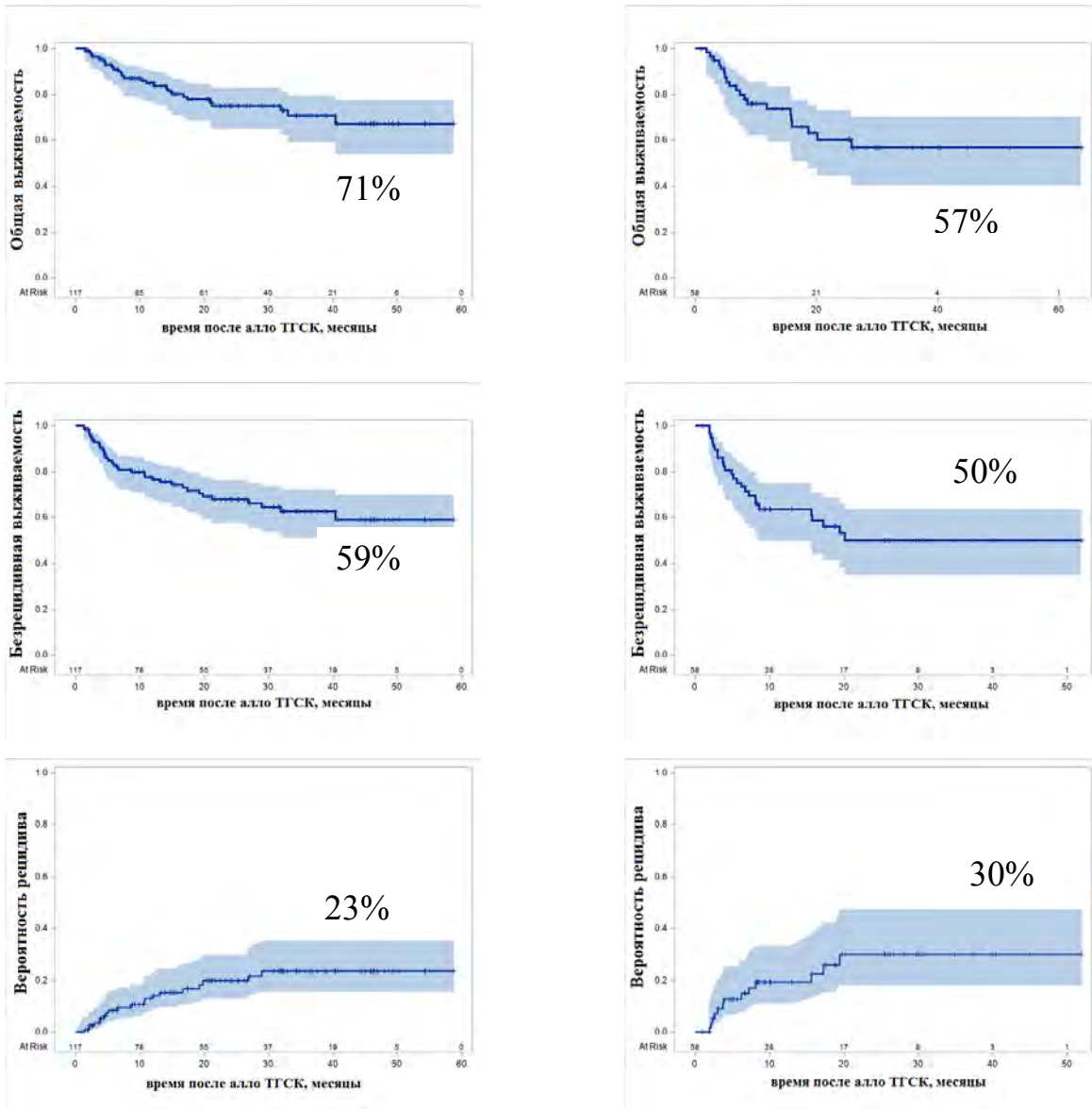


Рисунок 42 – ОВ, БРВ, ВРР у больных ОМЛ и ОЛЛ после выполнения алло-ТГСК

На вероятность развития рецидива после алло-ТГСК у больных острыми лейкозами может влиять множество факторов, таких как возраст, статус заболевания на момент выполнения алло-ТГСК, интенсивность проведенной предтрансплантационной подготовки, вид донора, источник трансплантата, режим иммуносупрессивной терапии, а также МОБ-статус перед алло-ТГСК [183;

184]. Влияние каждого из вышеперечисленных факторов на вероятность развития рецидива после алло-ТГСК было изучено у больных ОМЛ и ОЛЛ.

Результаты алло-ТГСК у больных острыми миелоидными лейкозами в первой полной ремиссии в зависимости от предтрансплантационного МОБ-статуса

Перед алло-ТГСК у 35 больных ОМЛ (35/143, 24%) была выявлена МОБ. Перед алло-ТГСК у 108 больных ОМЛ был МОБ-негативный статус, у 8 из них впоследствии был констатирован рецидив заболевания (8,5%).

Для определения влияния МОБ-статуса на долгосрочные результаты алло-ТГСК мы включили в анализируемую группу больных только в 1-ой ПР (группа больных во 2-й и 3-й ремиссии малочисленна). В 1-ой ПР на момент выполнения трансплантации были 117 больных ОМЛ. МОБ-позитивный статус был установлен для 23 больных (19,7%) и на разных сроках после алло-ТГСК у 12 из них был выявлен рецидив заболевания (52%).

Для проведения однофакторного анализа были выбраны объективные биологические и клинические факторы, известные на момент алло-ТГСК (в точке «0»). Методом однофакторного событийного анализа рассматривалась связь вероятности развития рецидива в зависимости от перечисленных ниже факторов, мы убедились, что при ОМЛ МОБ-позитивный статус перед алло-ТГСК был наиболее ассоциирован с неблагоприятным прогнозом (ОР 10,249 [95% ДИ 4,137-25,388], $p < 0,0001$) (Таблица 15).

Таблица 15 – Влияние различных факторов на ВРР после алло-ТГСК у больных ОМЛ в 1-й ПР (однофакторный анализ)

Фактор	ОР	95% ДИ	p
МОБ перед алло-ТГСК	10,249	4,137-25,388	<0,0001
ELN риск	4,693	2,025-10,875	0,0003
Возраст (>40 лет)	0,759	0,291-1,975	0,5713
Режим кондиционирования (MAC/RIC)	1,120	0,458-2,743	0,8037
Вид донора (совместимый vs гаплоидентичный)	3,032	0,590-11,196	0,1430
(частично-совместимый vs гаплоидентичный)	1,180	0,695-13,235	0,8693
Источник трансплантата (КМ/СКК)	2,072	0,406-0,991	0,1864
Время до выполнения алло ТГСК от даты 1-ой ПР (более 6 мес./менее 6,5 мес.)	0,218	0,073-0,654	<0,0066

При выполнении пошагового многофакторного анализа, в который были включены в качестве исходных все перечисленные выше факторы, в модель как значимые факторы (на уровне $p < 0,05$) были отобраны «МОБ перед алло-ТГСК», ELN-риск и источник трансплантата (КМ/СКК) (Таблица 16).

Таблица 16 – Влияние различных факторов на ВРР после алло-ТГСК у пациентов с ОМЛ в 1-ой ПР (многофакторный анализ)

Фактор	ОР	95% ДИ	p
МОБ перед алло-ТГСК	9,161	3,513-23,652	<0,0001
ELN-риск	4,423	1,764-11,092	<0,0034
Источник трансплантата (КМ/СКК)	3,068	1,188-7,924	<0,0156

При этом наиболее значимым и «сильнодействующим» независимым фактором неблагоприятного прогноза является «МОБ перед алло-ТГСК» (ОР=9,2, $p < 0,0001$).

Трехлетняя общая и безрецидивная выживаемость больных ОМЛ в 1-ой ПР с МОБ-позитивным статусом были достоверно хуже, чем у больных с МОБ-негативным статусом (ОВ: 43% против 78%, $p = 0,0004$; БРВ: 26% против 67%, $p < 0,0001$) (Рисунок 34 а, б). Вероятность развития рецидива у больных ОМЛ с МОБ⁺ статусом перед алло-ТГСК значимо выше, чем у больных с МОБ⁻ статусом (69% против 13%, $p < 0,0001$) (Рисунок 43 в).

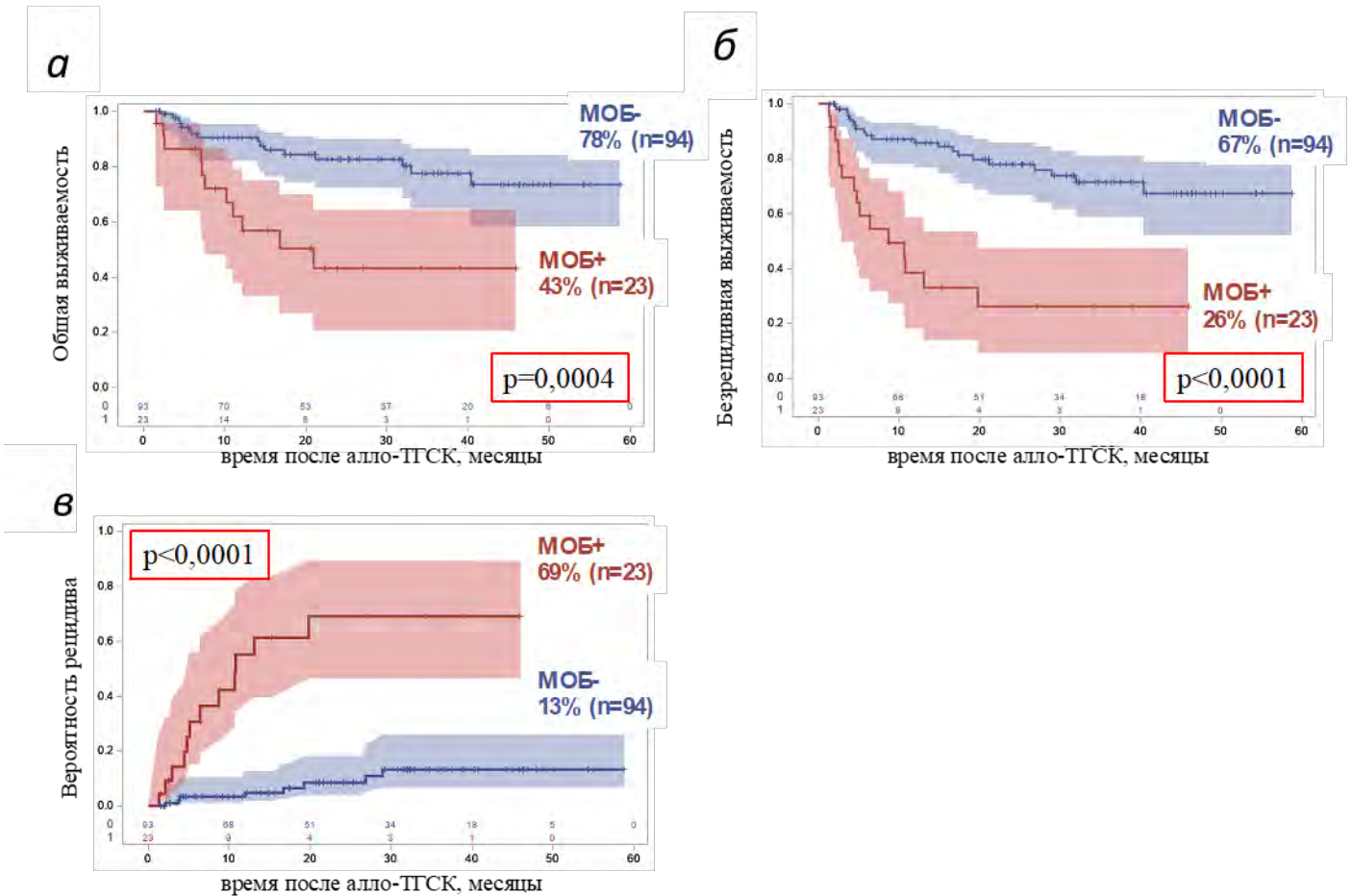


Рисунок 43 – ОВ, БРВ, ВРР в течение 3-х лет (в) у больных ОМЛ в 1-ой ПР в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК

Немногочисленные исследователи обращали внимание на возможное влияние времени выполнения алло-ТГСК [79; 80]. Поэтому отдельно было проанализировано влияние времени от момента достижения 1-ой ПР до выполнения алло-ТГСК у больных ОМЛ.

Для иллюстрации возможной связи времени выполнения алло-ТГСК мы преобразовали этот признак в бинарный, сравнивая это время с медианой в группе больных ОМЛ. В Таблице 17 представлены статистические характеристики распределения времени выполнения алло ТГСК в группе больных ОМЛ.

Таблица 17 – Время до выполнения алло-ТГСК (месяцы) у больных ОМЛ

Диагнозы	N	Min	25% квантиль	Медиана	75% квантиль	Max	Среднее
ОМЛ	117	0,59	4,2	6,49	8,46	25,48	6,94

Для дальнейшего анализа больные были разделены на 2 группы – группа с временем ожидания до алло ТГСК менее 6,5 месяцев (медиана времени до трансплантации) и более 6,5 месяцев (Рисунок 44).

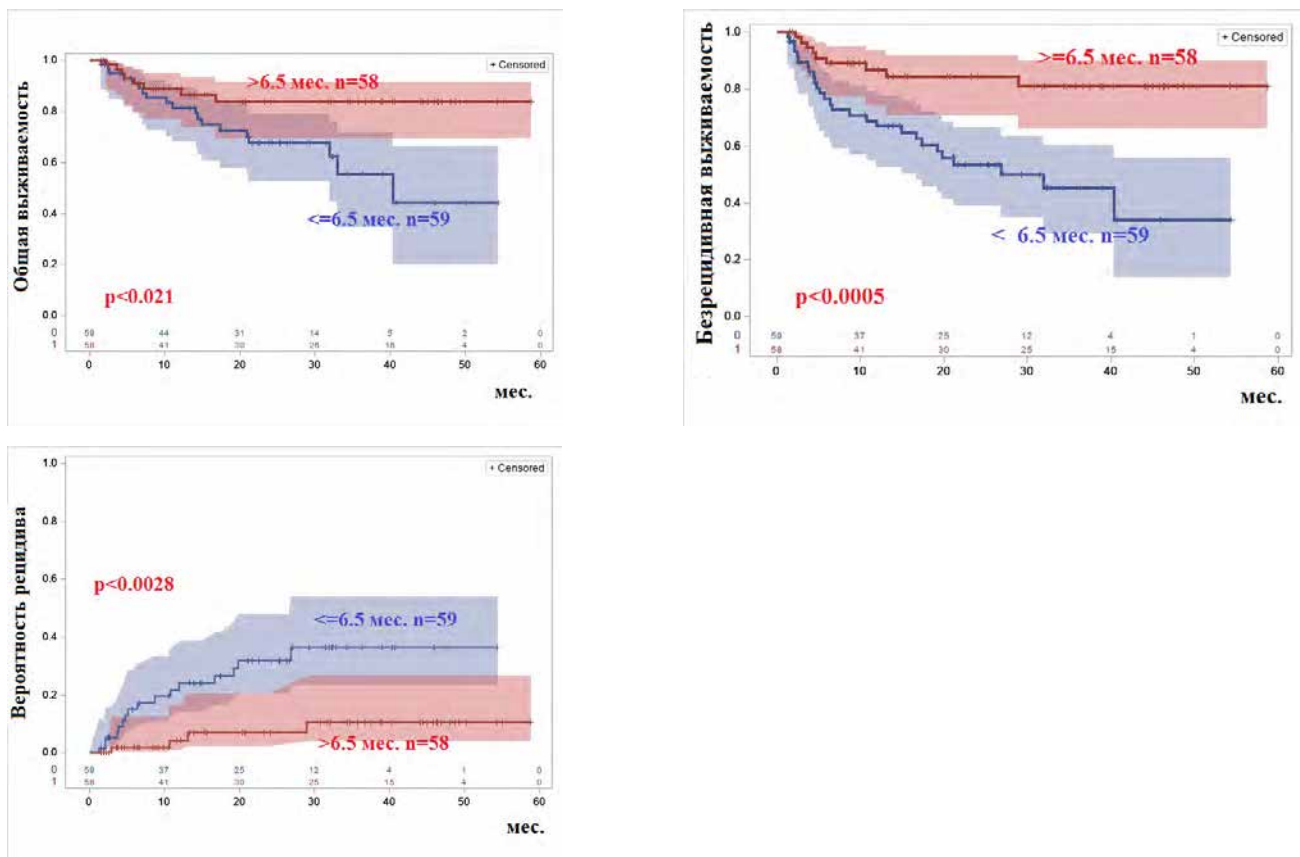


Рисунок 44 – ОВ, БРВ и ВРР у больных ОМЛ в 1-ой ПР в зависимости от времени до алло-ТГСК (более или менее 6,5 месяцев от момента достижения 1-ой ПР)

ОВ, БРВ, ВРР на сроке 40 месяцев после выполнения алло-ТГСК составили 43%, 26% и 69% в группе больных, у которых время до выполнения до алло-ТГСК составило менее 6,5 месяцев, и соответственно 77%, 71% и 13% в группе больных, у которых время до выполнения алло-ТГСК составило более 6,5 месяцев.

Таким образом, группа больных ОМЛ, у которой был относительно большой интервал между 1-ой ПР и алло-ТГСК оказалась более благополучной в плане долгосрочных результатов – по ОВ, БРВ, ВР. Это в некоторой степени противоречит ожиданиям. Однако, т.к. время до алло-ТГСК не является параметром рандомизации в клиническом исследовании, а результатом выполнения протокола, то группы с разным временем до алло-ТГСК могли получиться не сбалансированными в отношении факторов риска, что и было подтверждено при дальнейшем анализе.

Полученные результаты можно объяснить изменением состава группы за время ожидания алло ТГСК. Происходит определенная временная селекция, то есть отбор больных с длительным временем до трансплантации – преимущественно “благополучные больные”, у которых за время ожидания алло ТГСК не произошли неблагоприятные события. Это группа больных с ожиданием трансплантации более 6,5 месяцев, где доля больных с положительным МОБ статусом перед алло-ТГСК составила 12% (n=7). В группе больных с временем ожидания алло-ТГСК менее 6,5 месяцев доля больных с МОБ положительным статусом составила 28% (n=16) (p<0,04). В группе с ожиданием трансплантации более 6,5 месяцев доля больных с неблагоприятным риском по ELN составила 16% (n=9), а в группе с временем ожидания алло ТГСК менее 6,5 месяцев доля больных из неблагоприятной группы риска ELN была существенно выше и составила 40% (n=23) (p<0,01). Вероятно, больным с неблагоприятным прогнозом выполняют трансплантацию в более ранние сроки, а в случае невозможности реализации данного метода лечения у части больных из группы неблагоприятного прогноза возникают ранние рецидивы/смерти.

Таким образом, можно сделать вывод, что наличие детектируемой МОБ непосредственно перед алло-ТГСК является независимым и наиболее информативным прогностическим фактором развития рецидива заболевания после алло ТГСК, а время до алло-ТГСК связано с выживаемостью после алло-ТГСК и ассоциировано с основными факторами риска: наличием или отсутствием МОБ и риском ELN.

Летальность, не связанная с рецидивом, может существенным образом повлиять на регистрируемую частоту рецидивов. Очевидно, высокая ранняя летальность не позволяет некоторым больным дожить до рецидива, поэтому формально может неверно интерпретирована как «благоприятный» фактор. И признаки, повышающие раннюю летальность, также могут быть неверно толкованы как благоприятные по отношению к риску рецидива. В событийном анализе это явление называется конкурирующими рисками. Летальность, не связанная с рецидивом, является отношению к рецидиву конкурирующим риском.

Для выяснения вопроса нет ли косвенного влияния МОБ-статуса на рецидивы через связь с ранней летальностью был выполнен анализ рисков рецидива и летальности, не связанной с рецидивом, как конкурирующих рисков. Было показано, что от предтрансплантационного МОБ-статуса напрямую зависит риск рецидива (Тест Грея $p < 0,0001$ для ОМЛ), но нет достоверной зависимости риска летальности, не связанной с рецидивом (Тест Грея $p = 0,88$ для ОМЛ) (Рисунок 45).

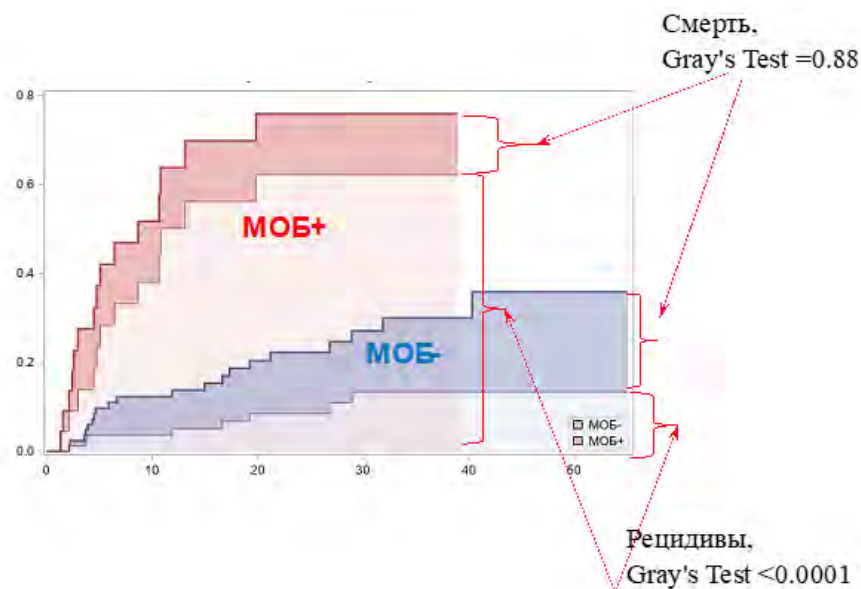


Рисунок 45 – Анализ вероятности рецидива и летальности, не связанной с рецидивом, как конкурирующих рисков после алло-ТГСК в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК. Представлена кумулятивная частота конкурирующих событий в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК у больных ОМЛ

Полученные результаты подтверждаются данными зарубежных исследований. Например, Ключников Е. и соавторы в своей работе продемонстрировали, что выявление МОБ перед алло-ТГСК методом МПЦ у больных ОМЛ ассоциировано с высокой вероятностью развития рецидива вне зависимости от количества выявленных клеток с aberrантным фенотипом [105].

Результаты алло-ТГСК у больных острыми лимфобластными лейкозами в первой полной ремиссии в зависимости от предтрансплантационного МОБ-статуса

Перед алло-ТГСК МОБ была детектирована у 24 больного ОЛЛ (24/98, 24%). Для определения влияния МОБ-статуса на долгосрочные результаты алло-ТГСК мы включили в анализируемую группу больных только в 1-ой ПР (группа больных во 2-й и 3-й ремиссии малочисленна).

Используя методы однофакторного событийного анализа для определения связи вероятности развития рецидива с основными факторами риска у больных ОЛЛ мы подтвердили, что МОБ-позитивный статус перед алло-ТГСК (ОР=3,858 [95% ДИ 1,717-8,668], $p=0,0011$) был наиболее ассоциирован с неблагоприятным прогнозом (Таблица 18).

Таблица 18 – Влияние различных факторов на ВРР после алло-ТГСК у больных ОЛЛ в 1-ой ПР (однофакторный анализ)

Фактор	ОР	ДИ %	<i>p</i>
МОБ перед алло-ТГСК	4,180	1,333-13,112	0,0142
Возраст (>40 лет)	0,785	0,173-3,554	0,7532
Режим кондиционирования (MAC/RIC)	1,281	0,418-3,919	0,6648
Вид донора (совместимый vs гаплоидентичный)	1,172	0,291-3,663	0,8233
(частично-совместимый vs гаплоидентичный)	1,135	0,291-4,724	0,8693
Источник трансплантата (КМ/СКК)	2,381	0,798-7,101	0,1197
Время до выполнения алло-ТГСК (более 6 мес./менее 6,5 мес.)	0,975	0,327-2,907	0,9635

При выполнении пошагового многофакторного анализа, в который были включены все выше перечисленные факторы, был отобран в модель в качестве значимого только такой фактор (на уровне $p < 0,05$), как «МОБ перед алло-ТГСК» для ОЛЛ ($p = 0,0005$).

Таким образом, наличие детектируемой МОБ непосредственно перед алло-ТГСК является независимым прогностическим фактором развития рецидива заболевания у больных ОЛЛ, который может использоваться для стратификации риска алло-ТГСК.

Отдельно было проанализировано влияние времени от момента достижения 1-ой ПР до выполнения алло-ТГСК у больных ОЛЛ. Для анализа и иллюстрации возможной связи времени выполнения алло-ТГСК мы преобразовали этот признак в бинарный, сравнивая это время с медианой в группе больных ОЛЛ. В Таблице 19 представлены статистические характеристики распределения времени выполнения алло-ТГСК в группе больных ОЛЛ.

Таблица 19 – Время до выполнения алло-ТГСК (месяцы) у больных ОЛЛ

Диагнозы	N	Min	25% квантиль	Медиана	75% квантиль	Max	Среднее
ОЛЛ	58	1,9	5,51	6,9	8,72	25,21	8,07

Для дальнейшего анализа больные ОЛЛ были разделены на 2 группы – группа с временем ожидания до алло ТГСК менее 6,9 месяцев (медиана времени до трансплантации) и более 6,9 месяцев от момента достижения 1-ой ПР.

В зависимости от времени до выполнения алло ТГСК был выполнен ландмарк анализ общей, безрецидивной выживаемости и вероятности развития рецидива у больных ОЛЛ (Рисунок 46).

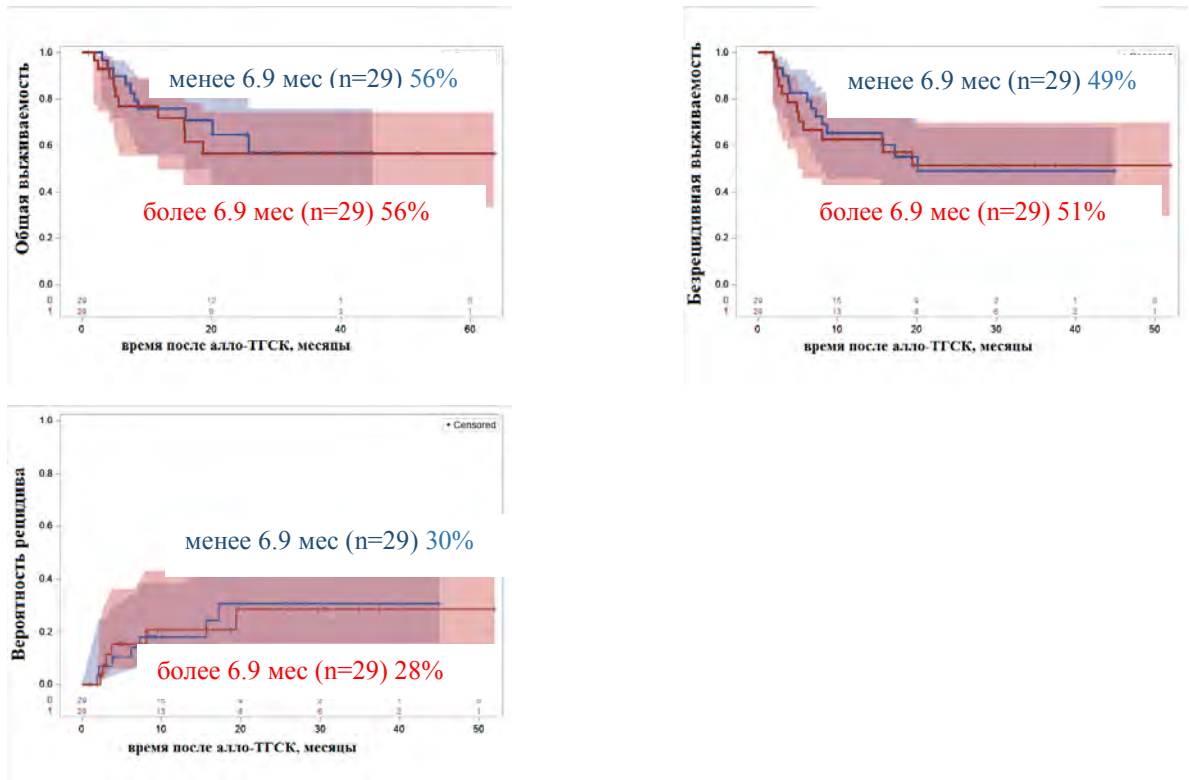


Рисунок 46 – ОВ, БРВ и ВРР у больных ОЛЛ в 1-ой ПР в зависимости от времени до алло-ТГСК (более или менее 6,9 месяцев от момента достижения 1-ой ПР).

ОВ, БРВ, ВРР на сроке 40 мес. после выполнения алло-ТГСК составили 56%, 49% и 30% в группе больных, у которых время до выполнения до алло-ТГСК составило менее 6,9 месяцев, и 56%, 51% и 28% в группе больных, у которых время до выполнения алло-ТГСК составило более 6,9 месяцев соответственно. Таким образом, не было выявлено связи между временем до аллоТГКС и выживаемостью после аллоТГСК у больных ОЛЛ.

Для определения влияния МОБ-статуса на долгосрочные результаты алло-ТГСК мы включили в анализируемую группу больных только в 1-ой ПР (группа больных во 2-й и 3-й ремиссии малочисленна). На момент выполнения алло-ТГСК из 84 больных ОЛЛ 58 были в 1-ой ПР заболевания. МОБ⁺ статус был установлен у 10 больных (17,2%). ОВ МОБ-позитивных больных ОЛЛ хотя и была существенно хуже, но достоверно не отличалась от МОБ-негативных больных, которым была выполнена алло-ТГСК в 1-ой ПР (28% против 78%, $p=0,09$)

(Рисунок 47 а). Были обнаружены достоверные различия в БРВ МОБ⁺ и МОБ⁻ больных: 20% против 56% ($p=0,0317$) (Рисунок 47 б). Вероятность развития рецидива также была достоверно выше у МОБ⁺ больных ОЛЛ 73% против 22% у МОБ⁻ больных ($p=0,0079$) (Рисунок 47 в).

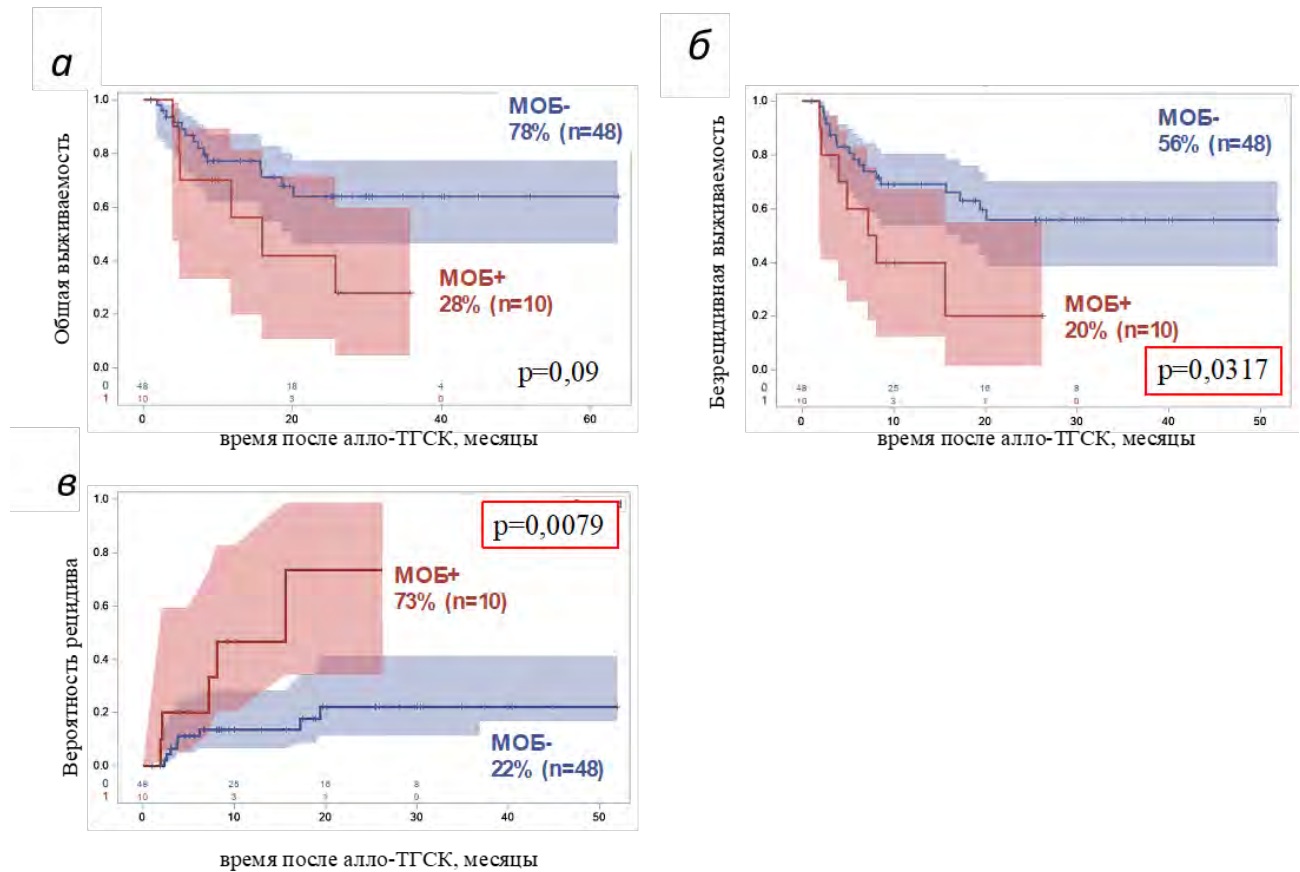


Рисунок 47 – ОВ, БРВ и ВРР в течение 3-х лет (в) у больных ОЛЛ в первой ПР в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК

Так же, как и для ОМЛ, был выполнен анализ развития рецидива и летальности, не связанной с рецидивом, как конкурирующих рисков. Было показано, что от предтрансплантационного МОБ-статуса напрямую зависит именно риск рецидива (Тест Грея $p<0,0001$ для ОМЛ, $p=0,013$ для ОЛЛ), но нет достоверной зависимости риска летальности, не связанной с рецидивом (Тест Грея $p=0,88$ для ОМЛ, $0,86$ для ОЛЛ) (Рисунок 48).

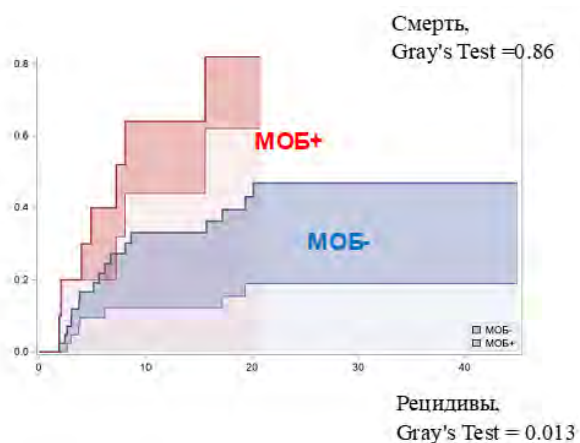


Рисунок 48 – Анализ вероятности рецидива и смертности, не связанной с рецидивом, как конкурирующих рисков после алло-ТГСК в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК. Представлена кумулятивная частота конкурирующих событий в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК у больных ОЛЛ

Полученные результаты подтверждаются данными зарубежных исследований [33; 55; 78; 158].

Результаты алло-ТГСК у больных острыми лейкозами во второй и третьей ремиссии в зависимости от предтрансплантационного МОБ-статуса

При анализе долгосрочных результатов алло-ТГСК у больных ОМЛ и ОЛЛ во второй и третьей ремиссии заболевания в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК не было получено достоверных различий (Таблица 20). Таким образом, выявление МОБ перед алло-ТГСК имеет ключевое значение именно для больных ОЛ в 1-ой ремиссии.

Таблица 20 – Результаты алло-ТГСК в течение 3-х лет больных во 2-ой и 3-ей ремиссии заболевания в зависимости от наличия детектируемой МОБ перед алло-ТГСК

Диагноз	Конечная точка	<i>p</i>	ОР	95% ДИ
ОМЛ	Общая выживаемость	0,3196	2,128	0,480-9,422
	Безрецидивная выживаемость	0,2276	2,246	0,650-7,760
	Вероятность развития рецидива	0,4457	1,912	0,3857-9,476
ОЛЛ	Общая выживаемость	0,2552	1,876	0,534-6,586
	Безрецидивная выживаемость	0,1946	2,032	0,564-7,320
	Вероятность развития рецидива	0,0969	2,606	0,656-10,35

Таким образом, МОБ, определяемая с помощью МПЦ перед алло-ТГСК, зарекомендовала себя, как независимый прогностический фактор риска развития рецидива и оказывает влияние на общую и безрецидивную выживаемость, как у больных ОМЛ, так и ОЛЛ при проведении алло-ТГСК в первой ремиссии заболевания. У больных острыми лейкозами во второй и третьей ремиссии заболевания не было получено достоверных различий в выживаемости в зависимости от МОБ-статуса. Наличие МОБ перед алло-ТГСК не было ассоциировано с летальностью, не связанной с рецидивом заболевания. У больных ОМЛ время до алло ТГСК ассоциировано с выживаемостью после аллоТГСК и с основными факторами риска: наличием или отсутствием МОБ и риском ELN.

Результаты алло-ТГСК в зависимости от посттрансплантационного МОБ-статуса

В контрольные сроки после алло-ТГСК всем больным ОЛ проводилось динамическое исследование МОБ. Необходимо отметить, что МОБ-позитивных больных после алло-ТГСК было выявлено мало: на +30 день – 7 больных, на +60 – 9, на + 90 – 6, на +180 – 9 (Таблица 21).

Таблица 21 – Долгосрочные результаты мониторинга посттрансплантационного МОБ-статуса

		+30 день (n=136)	+60 день (n=124)	+90 день (n=107)	+180 день (n=70)
ОМЛ	1 ремиссия	МОБ+ (n=1) МОБ- (n=63)	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=47)	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=47)	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=26)
	2-3 ремиссия	МОБ+ (n=1) МОБ- (n=12)	МОБ+ (n=1) МОБ- (n=9)	МОБ+ (n=1) МОБ- (n=8)	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=7)
ОЛЛ	1 ремиссия	МОБ+ (n=3) МОБ- (n=31)	МОБ+ (n=3) МОБ- (n=42)	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=30)	МОБ+ (n=3) МОБ- (n=13)
	2-3 ремиссия	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=23)	МОБ+ (n=3) МОБ- (n=17)	МОБ+ (n=1) МОБ- (n=17)	МОБ+ (n=2) МОБ- (n=15)

При выявлении МОБ на +30 день после алло-ТГСК безрецидивная выживаемость МОБ⁺ больных была достоверно хуже (29% против 52%, $p=0,0035$) (Рисунок 49 а), а вероятность развития рецидива заболевания значимо выше (66% против 37%, $p=0,003$) (Рисунок 49 б), по сравнению с МОБ-негативными больными на этом сроке. У четверти МОБ-негативных после алло-ТГСК больных (34 из 129) перед алло-ТГСК был установлен МОБ-положительный статус. У 6 из 7 (85,7%) больных с МОБ-положительным на +30 день статусом МОБ выявлялась также и перед алло-ТГСК.

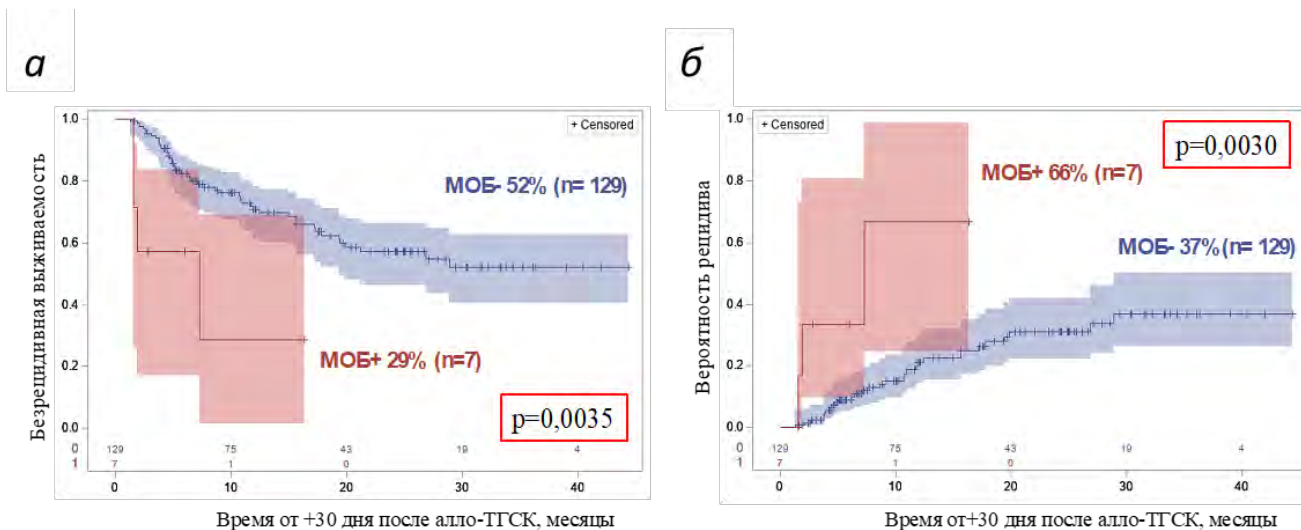


Рисунок 49 –БРВ и ВРР в зависимости от посттрансплантационного МОБ-статуса на +30 день после алло-ТГСК

Таким образом, после алло-ТГСК МОБ выявляется редко (реже, чем в 10% случаев), при этом выявление МОБ на +30 день является крайне неблагоприятным признаком. С учетом полученных результатов можно рекомендовать исследование МОБ на +30 день после алло-ТГСК больным, у которых МОБ выявлялась и перед алло-ТГСК. Вследствие высокого риска развития рецидива этим больным необходимо как можно более раннее проведение посттрансплантационной противорецидивной терапии. Зависимость долгосрочных результатов терапии от МОБ статуса на +60, +90, +180 дни после алло ТГСК еще предстоит проанализировать при наборе достаточного числа наблюдений.

Учитывая полученные данные, ключевой точкой определения МОБ с целью прогнозирования долгосрочных результатов и стратификации риска алло-ТГСК является точка «до алло-ТГСК» в 1-ой ПР. Исследование МОБ методом МПЦ может помочь выявить больных, которые нуждаются в изменении терапевтической тактики, как на этапе трансплантации (выбор донора, изменение режима кондиционирования и иммуносупрессивной терапии), так и после алло-ТГСК с использованием стратегии профилактической посттрансплантационной терапии.

4.9. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Среди основных факторов, от которых зависит успех или неуспех алло-ТГСК, выделяются МОБ-статус перед и после алло-ТГСК, а также полнота и скорость иммунной реконституции. Следовательно, исследование особенностей восстановления основных клеточных компонентов иммунной системы на ранних и поздних этапах после трансплантации, а именно, основных субпопуляций лимфоцитов представляется актуальной задачей, и анализ количественных характеристик Т-клеток, В-клеток, НК может дать дополнительную информацию о прогнозе у больных после выполнения алло-ТГСК.

В исследование включено 105 больных. Всем больным выполнили алло-ТГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с 2017 по 2019 год. Субпопуляционный состав лимфоцитов был изучен у 71 больного на +3 месяцев, у 64 больных – на +6 месяцев, у 43 больных – на +9 месяцев, у 49 – на +12 месяцев. Развернутые характеристики больных приведены в разделе «Материалы и методы». В связи с отсутствием литературных данных о различиях в динамике восстановления субпопуляций лимфоцитов после алло ТГСК на отдаленных этапах в зависимости от диагноза, а также небольшой численностью мониторируемой группы было принято решение анализировать динамику восстановления субпопуляций на всей когорте больных. Краткая характеристика больных приведена в Таблице 22.

Таблица 22 – Характеристика больных, включенных в исследование субпопуляций лимфоцитов на сроках +3, +6, +9, +12 месяцев после аллоТГСК

Схема ИСТ параметры	кИСТ	ПТ-ЦФ	ТКД
п (%)	66 (62,9%)	27 (25,5%)	12 (11,4%)
Число мужчин и женщин	30:36	15:12	4:8
Возраст – минимум-максимум (медиана), лет	21-70 (41)	24-62 (42)	20-60 (37)
Диагноз, n			
ОМЛ	36	18	8
В-ОЛЛ	11	3	2
Т-ОЛЛ	1	1	1
МДС	5	0	1
апластическая анемия:	3	0	0
В-клеточная лимфома:	2	1	0
Т-клеточная лимфома:	3	3	0
Миелофиброз:	2	1	0
хронический лимфолейкоз:	1	0	0
хронический миелолейкоз:	2	0	0
Источник трансплантата, n (%)			
КМ	48 (72,7%)	11 (40,7%)	0 (0%)
СКК	18 (27,3%)	16 (59,3%)	12 (100%)
Тип алло-ТГСК, n (%)			
родственная совместимая	35 (53%)	2 (7,4%)	0
неродственная совместимая	31 (47%)	4 (14,8%)	0
гаплоидентичная	0	1 (3,7%)	0
неродственная несовместимая	0	20 (74,1%)	12 (100%)
Кондиционирование, n (%)			
RIC	49 (74,2%)	21 (77,8%)	8 (66,7%)
MAC	17 (25,8%)	6 (22,2%)	4 (33,3%)

ИСТ проводили по схемам, в зависимости от основного заболевания, режима кондиционирования и HLA-совместимости пары «донор-реципиент». Посттрансплантационная ИСТ включала классическую ИСТ (кИСТ, n = 66), с использованием ПТ-ЦФ (n = 27) и с $\alpha\beta$ -Т-клеточной деплецией (ТКД, n = 12). У больных, включенных в исследование, за время мониторинга субпопуляционного состава лимфоцитов не было констатировано несостоятельности трансплантата, количество лейкоцитов за время мониторинга не снижалось менее 1×10^9 /л, количество гранулоцитов не снижалось менее 500.

Относительное содержание Т-клеток в периферической крови больных значимо не отличалось во всех контрольных точках, однако абсолютное количество Т-клеток было больше на +9 и +12 мес., чем на +3 и на +6 мес. Доля Т-клеток на +3 мес. была меньше нижней границы референсного интервала (< 65%) у 29 больных (40,8%), а на +12 мес. – только у 11 больных (22,4%). Абсолютное количество Т-клеток на +3 мес. было меньше нижней границы референсных значений (< $0,946 \times 10^9$ /л) у 58 больных (81,7%), на +6 мес. – у 40 больных (62,5%) и на +12 мес. – у 18 больных (36,7%) (Рисунок 50).

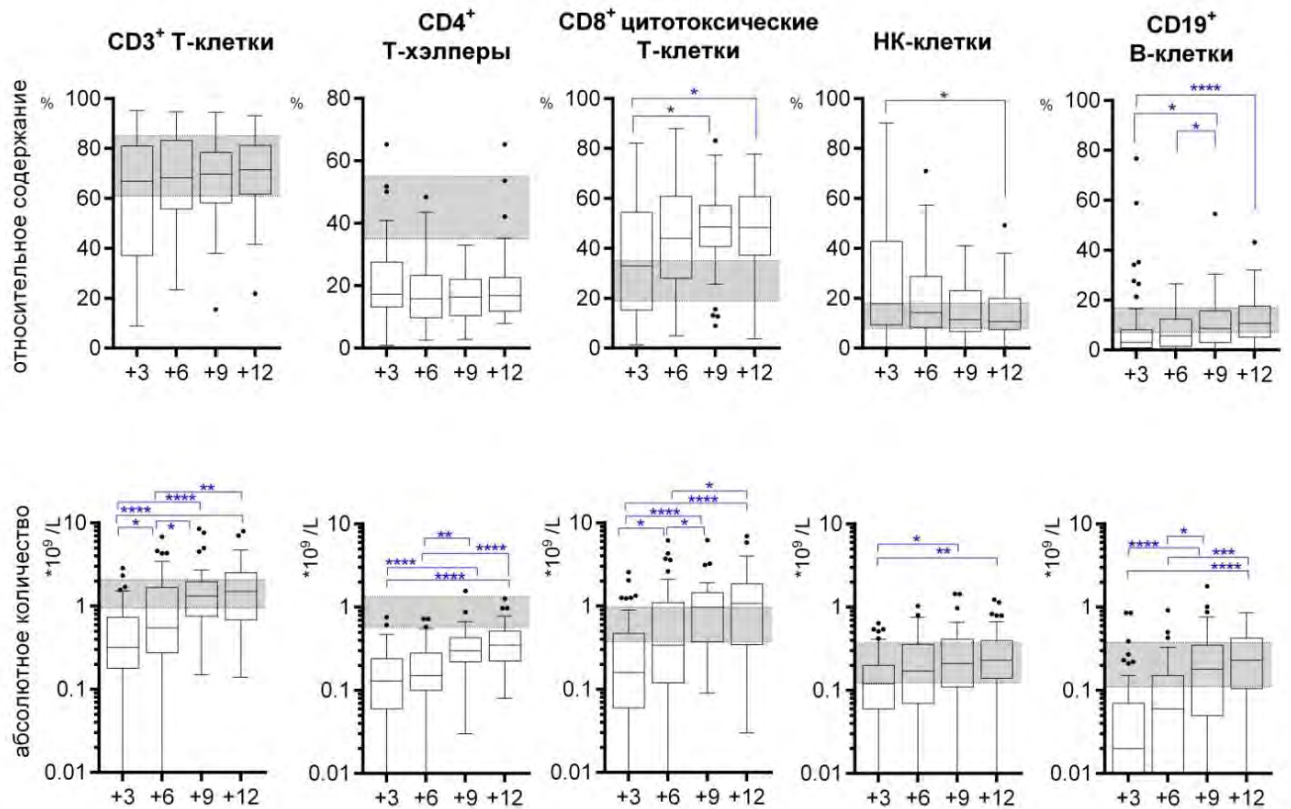


Рисунок 50 – Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов на +3, +6, +9 и +12 месяцы после алло-ТГСК. Серой полосой отмечен референсный интервал. Звездочками указано наличие достоверных отличий между группами больных: **** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$

Доля Т-хэлперов значимо не отличалась на всех сроках наблюдения, а доля CD8⁺ цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) была больше на +9 и +12 мес. по сравнению с +3 мес. На всех точках наблюдения была отмечена диспропорция субпопуляций Т-клеток: доля Т-хэлперов у большинства больных (у 85,9% – на +3 мес., у 95,3% – на +6 мес., у 100% – на +9 мес. и у 89,8% – на +12 мес.) была меньше нижней границы референсного интервала, а доля ЦТЛ – входила в референсный интервал или была выше его верхней границы. Абсолютное количество Т-хэлперов было меньше нижней границы референсного интервала практически у всех больных (у 97,2% – на +3 мес., у 95,3% – на +6 мес., у 92,0% – на +9 мес. и у 79,6% – на +12 мес.). Абсолютное количество ЦТЛ не достигало

референсных значений ($< 0,372 \times 10^9/\text{л}$) у 67,6% больных на +3 мес., у 53,1% на +6 мес., у 25,6% на +9 мес. и у 26,5% на +12 мес. (Рисунок 50).

Доля В-клеток и их абсолютное количество были ниже на +3 мес. по сравнению с +9 и +12 мес. Доля В-клеток была меньше нижней границы референсного интервала у 50 больных (70,4%) на +3 мес., и у 14 больных (28,6%) на +12 мес. Абсолютное количество В-клеток было меньше нижней границы референсного интервала у 60 больных (84,5%) на +3 мес., у 43 (67,2%) на +6 мес., у 16 (37,2%) на +9 мес., а на +12 – у 12 больных (24,5%) (Рисунок 50).

По литературным данным восстановление нормального относительного количества В-клеток может происходить уже к +3 мес. после алло-ТГСК, в то время как абсолютное количество – только к +6-12 мес. [142; 183], хотя в ряде случаев полное восстановление В-клеток может занимать до двух лет [142; 203].

Так как доля В- и Т-клеток была снижена на +3 и +6 мес., то среди лимфоцитов преобладали НК. Доля НК на +3 мес. была больше референсного интервала у 35 (49,3%) больных. На +9 и +12 мес. доля В- и Т-клеток увеличивалась, что объясняет снижение доли НК на +12 мес. по сравнению с +3 мес. Абсолютное количество НК на +3 мес. было меньше нижней границы референсного интервала ($< 0,123 \times 10^9/\text{л}$) у 52,1% больных, на +6 мес. – у 45,3%, на +9 – 30,2%, а на +12 – 20,4% (Рисунок 50).

НК – это популяция лимфоцитов, которая первая восстанавливается после алло-ТГСК. По литературным данным, у большинства больных уже к первому году после алло-ТГСК количество НК достигает нормальных значений [104; 142; 165]. Кроме того НК приобретают функциональную компетентность намного раньше, чем другие лимфоциты: В- и Т-клеткам могут потребоваться месяцы или годы, чтобы восстановить функциональную активность [13], а НК приобретают функциональную зрелость примерно через 2–4 недели после алло-ТГСК [147; 197].

Одной из задач исследования являлось изучение динамики восстановления основных субпопуляций лимфоцитов в зависимости от МОБ-статуса больных острыми лейкозами после алло-ТГСК. Однако число больных с МОБ⁺ статусом

после алло-ТГСК на всех этапах мониторинга было крайне незначительным (1-2 больных, Таблица 23), поэтому провести полноценный анализ не представлялось возможным.

Таблица 23 – МОБ-статус в контрольные точки после алло-ТГСК для больных с выполненным иммунным статусом

МОБ-статус	+3 мес. n=19	+6 мес. n=21	+9 мес. n=8	+12 мес. n=10
МОБ+	1	2	0	1
МОБ-	18	19	8	9

4.10. Субпопуляционный состав лимфоцитов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и вероятность регоспитализаций

Отечественные данные о частоте регоспитализаций, а также значения повторных поступлений в стационар немногочисленны. В 2020 году опубликовано исследование наших коллег, в котором были подробно проанализированы причины повторной госпитализации в течение 30 дней после выписки из стационара больных, которым провели алло-ТГСК [2]. Ряд зарубежных статей [20; 88; 171] также освещают причины регоспитализации в период с 30-го до 100-го дня после алло-ТГСК. Однако исследования, посвященные госпитализации на отдаленных сроках (от 3 мес. до года), отсутствуют как в отечественных, так и в зарубежных источниках. Результаты таких исследований были бы полезны для оценки показателей общей выживаемости и безрецидивной выживаемости. В исследовании Махер О.М. [123] было показано, что в случае двух и более госпитализаций после алло-ТГСК, показатели выживаемости были хуже, чем у больных без регоспитализаций или с одной регоспитализацией.

В нашей работе были использованы ключевые показатели иммунного статуса в сроки от +3 до +12 мес. после алло-ТГСК для оценки риска повторного поступления больных в стационар. Мы проанализировали результаты определения основных субпопуляций лимфоцитов тех же 105 больных, характеристики которых представлены в главе «Материалы и методы». В Таблице 24 представлены причины госпитализаций на разных сроках после выполнения алло-ТГСК.

Таблица 24 – Характеристика больных и причины регоспитализаций на разных сроках после выполнения алло-ТГСК

Параметры	3-6 месяцев, n=31	6-9 месяцев, n=26	9-12 месяцев, n=13
пол, соотношение мужчин к женщинам	13 : 18	10 : 16	4 : 9
возраст (медиана (минимальный – максимальный)), лет	39 (19 - 67)	38 (19 - 67)	42 (21 – 56)
вид донора: родственный совместимый / неродственный совместимый / неродственный частично-совместимый / родственный гаплоидентичный	16 / 12 / 1 / 2	11 / 10 / 4 / 1	6 / 5 / 2 / 0
кондиционирование (RIC/MAC)	25 / 6	19 / 7	9 / 4
ИСТ (КИСТ / ПТ-ЦФ / ТКД)	25 / 4 / 2	18 / 8 / 0	10 / 3
oРТПХ	14	11	8
xРТПХ	16	12	9
диагноз (ОМЛ / ОЛЛ / МДС / ЛПЗ / АА / первичный миелофиброз/ХМЛ)	19/4/3/3/1/1/0	11/7/1/3/2/1/1	7/1/2/1/0/ 1/0
причины			
инфекции	5	7	4
oРТПХ/xРТПХ+ инфекции	4	1	1
oРТПХ/xРТПХ	11	6	7
рецидив	2	0	1
смешанное кроветворение	4	8	1
профилактика рецидива (трансфузии лимфоцитов донора)	4	3	0
парциальная красноклеточная аплазия костного мозга	3	1	0

Значения показателей различных субпопуляций лимфоцитов и их отличия между группами больных с и без повторной госпитализации представлены в

Таблице А3 в Приложении А. У больных с повторной госпитализацией в сроки от +3 до +6 мес. после алло-ТГСК были меньше доля (15,9% против 23,9%, $p = 0,03$) и абсолютное содержание НК ($0,09 \times 10^9/\text{л}$ против $0,16 \times 10^9/\text{л}$, $p = 0,03$) на +3 мес. после алло-ТГСК, чем у больных без повторной госпитализации. У больных с повторной госпитализацией на +6-9 мес. были меньше доля В-клеток (2,1% против 7,7%, $p = 0,007$), абсолютное содержание Т-хэлперов ($0,12 \times 10^9/\text{л}$ против $0,20 \times 10^9/\text{л}$, $p = 0,04$) и В-клеток ($0,02 \times 10^9/\text{л}$ против $0,10 \times 10^9/\text{л}$, $p = 0,0006$) на +6 мес. У больных с повторной госпитализацией на +9-12 мес. были меньше доля В-клеток (3,0% против 9,3%, $p = 0,037$), абсолютное содержание Т-хэлперов ($0,10 \times 10^9/\text{л}$ против $0,32 \times 10^9/\text{л}$, $p = 0,009$) и НК ($0,14 \times 10^9/\text{л}$ против $0,30 \times 10^9/\text{л}$, $p = 0,02$) на +9 мес. после алло-ТГСК.

Для определения значимых параметров состава лимфоцитов, которые были связаны с повторной госпитализацией, провели ROC-анализ. Показатели AUC достоверно превышали 0,5 для доли Т-клеток и НК, а также абсолютного количества НК на +3 мес., что позволяет предположить значимость роли этих параметров для повторной госпитализации в промежутке от +3 до +6 мес. На +6 и +9 мес. значимыми оказались следующие параметры: доля и абсолютное количество В-клеток, абсолютное количество Т-хэлперов, а на +9 мес. – абсолютное количество НК. Для представленных параметров определили оптимальный порог, который позволяет разделить больных на группы в зависимости от регоспитализации в определенные временные промежутки. Не было установлено связи в количестве лейкоцитов и повторной госпитализацией ни в одном из рассматриваемых сроков. Значения AUC и рассчитанного порога, чувствительности и специфичности показаны в Таблице 25.

Таблица 25 – Результаты ROC-анализа. Значимые параметры субпопуляций лимфоцитов, которые связаны с регоспитализацией

Параметр	Повторные госпитализации в промежутке от +3 до +6 мес.			Повторные госпитализации в промежутке от +6 до +9 мес.			Повторные госпитализации в промежутке от +9 до +12 мес.		
	AUC (p)	Порог	Чувствительность/ Специфичность (%)	AUC (p)	Порог	Чувствительность/ Специфичность (%)	AUC (p)	Порог	Чувствительность/ Специфичность (%)
Лейкоциты	0,50 (p=0,95)			0,58 (p=0,19)			0,57 (p=0,48)		
% Т-клеток	0,66 (p= 0,02)	> 60%	77,4 / 55,0	0,62 (p=0,09)			0,63 (p=0,17)		
% Т-хэлперов	0,62 (p=0,09)			0,55 (p=0,50)			0,63 (p=0,17)		
% ЦТЛ	0,62 (p=0,09)			0,57 (p=0,35)			0,67 (p=0,08)		
% НК	0,65 (p= 0,03)	< 18%	67,7 / 62,5	0,53 (p=0,65)			0,52 (p=0,85)		
% В-клеток	0,53 (p=0,71)			0,70 (p= 0,01)	< 5%	65,4 / 68,4	0,70 (p= 0,04)	< 5%	69,2 / 80,0
Абс. кол-во Т-клеток	0,56 (p=0,36)			0,63 (p=0,08)			0,61 (p=0,26)		
Абс. кол-во Т-хэлперов	0,54 (p=0,54)			0,65 (p= 0,04)	<0,180 × 10 ⁹ /л	76,9 / 52,6	0,75 (p= 0,01)	<0,225 × 10 ⁹ /л	61,5 / 90,0
Абс. кол-во ЦТЛ	0,56 (p=0,39)			0,58 (p=0,27)			0,56 (p=0,51)		
Абс. кол-во НК	0,65 (p= 0,03)	<0,115 × 10 ⁹ /л	61,3 / 62,5	0,61 (p=0,12)			0,72 (p= 0,02)	<0,175 × 10 ⁹ /л	76,9 / 70,0
Абс. кол-во В-клеток	0,54 (p=0,61)			0,75 (p= 0,01)	<0,050 × 10 ⁹ /л	65,4 / 63,2	0,73 (p= 0,02)	0,125 × 10 ⁹ /л	61,5 / 66,7

Больные, у которых увеличивается количество Т-клеток (> 60%) или уменьшается кол-во НК (< 18%, <0,115 × 10⁹/л) в период с +3 до +6 месяцев могут быть отнесены к группе высокого риска по повторным госпитализациям на этих сроках.

Больные, у которых уменьшается количество В-клеток (<5%, <0,050 × 10⁹/л) или уменьшается кол-во Т-хэлперов (<0,180 × 10⁹/л) в период с +6 до +9 месяцев

могут быть отнесены к группе высокого риска по повторным госпитализациям на этих сроках.

Больные, у которых уменьшается количество В-клеток ($< 5\%$, $< 0,125 \times 10^9/\text{л}$) или уменьшается кол-во Т-хелперов ($< 0,225 \times 10^9/\text{л}$) или уменьшается кол-во НК ($< 0,175 \times 10^9/\text{л}$) в период с +9 до +12 месяцев могут быть отнесены к группе высокого риска по повторным госпитализациям на этих сроках.

Проведенный анализ вероятности регоспитализаций (Рисунок 51) подтвердил значимость наиболее важных субпопуляций лимфоцитов, определенных с помощью ROC-исследования.

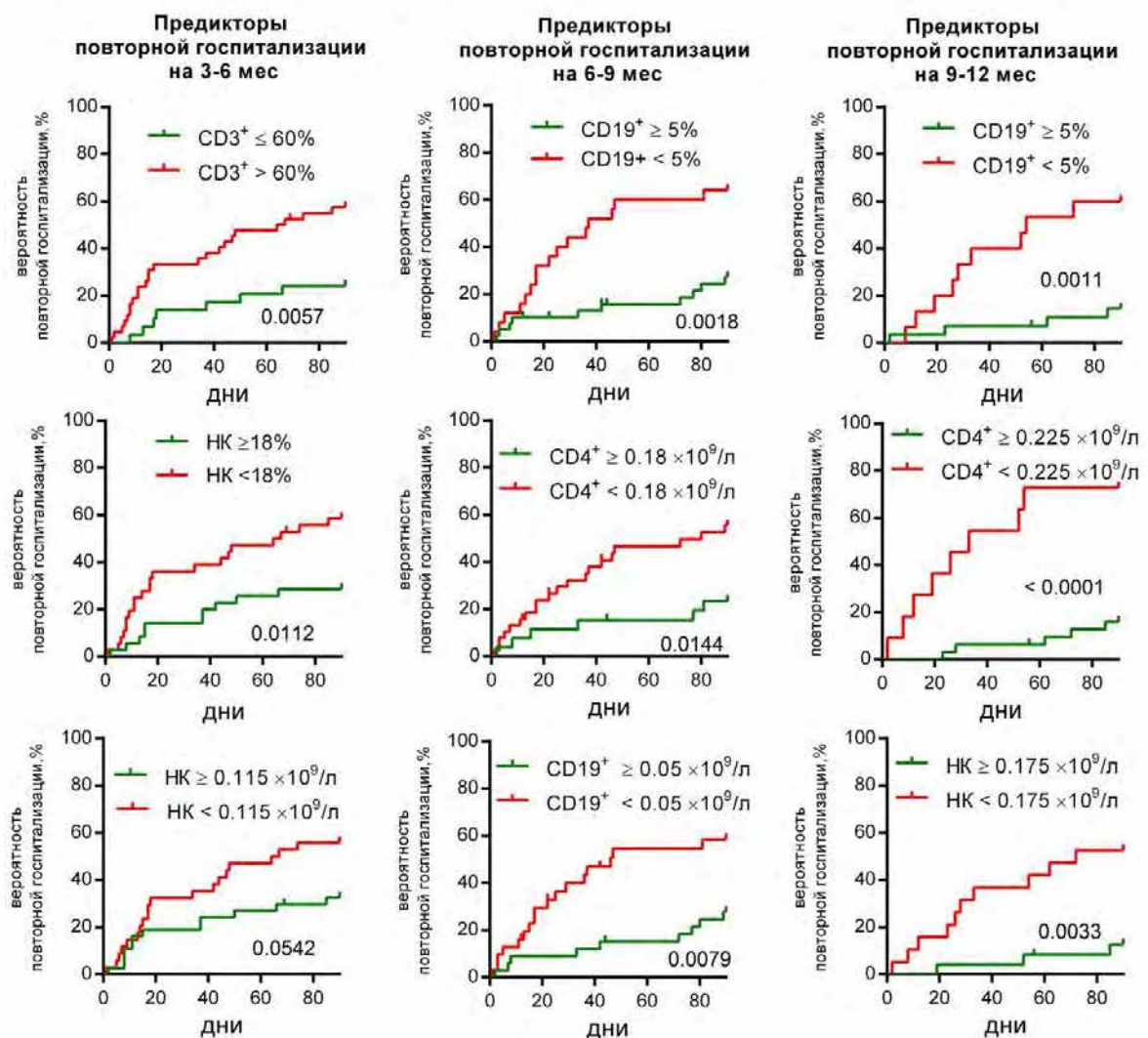


Рисунок 51 – Вероятность наступления регоспитализаций в период от 3-6 мес., от 6-9 мес., от 9-12 мес. после аллотГСК в зависимости от количества $CD3^+$ Т-клеток, $CD19^+$ В-лимфоцитов, $CD4^+$ Т-хэлперов и НК

В исследовании Дигнан Ф. и соавт. [60] было установлено, что повторные госпитализации чаще происходили у больных с РТПХ, а их частота была выше в первые 100 дней после алло-ТГСК. По данным Мартинез С. основными причинами смерти больных после алло-ТГСК были инфекции или токсичность, связанная с алло-ТГСК, которые сопровождалась более медленным восстановлением лимфоцитов [126]. Вирусные инфекции возникают в основном до +90 дня после алло-ТГСК [115]. Однако возможны также и поздние (после +90 дня) рецидивы вирусной инфекции, связанные с нарушением восстановления противовирусного иммунитета [89].

Выполненный в нашем исследовании ROC-анализ показал значимость для регоспитализации на период +3 -+6 месяцев показателей Т-клеток (увеличение доли) и уменьшение доли и абсолютного содержания НК, на +6 -+9 месяцев уменьшение доли и абсолютного содержания В-клеток и Т-хэлперов., на +9 - +12 месяцев уменьшение доли и абсолютного содержания Т-хэлперов и НК после алло-ТГСК. Эти основные субпопуляции могут отражать качество восстановления иммунитета у больных после алло-ТГСК и, как следствие, меньший риск возникновения инфекционных осложнений, РТПХ, рецидивов и соответственно регоспитализаций на поздних сроках.

Заключение

Острые лейкозы – это гетерогенная группа клональных заболеваний крови, которая характеризуется высоким риском развития рецидива, несмотря на новые современные протоколы терапии и применение таргетных препаратов [7]. Ответ на проводимую терапию при острых лейкозах зависит от многих факторов, таких как возраст, соматический статус больного, коморбидность, молекулярно-генетические характеристики, но наиболее значим параметром является химиочувствительность опухолевых клеток. Именно этот параметр можно оценить с помощью детекции минимальной остаточной популяции опухолевых клеток (МОБ) на разных этапах терапии острого лейкоза.

В проведенном исследовании мы оценивали МОБ методом многоцветной проточной цитометрии у больных ОЛЛ, проходящих терапию в рамках протокола «ОЛЛ-2016», и у больных ОМЛ, которым выполняли лечение в соответствии с протоколами «ОМЛ-2017» и «МОМЛ-2017», а также больным острыми лейкозами, которым была запланирована и выполнена алло-ТГСК. Метод МПЦ имеет определенные преимущества, такие как скорость выполнения анализа, относительно невысокая стоимость, применимость у большинства больных острыми лейкозами. Однако окончательной стандартизации определения МОБ методом МПЦ не разработано, а применяемые подходы, наборы моноклональных антител и мощность проточных цитометров сильно варьирует в существующих исследованиях. Перечисленные особенности определения МОБ продиктовали необходимость тщательной отработки нами методики, подбора оптимальной комбинации моноклональных антител, изучении нормального созревания клеток костного мозга и создания внутренней лабораторной базы для определения МОБ у больных острыми лейкозами. Приведенные в этой работе отлаженная стратегия гейтирования, примеры цитометрического анализа данных у здоровых доноров и больных с наличием МОБ могут быть использованы в лабораториях, планирующих начать аналогичные исследования.

Необходимо помнить, что после проведения высокодозной химиотерапии или выполнения алло-ТГСК на фоне интенсивной регенерации клеток КМ может увеличиваться количество нормальных В-клеточных предшественников, которые при морфологическом исследовании определяются как бластные клетки. Выполнение иммунофенотипического исследования методом МПЦ помогает разобраться в природе таких клеток и исключить рецидив.

При ОЛЛ мониторинг МОБ интегрируется в протоколы терапии и в настоящее время разрабатывается стандартизация анализа МОБ у больных В-ОЛЛ методом МПЦ. В разных протоколах приняты разные пороговые значения МОБ в зависимости от контрольной точки исследования, а также применяемого метода (МПЦ или ПЦР). Эти пороговые значения позволяют провести стратификацию больных на группы риска. Обязательным является анализ семи антигенов в случае определения МОБ при В-ОЛЛ: CD19, CD10, CD34, CD38, CD20, CD45, CD58, дополнительно применяют маркеры CD11a, CD13, CD33, CD9, CD22, CD81. В панель моноклональных антител должно быть включено антитело к CD22, чтобы определять aberrantные клетки в случае последующей таргетной терапии моноклональными антителами анти-CD19 или анти-CD22 [7; 26; 49; 130].

Мы использовали десятицветный набор антител из смеси семи конъюгатов антител с флуорохромными красителями DURAClone RE ALB (Beckman Coulter, Франция), включающий антитела против CD10, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45, CD58 с антителами против антигенов CD24, CD22, а также краситель Syto41 (Invitrogen), окрашивающий все ядросодержащие клетки и 7-AAD (окрашивает только нежизнеспособные клетки).

Исследование МОБ при Т-ОЛЛ не стандартизовано. Рекомендовано исследование CD-антигенов Т-клеток и натуральных киллеров (НК), таких как CD7, CD5, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1a, CD16/CD56, а также CD34 или терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу, которые могут экспрессироваться на бластных клетках [7; 37]. Полезным является анализ антигена CD45, и CD99, экспрессия которого часто повышена. Мы применяли 9- и 11-цветную панель, учитывая все рекомендации, и перед внесением

моноклональных антител добавляли BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, США). У больных Т-ОЛЛ более сложная пробоподготовка и цитометрический анализ по сравнению с В-ОЛЛ при определении МОБ. Целесообразно выполнять гейтирование не только CD7⁺ клеток, но и включать CD7⁺ клетки в гейт со всеми клетками с цитоплазматической экспрессией CD3. Клетки с поверхностной экспрессией CD3, но негативные по цитоплазматическому маркеру CD3 в норме появляются вследствие дефектов пробоподготовки (некачественное окрашивание цитоплазматического антигена). Это могут быть зрелые Т-клетки или дебрис, т.е. погибшие клетки, но всегда при оценке этой группы клеток надо рассмотреть расположение событий этого гейта на других диаграммах. Клетки, экспрессирующие CD7, но не имеющие ни поверхностную, ни внутриклеточную экспрессию CD3, могут быть НК, ранними предшественниками и ПДК. Клетки, имеющие цитоплазматический маркер CD3, но не экспрессирующие его поверхностно, считаются “подозрительными”, так как по иммунофенотипу могут соответствовать тимическим предшественникам Т-клеток, однако в этом регионе могут быть и нормальные клетки. Следовательно, необходимо знание этапов нормальной дифференцировки и созревания Т-клеток, чтобы исключить ложноположительные заключения.

Детекция МОБ у больных ОМЛ является одной из самых непростых задач. Анализ цитометрических данных требует экспертного знания иммунофенотипа всех клеточных компартментов КМ. Опухолевые клетки при ОМЛ в большинстве случаев гетерогенны, а с другой стороны в ряде случаев иммунофенотип лейкоэмических клеток лишь незначительно отличается от нормальных клеточных аналогов, следовательно, необходим многоцветный анализ, а именно ≥ 10 -цветный с расширенной панелью моноклональных антител. Необходимо включать в панель моноклональные антитела 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 сложных случаях дополнительно исследуют сочетание антигенов CD64, CD11b, CD14, CD4, CD34, HLA-DR,

CD33, CD45, позволяющее оценить моноцитарную дифференцировку клеток [172].

Кинетика МОБ отражает чувствительность лейкемических клеток к применяемым цитостатическим и биологическим препаратам и зависит от интенсивности терапии. Мы оценили МОБ у больных ОЛЛ на разных этапах терапии по протоколу «ОЛЛ-2016», и оказалось, что частота достижения МОБ-негативности значимо не отличалась от данных международных протоколов терапии ОЛЛ [22; 81; 158; 161]. К началу поддерживающей терапии МОБ выявлялась лишь у единичных больных ОЛЛ. Это указывает на эффективность протокола «ОЛЛ-2016», который характеризуется низкой интенсивностью и непрерывностью химиотерапевтического воздействия. Обнаружены статистически достоверные отличия в оценках вероятности достижения МОБ-негативного статуса в зависимости от варианта острого лейкоза ($p = 0,0254$). Больные Т-ОЛЛ достигают МОБ-негативного статуса быстрее.

В связи с тем, что реальные сроки выполнения исследования отличались от календарных, динамику МОБ изучали с использованием как реальной временной шкалы (время от даты начала терапии до взятия образца), так и с использованием номера условной контрольной точки (+70, +105, +133 и +190 день протокола). И было выявлено, что как в анализе с условной временной шкалой, так и при использовании реальных дат исследования по протоколу «ОЛЛ-2016» не было обнаружено существенных отличий в клиренсе опухолевой массы в зависимости от варианта острого лимфобластного лейкоза.

Оптимальной контрольной точкой для определения МОБ у больных В-ОЛЛ оказалась вторая фаза индукции +70-й день по протоколу «ОЛЛ-2016», так как безрецидивная выживаемость и общая выживаемость были значимо хуже у МОБ-положительных больных, чем в группе с МОБ-негативным статусом. При обнаружении МОБ на +70 день оценки БРВ на сроках 12, 24 и 48 мес. от даты исследования составили 70%, 54% и 37% соответственно, в случае отсутствия МОБ – 94%, 90%, 78% соответственно, $p < 0,0001$. Не установлено значимой

связи между наличием МОБ, определяемой на +133 и +190 дни протокола «ОЛЛ-2016» и БРВ и ОВ.

У больных Т-ОЛЛ при обнаружении МОБ на +70 день БРВ на сроках 12, 24 и 48 месяцев от даты исследования составили 76%, 59% и 25%, в случае отсутствия МОБ – 87%, 83%, 80%, соответственно, $p < 0,0025$. Когда был установлен порог МОБ 0,1% на +70 день протокола, то подтвердились достоверные различия в БРВ. И, следовательно, +70 день терапии Т-ОЛЛ является ключевой точкой мониторинга МОБ. На +133 день число больных в группе с МОБ-положительным статусом составило 5 человек и оценки БРВ на сроках 12, 24 мес. от даты исследования составили 50%, 25%, а в случае отсутствия МОБ – 90%, 82% соответственно, $p < 0,0063$, что указывает на значимость этой точки для мониторинга МОБ, как дополнительной.

Для вычисления порогового значения МОБ на +70-й день протокола «ОЛЛ-2016» при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ был проведен «ROC survival» анализ. В «ROC survival» анализе вместо частот в контрольной точке, используются оценки вероятности прожить без неблагоприятных событий к этой временной точке. Оптимальным порогом было установлено значение 0,01% (10^{-4}), при котором соотношение рисков ошибок (ложной положительности к ложной отрицательности) составило 1 к 2,8. Цена ложного заключения о МОБ-положительном статусе примерно в 3 раза более весомая, чем ложно-отрицательный результат анализа МОБ, поскольку влечет за собой принятие терапевтических решений о возможной смене тактики терапии.

Случаи, в которых МОБ не детектируется, но значение лабораторной чувствительности превышает установленный порог МОБ, следует признать невалидными и рекомендовать проведение повторного исследования вследствие наличия вероятности получения ложно-отрицательного результата наличия МОБ.

Из 319 исследований МОБ, выполненных в период поддерживающей терапии (после 190 дня до окончания протокола и далее в течение 1,5 лет наблюдения после окончания терапии), только для одного больного В-ОЛЛ обнаружение МОБ-положительного статуса предшествовало рецидиву, для 6

больных даты подтверждения МОБ-положительного статуса совпали с датами рецидива. Из чего следует, что целесообразность мониторинга МОБ на отдаленных этапах терапии требует уточнения вследствие того, что определения МОБ на поддерживающей терапии были не систематическими и выборочными. Более регламентированные исследования МОБ на поддерживающей терапии, вероятно, предоставят возможность определить значимость мониторинга остаточных опухолевых клеток на отдаленных этапах терапии.

Интересно отметить, что не только факт наличия МОБ на +70-й день протокола «ОЛЛ-2016» значимо ухудшает прогноз у больных В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ, но на выживаемость этой когорты больных оказывают влияние особенности иммунофенотипа остаточных опухолевых клеток. Наиболее ранние рецидивы наблюдались у больных с остаточными опухолевыми клетками с высокой плотностью экспрессии CD38 и/или CD58 при В-ОЛЛ и наличием экспрессии CD5 при Т-ОЛЛ. Обнаруженный феномен ранее не описывался как в отечественной, так и зарубежной литературе, что свидетельствует об уникальности полученных результатов.

Помимо определения МОБ у больных В-ОЛЛ во всех точках исследования мы оценивали количество В-клеточных предшественников, зрелых В-клеток и плазматических клеток. У больных Т-ОЛЛ не было необходимости определять клетки предшественники, так как созревание Т-клеток происходит в тимусе и обнаружение популяции клеток с иммунофенотипом Т-клеточных предшественников в КМ является патологией, а сама популяция признается опухолевой. На всем протяжении терапии количество В-клеточных предшественников и зрелых В-клеток было меньше, чем у доноров, но количество нормальных плазматических клеток оставалось в пределах нормы. Отличий в динамике количества этих клеток у больных в МОБ-положительной и МОБ-отрицательной группах не было выявлено ($p > 0,05$). Учитывая полученные данные, можно предположить, что цитостатическое воздействие на дифференцированные В-клетки, применяемое в протоколе, было минимальным.

Детекция МОБ у больных ОМЛ является одной из самых непростых задач. Анализ цитометрических данных требует экспертного знания иммунофенотипа всех клеточных компартментов КМ. Опухолевые клетки при ОМЛ в большинстве случаев гетерогенны, а с другой стороны в ряде случаев иммунофенотип лейкоэмических клеток лишь незначительно отличается от нормальных клеточных аналогов, следовательно, необходим многоцветный анализ, а именно ≥ 10 -цветный с расширенной панелью моноклональных антител. Необходимо включать в панель моноклональные антитела 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 сложных случаях дополнительно исследуют сочетание антигенов CD64, CD11b, CD14, CD4, CD34, HLA-DR, CD33, CD45, позволяющее оценить моноцитарную дифференцировку клеток [172].

Определение МОБ методом МПЦ на этапах индукции ремиссии является прогностически значимым и у больных ОМЛ. На ВРР и БРВ оказывало влияние наличие МОБ после 1-го и 2-го курсов индукции, проводимой по протоколам «ОМЛ-2017» и «МОМЛ-2017». В результате многофакторного анализа с пошаговым отбором единственным достоверным признаком, влияющим на ОВ и БРВ, оказался МОБ-статус в момент ПР. Модельные оценки БРВ больных с МОБ-негативным и МОБ-позитивным статусом после 1-го курса индукции из разных групп риска ELN-17 показали, что достижение МОБ-негативности фактически нивелирует значение фактора по риску ELN-17 на момент начала терапии.

В группу благоприятного прогноза можно отнести только тех больных ОМЛ, которые сохраняли МОБ-негативный статус после двух курсов индукции ремиссии (ОВ составила 100%, БРВ – 90,5% на 30 мес. после 2-го курса). Если хотя бы в одну контрольную точку МОБ выявлялась, то риск рецидива был значимо выше. С помощью двухфакторной модели Кокса была подтверждена прогностическая значимость 1-го и 2-го измерения МОБ, т.к. относительный риск, показывающий вес факторов для МОБ-1 и МОБ-2 выявил одинаковые значения.

Для определения пороговых значений МОБ были использованы специальные методы ROC-анализа – «ROC-survival», были оценены чувствительность и специфичность прогноза БРВ в точке 12 месяцев, который показал, что оптимальный порог МОБ находится в интервале от 0% до 0,1%.

Результаты этой работы были учтены при разработке нового протокола многоцентрового исследования «ОМЛ-2021» по оценке роли алло-ТГСК в первой полной ремиссии, МОБ-негативной после первого и второго курсов терапии, у больных ОМЛ в возрасте моложе 60 лет.

Не только выявление МОБ на индукционных курсах терапии имеет прогностическую значимость, но и количество МОБ непосредственно перед алло-ТГСК. При выполнении пошагового многофакторного анализа в случае ОМЛ, в который были включены в качестве исходных такие факторы, как МОБ перед алло-ТГСК, ELN риск, возраст, режим кондиционирования, вид донора, время до выполнения алло ТГСК от даты 1ПР, источник трансплантата, в модель были отобраны «МОБ перед алло-ТГСК», ELN-риск и источник трансплантата, как значимые факторы ($p < 0,05$). И самым значимым и «сильнодействующим» независимым фактором неблагоприятного прогноза был установлен «МОБ перед алло-ТГСК» (OR=9,2, $p < 0,0001$). И для ОЛЛ были получены аналогичные выводы при выполнении пошагового многофакторного анализа, в который были включены все выше перечисленные факторы и был отобран в модель в качестве значимого ($p < 0,05$) только такой фактор, как «МОБ перед алло-ТГСК» для ОЛЛ ($p = 0,0005$).

У больных ОМЛ в 1-ой ПР с предтрансплантационным позитивным МОБ-статусом БРВ составила всего 26%, а с МОБ-негативным – 67% ($p < 0,0001$), у больных ОЛЛ в 1-ой ПР – 20% и 56% соответственно ($p = 0,0317$). Однако следует учитывать, что предсказательная сила МОБ подтверждается только у больных в 1-ой полной ремиссии заболевания, у больных во 2-ой и 3-ей ремиссии не было получено значимых различий в выживаемости после алло-ТГСК в зависимости от МОБ-статуса перед алло-ТГСК. Кроме того, МОБ является независимым прогностическим параметром, а наличие МОБ перед алло-ТГСК не было

ассоциировано с летальностью, не связанной с рецидивом заболевания. Таким образом, исследование МОБ непосредственно перед алло-ТГСК помогает выделить группу больных с крайне высоким риском развития рецидива после трансплантации, что диктует необходимость в изменении их терапевтической тактики, касающейся выбора донора, режима кондиционирования, иммуносупрессивной терапии или выполнение ранней профилактической противорецидивной терапии.

Успешность алло-ТГСК зависит не только от риска рецидива, но и таких факторов, как отторжение трансплантата, развитие РТПХ, тяжелые инфекционные осложнения. Все эти события во многом зависят от реконституции клеток иммунной системы, в частности субпопуляций лимфоцитов. Самыми первыми восстанавливались НК – у половины больных абсолютное количество НК соответствовало референсным значениям уже на +3 мес. после алло-ТГСК, а к году – у большинства больных. Длительнее всего происходило восстановление Т-хэлперов – даже через год после алло-ТГСК у 80% абсолютное количество Т-хэлперов не достигало нижней границы референсного интервала.

Неадекватная реконституция лимфоцитов может быть связана с повышенным риском осложнений после алло-ТГСК, требующих повторной госпитализации больных для проведения соответствующей терапии [43; 78]. Так как повторные госпитализации сопряжены с финансовыми затратами и высокой нагрузкой на стационар, нашей целью стало определение прогностически значимых субпопуляций лимфоцитов, низкое количество которых ассоциировано с высокой вероятностью регоспитализации. Была проведена сравнительная оценка восстановления Т-, В- и НК-клеток в отдаленные сроки после алло-ТГСК (от 3 до 12 мес.). Мы обнаружили, что к предикторам регоспитализаций относятся абсолютное содержание НК менее $0,115 \times 10^9/\text{л}$ на +3 мес., Т-хэлперов менее $0,18 \times 10^9/\text{л}$ на +6 мес., В-клеток менее $0,05 \times 10^9/\text{л}$ на +6 мес., Т-хэлперов менее $0,23 \times 10^9/\text{л}$ на +9 мес. и НК менее $0,175 \times 10^9/\text{л}$ на +9 мес. Полученные результаты могут помочь в прогнозировании возможных повторных госпитализаций, если

больной наблюдается в амбулаторных условиях, целесообразности выписки из стационара и возможных осложнений.

Таким образом, была создана лабораторная платформа, и разработана стратегия детекции и мониторинга МОБ при острых лейкозах. Проведенное исследование продемонстрировало, что выявление минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии является значимым фактором прогноза у больных острыми лейкозами, как на ранних этапах терапии, так и перед выполнением алло-ТГСК. Обнаружена прогностическая значимость особенностей иммунофенотипа остаточных опухолевых клеток у больных В-ОЛЛ на +70 день протокола «ОЛЛ-2016». В российских протоколах терапии острых лейкозов определены ключевые точки для мониторинга МОБ и пороговые значения МОБ для ОМЛ и ОЛЛ. Подтверждена важность предтрансплантационного МОБ-статуса, как независимого прогностического фактора риска развития рецидива у больных ОМЛ и ОЛЛ только в первой ремиссии заболевания. Дефекты реконституции основных субпопуляций лимфоцитов в соответствующих временных промежутках после алло-ТГСК ассоциированы с высоким риском повторных госпитализаций.

Таким образом, наша работа позволила интегрировать мониторинг МОБ методом МПЦ в современные российские протоколы лечения больных острыми лейкозами. Разработан и применяется модифицированный протокол многоцентрового исследования по лечению Rh-негативных ОЛЛ взрослых «ОЛЛ-2016» с МОБ-ориентированной терапией в фазе консолидации. Разработано и внедрено проспективное многоцентровое рандомизированное контролируемое клиническое исследование «ОМЛ-2021» по оценке роли алло-ТГСК в первой полной ремиссии, МОБ-негативной после первого курса, у больных ОМЛ в возрасте моложе 60 лет.

Выводы

1. Разработанная стратегия определения МОБ, включающая панель антител, алгоритмы выделения лейкозного клона, правила определения порога детекции позволила реализовать стандартизованные процедуры мониторинга МОБ у больных ОЛЛ и ОМЛ на программной химиотерапии, до и после алло-ТГСК.
2. Долгосрочные результаты терапии ОЛ определяются не только исходными молекулярно-генетическими характеристиками лейкоэмических клеток, но и их химиочувствительностью. МОБ-статус является наиболее объективной мерой ответа на терапию и может служить индикатором эффективности терапии.
3. Доказано, что обнаружение МОБ на +70-й день протокола «ОЛЛ-2016» у больных В-линейным ОЛЛ и Т-ОЛЛ ассоциируется с достоверным снижением безрецидивной выживаемости (37% против 78%, $p < 0,0001$ и 25% против 80%, $p < 0,0025$ соответственно). Пороговое значение МОБ для ОЛЛ установлено на уровне 0,01% (10^{-4}) с учетом оптимального соотношения чувствительности/специфичности.
4. Обнаружено, что иммунофенотип остаточных опухолевых клеток на +70 день протокола «ОЛЛ-2016» имеет прогностическое значение: безрецидивная выживаемость достоверно хуже у больных В-ОЛЛ при высокой плотности экспрессии на остаточных лейкоэмических клетках CD38 (медиана БРВ 5,3 мес. против медианы 50,9 мес., $p < 0,0001$) и CD58 (8,7 мес. против 37,1 мес., $p = 0,0198$), а у больных Т-ОЛЛ – при высокой плотности экспрессии на остаточных лейкоэмических клетках CD5 (медиана БРВ 14,1 мес. против медианы 34,5 мес., $p = 0,0498$).
5. Установлено, что при лечении по протоколу «ОЛЛ-2016» количество В-клеточных предшественников и зрелых В-клеток в костном мозге у больных В-ОЛЛ меньше нормальных значений, в процессе терапии доля В-клеточных предшественников увеличивается, зрелых В-клеток – уменьшается ($p < 0,0001$), а количество плазматических клеток остается в пределах нормальных значений. Не

обнаружено различий в динамике количества этих клеток в МОБ-положительной и МОБ-отрицательной группах больных ($p > 0,05$).

6. Доказано, что у больных ОМЛ необходимо исследовать МОБ и после 1-го, и после 2-го курсов индукции – выявление МОБ в любой из этих точек ассоциировано с высоким риском рецидива (50% против 0,9%, $p = 0,001$) и пороговое значение МОБ не превышает 0,1% с учетом оптимального соотношения чувствительности/специфичности.

7. Показано, что МОБ позитивный статус непосредственно перед алло-ТГСК является значимым неблагоприятным фактором прогноза у больных острыми лейкозами в первой полной ремиссии и ассоциируется с низкой 3-летней БРВ у больных ОМЛ (26% против 67%, $p < 0,0001$) и ОЛЛ (20% против 56%, $p = 0,0317$). Обнаружение МОБ на +30 день после алло-ТГСК является дополнительным неблагоприятным прогностическим фактором у больных острыми лейкозами (ВРР 66% против 37%, $p = 0,003$).

8. Установлено, что низкое количество НК ($p = 0,003$), Т-хэлперов ($p < 0,0001$), и В-лимфоцитов ($p = 0,001$) на этапе от +3 до +12 месяцев после алло-ТГСК является риском регоспитализаций, связанных с такими осложнениями, как инфекции, РТПХ и рецидивы.

Список сокращений и условных обозначений

AIEOP-BFM – Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and Berlin-Frankfurt-Munster;

ANOVA – ANalysis Of Variance;

AUC – area under the curve (площадь под кривой);

BCR-ABL – химерный ген, образованный частями двух генов: BCR (22q11) и ABL (9q34.1) в результате обмена генетическим материалом между 22-й и 9-й хромосомами – реципрокной транслокации $t(9;22)(q34;q11)$;

В-ОЛЛ – В-линейный острый лимфобластный лейкоз;

CAR – Chimeric Antigen Receptor;

CBFB-MYH11 – химерный ген, возникающий вследствие перестройки $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ и слияния генов CBFB (Core-binding factor subunit beta) и MYH11 (Myosin Heavy Chain 11);

CD – clusters of differentiation;

CEBPa (CCAAT/enhancer-binding protein α) – ген, кодирует транскрипционный фактор D;

COG – Children's Oncology Group;

dim – dimly (тусклый);

E2A-PBX1 – химерный ген, возникающий вследствие транслокации $t(1;19)$ и слияния гена ДНК-связывающего белка E2A и PBX1 - фактором транскрипции пре-B-клеточной лейкемии 1;

EBMT – European Society for Blood and Marrow Transplantation;

ELN – European LeukemiaNet;

EORTC/GIMEMA – European Organization for Research and Treatment of Cancer / Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto);

ETV6-RUNX1 – химерный ген, образующийся вследствие транслокации $t(12;21)(p13;q22)$ и слияния генов транскрипционных факторов ETV6 и RUNX1;

EVI1 – Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog - принимает участие в регуляции транскрипции, гемопоэзе, апоптозе, дифференцировке клеток;

- FLT3 – рецепторная тирозинкиназа 3;
- FLT3-ITD – мутация в гене FLT3 по типу внутренней тандемной дупликации;
- FLT3-TKD – мутация тирозинкиназного домена FLT3;
- GMALL (German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia);
- GRAAL – Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia;
- HLA – Human Leukocyte Antigens;
- HOVON/SAKK AML – Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group/Swiss Group for Clinical Cancer Research Acute Myeloid Leukemia;
- IKZF1 – ген ДНК-связывающего белка Икарос (Ikeros family zinc finger protein 1);
- KMT2A-AFF1 – химерный ген, возникающий вследствие транслокации t(4;11)(q21;q23) и слияния гена KMT2A - транскрипционного ко-активатора и гена компонента элонгационного комплекса AFF1;
- Ig – десятичный логарифм;
- LLOQ – Lower Limit of Quantification;
- LOD – Limit of Detection;
- MAC – myeloablative conditioning;
- NGF – next generation flow;
- NGS – next generation sequencing;
- NPM1 – ген нуклеофосмин 1;
- PETHEMA – Programa Español de Tratamientos en Hematología;
- Ph⁺ ОЛЛ – Ph-позитивный острый лимфобластный лейкоз;
- Ph-хромосома – филадельфийская хромосома (Philadelphia chromosome);
- PML-RAR α – химерный ген, возникающий вследствие слияния генов PML (promyelocytic leukemia) и RAR α (retinoic acid receptor α);
- PRAME – ядерный рецептор транскрипционного регулятора, сокращение от "PReferentially expressed Antigen in MElanoma";
- RIC – reduced intensity conditioning;

ROC – receiver operating characteristic (рабочая характеристика приёмника);

RUNX1-RUNX1T1 – химерный ген, возникающий вследствие перестройки t(8;21)(q22;q22) и слияния генов RUNX1 (Runt-related transcription factor 1, он же ген белка AML - acute myeloid leukemia 1 protein) и RUNX1T1 (RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1, устаревшее название - ETO);

T-ОЛЛ – T-линейный острый лимфобластный лейкоз;

WT1 – ген белка WT1 (Wilms' tumor protein);

алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток;

АТГ – антитимоцитарный иммуноглобулин;

ауто-ТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток;

БРВ – безрецидивная выживаемость;

БСВ – бессобытийная выживаемость;

ВРР – вероятность развития рецидива;

гапло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичных доноров;

гг. – годы;

ДИ – доверительный интервал;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИГ – иммуноглобулин;

ИСТ – иммуносупрессивная терапия;

ИТК – ингибиторы тирозинкиназ;

кИСТ – классическая иммуносупрессивная терапия;

КМ – костный мозг;

ЛАИФ – лейкоз-ассоциированный иммунонофенотип;

МДС – миелодиспластический синдром;

мес. – месяцы;

ММФ – микофенолата мофетил;

МОБ – минимальная остаточная болезнь;

МПЦ – многоцветная проточная цитометрия;
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
МТХ – метотрексат;
НК – натуральные киллеры;
ОВ – общая выживаемость;
ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз;
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз;
ОПЛ – острый промиелоцитарный лейкоз;
ОР – отношение рисков;
oРТПХ – острая реакция трансплантат против хозяина;
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
ПР – полная ремиссия;
ПТ-ЦФ – посттрансплантационный циклофосфамид;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
РТПЛ – реакции трансплантат против лейкоза;
РТПХ – трансплантат против хозяина;
СКК – стволовые клетки крови;
соавт. – соавторы;
США – Соединённые Штаты Америки;
ТКД – $\alpha\beta$ -Т-клеточная деплеция;
ТКР – Т-клеточный рецептор;
ТОТ – тотальное облучение тела;
ХЛЛ – хронический лимфолейкоз;
ХМЛ – хронический миелолейкоз;
хРТПХ – хроническая реакция трансплантат против хозяина;
ХТ – химиотерапия;
ЦМВ – цитомегаловирус;
ЦСА – циклоспорин А;
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты;
ЦФ – циклофосфамид;

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат.

Список литературы

1. Гальцева, И. В. Определение минимальной измеримой остаточной болезни у взрослых больных острыми лейкозами / И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Е. Н. Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2020. – том 65. – № 4. – с. 460–472.
2. Дроков, М. Ю. Факторы риска повторных госпитализаций после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / М. Ю. Дроков, А. А. Дмитрова, Л. А. Кузьмина, В. А. Васильева, Е. Д. Михальцова, О. М. Королева, Е. В. Усикова, Е. Н. Паровичникова, В. Г. Савченко // Клиническая онкогематология. – 2020. – том 13. – № 1. – с. 89–94.
3. Кишкун, А. А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А. А. Кишкун. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013.
4. Лобанова, Т. И. Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) / Т. И. Лобанова, И. В. Гальцева, Е. Н. Паровичникова // Онкогематология. – 2018. – том 13. – № 1. – с. 83–102.
5. Мамаев, Н. Н. Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена WT1 после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Н. Н. Мамаев, А. В. Горбунова, И. М. Бархатов, Я. В. Гудожникова, Т. Л. Гиндина, В. А. Катерина, Е. В. Волчков, А. Л. Алянский, Е. В. Бабенко, О. А. Слесарчук, Н. В. Станчева, С. Н. Бондаренко, Б. В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. – 2015. – том 8. – № 3. – с. 309–320.
6. Паровичникова, Е. Н. Новые программы лечения острых лейкозов: дис. ...док. мед. наук: 14.01.21 / Паровичникова Елена Николаевна. – М., 2003. – 279 с.
7. Паровичникова, Е. Н. Разработка программной терапии больных острыми миелоидными лейкозами в возрасте моложе 60 лет, основанной на принципах дифференцированного воздействия / Е. Н. Паровичникова, И. А.

Лукьянова, В. В. Троицкая, М. Ю. Дроков, Л. А. Кузьмина, А. Н. Соколов, А. В. Кохно, З. Т. Фидарова, И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, А. И. Кашлакова, Е. О. Грибанова, Е. Е. Звонков, Е. П. Сысоева, В. Н. Двирнык, Т. Н. Обухова, А. Б. Судариков, Ю. В. Сидорова, С. М. Куликов, Ю. А. Чабаева, В. Г. Савченко // *Терапевтический архив*. – 2021. – том 93. – № 7. – с. 753–762.

8. Паровичникова, Е. Н. Подходы к определению минимальной остаточной болезни при острых лейкозах : в Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови / Е. Н. Паровичникова, И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, С. Ю. Смирнова / под ред. В. Г. Савченко. – Москва : Практика, 2018.

9. Попов, А.М. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге / А. М. Попов, Т. Ю. Вержбицкая, Л. Г. Фечина, А. В. Шестоपालов, С. А. Плясунова // *Клиническая онкогематология*. – 2016. – том 9. – № 3. – с. 302–313.

10. Смирнова, С. Ю. Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых / С. Ю. Смирнова, Ю. В. Сидорова, Н. В. Рыжикова, К. А. Сычевская, Е. Н. Паровичникова, А. Б. Судариков // *Acta naturae*. – 2016. – том 8. – № 4. – с. 108–118.

11. Смирнова, С. Ю. Методика определения минимальной остаточной болезни при остром лимфобластном лейкозе / С. Ю. Смирнова, Ю. В. Сидорова, А. Б. Судариков // *Справочник заведующего КДЛ*. – 2015. – том 4. – с. 50–61.

12. Хайдуков, С. В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса / С. В. Хайдуков, Л. В. Байдун // *Медицинский алфавит*. – 2015. – том 2. – № 8. – с. 44-51.

13. Alho, A. C. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD / A. C. Alho, H. T. Kim, M. J. Chammas, C. G. Reynolds, T. R. Matos, E. Forcade, J. Whangbo, S. Nikiforow, C. S. Cutler, J. Koreth, V. T. Ho, P. Armand, J. H. Antin, E. P. Alyea, J. F. Lacerda, R. J. Soiffer, J. Ritz // *Blood*. – 2016. – vol. 127. – № 5. – pp. 646–657.

14. Avery, S. Influence of infused cell dose and HLA match on engraftment after double-unit cord blood allografts / S. Avery, W. Shi, M. Lubin, A. M. Gonzales,

G. Heller, H. Castro-Malaspina, S. Giralt, N. A. Kernan, A. Scaradavou, J. N. Barker // *Blood*. – 2011. – vol. 117. – № 12. – pp. 3277–3285.

15. Baer, M.R. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361) / M. R. Baer, C. C. Stewart, R. K. Dodge, G. Leget, N. Sulé, K. Mrózek, C. A. Schiffer, B. L. Powell, J. E. Kolitz, J. O. Moore, R. M. Stone, F. R. Davey, A. J. Carroll, R. A. Larson, C. D. Bloomfield // *Blood*. – 2001. – vol. 97. – № 11. – pp. 3574–3580.

16. Barker, J. N. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors / J. N. Barker, D. J. Weisdorf, J. E. Wagner // *New England Journal of Medicine*. – 2001. – vol. 344. – № 24. – pp. 1870–1871.

17. Barker, J. N. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy / J. N. Barker, D. J. Weisdorf, T. E. DeFor, B. R. Blazar, P. B. McGlave, J. S. Miller, C. M. Verfaillie, J. E. Wagner // *Blood*. – 2005. – vol. 105. – № 3. – pp. 1343–1347.

18. Bassan, R. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) / R. Bassan, O. Spinelli, E. Oldani, T. Intermesoli, M. Tosi, B. Peruta, G. Rossi, E. Borlenghi, E. M. Pogliani, E. Terruzzi, P. Fabris, V. Cassibba, G. Lambertenghi-Deliliers, A. Cortelezzi, A. Bosi, G. Gianfaldoni, F. Ciceri, M. Bernardi, A. Gallamini, D. Mattei, E. Di Bona, C. Romani, A. M. Scattolin, T. Barbui, A. Rambaldi // *Blood*. – 2009. – vol. 113. – № 18. – pp. 4153–4162.

19. Basso, G. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow / G. Basso, M. Veltroni, M. G. Valsecchi, M. N. Dworzak, R. Ratei, D. Silvestri, A. Benetello, B. Buldini, O. Maglia, G. Masera, V. Conter, M. Arico, A. Biondi, G. Gaipa // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – vol. 27. – № 31. – pp. 5168–74.

20. Bejanyan, N. Risk Factors for 30-Day Hospital Readmission following Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (allo-HCT) / N.

Bejanyan, B. J. Bolwell, A. Lazaryan, L. Rybicki, S. Tench, H. Duong, S. Andresen, R. Sobecks, R. Dean, B. Pohlman, M. Kalaycio, E. A. Copelan // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2012. – vol. 18. – № 6. – pp. 874–880.

21. Beldjord, K. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia / K. Beldjord, S. Chevret, V. Asnafi, F. Huguet, M.-L. Boulland, T. Leguay, X. Thomas, J.-M. Cayuela, N. Grardel, Y. Chalandon, N. Boissel, B. Schaefer, E. Delabesse, H. Cavé, P. Chevallier, A. Buzyn, T. Fest, O. Reman, J.-P. Vernant, V. Lhéritier, M. C. Béné, M. Lafage, E. Macintyre, N. Ifrah, H. Dombret, Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) // *Blood.* – 2014. – vol. 123. – № 24. – pp. 3739–3749.

22. Bill, M. Mapping the CLEC12A expression on myeloid progenitors in normal bone marrow; implications for understanding CLEC12A-related cancer stem cell biology / M. Bill, P. B. van Kooten Niekerk, P. S. Woll, L. Laine Herborg, A. Stidsholt Roug, P. Hokland, L. Nelderby // *J. Cell. Mol. Med.* – 2018. – vol. 22. – № 4. – pp. 2311–2318.

23. Björklund, E. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia / E. Björklund, J. Mazur, S. Söderhäll, A. Porwit-MacDonald // *Leukemia* – 2003. – vol. 17. – № 1. – pp. 138–148.

24. Blagov, S. L. Low dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted stem cell transplantation for patients with malignant disorders / S. L. Blagov, L. N. Shelikhova, E. Y. Osipova, V. V. Kiseleva, A. S. Kazachenok, Z. B. Shekhovtsova, A. A. Bogoyavlenskaya, G. A. Novichkova, A. A. Maschan, M. A. Maschan // *Pediatr. Hematol. Immunopathol.* – 2018. – vol. 17 – № 2. – pp. 9–20.

25. Bleakley, M. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect / M. Bleakley, S. R. Riddell // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – vol. 4 – № 5. – pp. 371–380.

26. Borowitz, M. J. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. *A Children's*

Oncology Group study / M. J. Borowitz, D. J. Pullen, J. J. Shuster, D. Viswanatha, K. Montgomery, C. L. Willman, B. Camitta, Children's Oncology Group study // *Leukemia*. – 2003. – vol. 17. – № 8. – pp. 1566–1572.

27. Bosch, M. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation / M. Bosch, M. Dhadda, M. Hoegh-Petersen, Y. Liu, L. M. Hagel, P. Podgorny, A. Ugarte-Torres, F. M. Khan, J. Luiders, I. Auer-Grzesiak, A. Mansoor, J. A. Russell, A. Daly, D. A. Stewart, D. Maloney, M. Boeckh, J. Storek // *Cytotherapy*. – 2012. – vol. 14. – № 10. – pp. 1258–1275.

28. Bouriche, L. Detection of minimal residual disease in B cell acute lymphoblastic leukemia using an eight-color tube with dried antibody reagents / L. Bouriche, D. Bernot, V. Nivaggioni, I. Arnoux, M. Loosveld // *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* – 2019. – vol. 96. – № 2. – pp. 158–163.

29. Brissot, E. Tyrosine kinase inhibitors improve long-term outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia / E. Brissot, M. Labopin, M. M. Beckers, G. Socié, A. Rambaldi, L. Volin, J. Finke, S. Lenhoff, N. Kröger, G. J. Ossenkoppele, C. F. Craddock, I. Yakoub-Agha, G. Gürman, N. H. Russell, M. Aljurf, M. N. Potter, A. Nagler, O. Ottmann, J. J. Cornelissen, J. Esteve, M. Mohty // *Haematologica*. – 2015. – vol. 100. – № 3. – pp. 392–399.

30. Brüggemann, M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation / M. Brüggemann, M. Kotrova // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* – 2017. – vol. 2017. – № 1. – pp. 13–21.

31. Brüggemann, M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? / M. Brüggemann, T. Raff, M. Kneba // *Blood*. – 2012. – vol. 120. – № 23. – pp. 4470–81.

32. Buccisano, F. Pre-transplant persistence of minimal residual disease does not contraindicate allogeneic stem cell transplantation for adult patients with acute myeloid leukemia / F. Buccisano, L. Maurillo, A. Piciocchi, M. I. Del Principe, A. Picardi, R. Cerretti, L. Cudillo, G. De Angelis, C. Sarlo, M. Cefalo, C. Ditto, A. Di Veroli, B. Mariotti, D. Nasso, E. De Bellis, G. Del Poeta, M. T. Voso, G. Sconocchia, F.

Lo Coco, W. Arcese, S. Amadori, A. Venditti // *Bone Marrow Transplant.* – 2017. – vol. 52 – № 3. – pp. 473–475.

33. Buckley, S.A. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis / S. A. Buckley, B. L. Wood, M. Othus, C. S. Hourigan, C. Ustun, M. A. Linden, T. E. DeFor, M. Malagola, C. Anthias, V. Valkova, C. G. Kanakry, B. Gruhn, F. Buccisano, B. Devine, R. B. Walter // *Haematologica.* – 2017. – vol. 102. – № 5. – pp. 865–873.

34. Buonamici, S. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state / S. Buonamici, E. Ottaviani, N. Testoni, V. Montefusco, G. Visani, F. Bonifazi, M. Amabile, C. Terragna, D. Ruggeri, P. P. Piccaluga, A. Isidori, M. Malagola, M. Baccharani, S. Tura, G. Martinelli // *Blood.* – 2002. – vol. 99. – № 2. – pp. 443–449.

35. Burnett, A.K. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 Trial / A. K. Burnett, N. H. Russell, R. K. Hills, A. E. Hunter, L. Kjeldsen // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – vol. 31. – № 27. – pp. 3360–3368.

36. Calabretta, E. The many facets of CD38 in lymphoma: from tumor-microenvironment cell interactions to acquired resistance to immunotherapy / E. Calabretta, C. Carlo-Stella // *Cells.* – 2020. – vol. 9 – № 4. – p. 802.

37. Campana, D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients / D. Campana // *Br. J. Haematol.* – 2003. – vol. 121 – № 6. – pp. 823–38.

38. Campana, D. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia / D. Campana, E. Coustan-Smith // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2002. – vol. 15. – № 1. – pp. 1–19.

39. Campana, D. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia / D. Campana, E. Coustan-Smith, G. Janossy // *Blood* – 1990. – vol. 76 – № 1. – pp. 163–171.

40. Capizzi, R. L. Sequential high-dose ara-C and asparaginase in the therapy of previously treated and untreated patients with acute leukemia / R. L. Capizzi, B. L.

Powell, M. R. Cooper, J. J. Stuart // *Semin Oncol.* – 1985. – vol. 12. – № 2. – Suppl 3. – pp. 105–113.

41. Cazzaniga, G. Predictive value of minimal residual disease in philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, based on immunoglobulin/T-cell receptor and BCR/ABL1 methodologies / G. Cazzaniga, P. de Lorenzo, J. Alten, S. Röttgers, J. Hancock, V. Saha, A. Castor, H. O. Madsen, V. Gandemer, H. Cavé, V. Leoni, R. Köhler, G. M. Ferrari, K. Bleckmann, R. Pieters, V. Van Der Velden, J. Stary, J. Zuna, G. Escherich, U. Zur Stadt, M. Aricò, V. Conter, M. Schrappe, M. G. Valsecchi, A. Biondi // *Haematologica.* – 2018. – vol. 103. – № 1. – pp. 107–115.

42. Chang, C. C. Conversion of CD38 and/or myeloid-associated marker expression status during the course of B-CLL: association with a change to an aggressive clinical course / C. C. Chang, R. P. Cleveland // *Blood.* – 2002. – vol. 100. – № 3. – p. 1106.

43. Chatzidimitriou, D. Hematopoietic cell transplantation and emerging viral infections / D. Chatzidimitriou, E. Gavriilaki, I. Sakellari, E. Diza // *J. Med. Virol.* – 2010. – vol. 82. – № 3. – pp. 528–538.

44. Chen, H. Administration of imatinib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation may improve disease-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia / H. Chen, K. Liu, L. Xu, D. Liu, Y. Chen, X. Zhao, W. Han, X. Zhang, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Qin, Y. Liu, X. Huang // *J. Hematol. Oncol.* – 2012. – vol. 5. – p. 29.

45. Chen, J. S. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia / J. S. Chen, E. Coustan-Smith, T. Suzuki, G. A. Neale, K. Mihara, C. H. Pui, D. Campana // *Blood.* – 2001. – vol. 97. – № 7. – pp. 2115–2120.

46. Chen, Z. 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 / Z. Chen, Y. Tong, Y. Li, Q. Gao, Q. Wang, C. Fu, Z.

Xia // PLoS One. – 2015. – vol. 10 – № 3. –p. e0122530.

47. Cherian, S. A novel flow cytometric assay for detection of residual disease in patients with B-lymphoblastic leukemia/lymphoma post anti-CD19 therapy / S. Cherian, V. Miller, V. McCullouch, K. Dougherty, J. R. Fromm, B. L. Wood // *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* – 2018. – vol. 94. – № 1. – pp. 112–120.

48. Cheson, B. D. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia / B. D. Cheson, J. M. Bennett, K. J. Kopecky, T. Büchner, C. L. Willman, E. H. Estey, C. A. Schiffer, H. Doehner, M. S. Tallman, T. A. Lister, F. Lo-Coco, R. Willemze, A. Biondi, W. Hiddemann, R. A. Larson, B. Löwenberg, M. A. Sanz, D. R. Head, R. Ohno, C. D. Bloomfield, F. LoCocco // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – vol. 21. – № 24. – pp. 4642–4649.

49. Cilloni, D. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study / D. Cilloni, A. Renneville, F. Hermitte, R. K. Hills, S. Daly, J. V Jovanovic, E. Gottardi, M. Fava, S. Schnittger, T. Weiss, B. Izzo, J. Nomdedeu, A. van der Heijden, B. A. van der Reijden, J. H. Jansen, V. H. J. van der Velden, H. Ommen, C. Preudhomme, G. Saglio, D. Grimwade // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – vol. 27. – № 31. – pp. 5195–201.

50. Ciudad, J. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. / J. Ciudad, A. Orfao, B. Vidriales, A. Macedo, A. Martínez, M. González, M. C. López-Berges, B. Valverde, J. F. San Miguel // *Haematologica.* – 1998. – vol. 83 – № 12. – pp. 1069–75.

51. Cui, W. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings / W. Cui, D. Zhang, M. T. Cunningham, L. Tilzer // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2014. – vol. 36. – № 6. – pp. 636–649.

52. DeFilipp, Z. Does post-transplant maintenance therapy with tyrosine kinase inhibitors improve outcomes of patients with high-risk philadelphia chromosome-

positive leukemia? / Z. DeFilipp, A. A. Langston, Z. Chen, C. Zhang, M. L. Arellano, F. El Rassi, C. R. Flowers, V. K. Kota, Z. Al-Kadhimi, R. Veldman, A. P. Jillella, S. Lonial, E. K. Waller, H. J. Khoury // *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* – 2016. – vol. 16. – № 8. – pp. 466–471.

53. Delaney, C. Cord blood transplantation for haematological malignancies: Conditioning regimens, double cord transplant and infectious complications / C. Delaney, J. A. Gutman, F.R. Appelbaum // *Br. J. Haematol.* – 2009. – vol. 147. – № 2. – pp. 207–216.

54. Delwel, R. Phenotyping of acute myelocytic leukemia (AML) progenitors: an approach for tracing minimal numbers of AML cells among normal bone marrow / R. Delwel, R. van Gorp, F. Bot, I. Touw // *Leukemia.* – 1988. – vol. 2. – № 12. – pp. 814–819.

55. Denys, B. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia / B. Denys, A. J. Van Der Sluijs-Gelling, C. Homburg, C. E. Van Der Schoot, V. De Haas, J. Philippé, R. Pieters, J. J. M. Van Dongen, V. H. J. Van Der Velden // *Leukemia.* – 2013. – vol. 27 – № 3. – pp. 635–641.

56. Dhédin, N. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia / N. Dhédin, A. Huynh, S. Maury, R. Tabrizi, K. Beldjord, V. Asnafi, X. Thomas, P. Chevallier, S. Nguyen, V. Coiteux, J. H. Bourhis, Y. Hichri, M. Escoffre-Barbe, O. Reman, C. Graux, Y. Chalandon, D. Blaise, U. Schanz, V. Lhéritier, J. Y. Cahn, H. Dombret, N. Ifrah // *Blood.* – 2015. – vol. 125 – № 16. – pp. 2486–2496.

57. DiGiuseppe, J.A. Applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and posttreatment monitoring of B and T lymphoblastic leukemia/lymphoma / J. A. DiGiuseppe, B. L. Wood // *Cytom. Part B. – Clin. Cytom.* – 2019. – vol. 96. – № 4. – pp. 256–265.

58. Dignan, F.L. High readmission rates are associated with a significant economic burden and poor outcome in patients with grade III/IV acute GvHD / F. L. Dignan, M. N. Potter, M. E. Ethell, M. Taylor, L. Lewis, J. Brennan, L. Mcnamara, S. O. Evans, U. Riley, F. E. Davies, C. E. Dearden, G. J. Morgan, B. E. Shaw // *Clin.*

Transplant. – 2013. – vol. 27. – № 1. – pp. e56–e63.

59. Döhner, H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Büchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H.-F. Tien, A. H. Wei, B. Löwenberg, C. D. Bloomfield // *Blood*. – 2017. – vol. 129. – № 4. – pp. 424–447.

60. Dongen, J. J. van. 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 / J. J. van Dongen, E. A. Macintyre, J. A. Gabert, E. Delabesse, V. Rossi, G. Saglio, E. Gottardi, A. Rambaldi, G. Dotti, F. Griesinger, A. Parreira, P. Gameiro, M. G. Díaz, M. Malec, A. W. Langerak, J. F. San Miguel, A. Biondi // *Leukemia*. – 1999. – vol. 13. – № 12. – pp. 1901–1928.

61. Dongen, J. J. van. 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 / J. J. van Dongen, A. W. Langerak, M. Brüggemann, P. A. S. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurin, R. García-Sanz, J. H. J. M. van Krieken, J. Droese, D. González, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. González, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba, E. A. Macintyre // *Leukemia*. – 2003. – vol. 17. – № 12. – pp. 2257–2317.

62. Drovkov, M. Preanalytical phase in flow cytometric evaluation of bone marrow / M. Drovkov, N. Popova, Y. Davydova, V. Dvirnyk, A. Kuchmiy, A. Vdovin, L. Kuzmina, D. Dubnyak, I. Galtseva, N. Kapranov, V. Vasilyeva, O. Koroleva, E. Mikhalcova, Z. Konova, G. Efimov, E. Parovichnikova, V. Savchenko // *Cytom. Crossroads cult. ESCCA*. – 2017.

63. Dworzak, M. N. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible / M. N. Dworzak, G. Gaipa, R. Ratei, M. Veltroni, A. Schumich, O. Maglia, L.

Karawajew, A. Benetello, U. Pötschger, Z. Husak, H. Gadner, A. Biondi, W.-D. Ludwig, G. Basso // *Cytom. Part B Clin. Cytom.* – 2008. – vol. 74B. – № 6. – pp. 331–340.

64. Eckert, C. Interventional intensification of chemotherapy prior to hematopoietic stem cell transplantation reduces residual leukemia but does not improve survival in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia / C. Eckert, C. Chen-Santel, C. Peters, T. Klingebiel, B. Gruhn, R. Handgretinger, G. Henze, A. von Stackelberg // *Blood.* – 2014. – vol. 124. – № 21. – p. 61.

65. Eckert, C. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96 / C. Eckert, A. von Stackelberg, K. Seeger, T. W. L. Groeneveld, C. Peters, T. Klingebiel, A. Borkhardt, M. Schrappe, G. Escherich, G. Henze // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – vol. 49. – № 6. – pp. 1346–1355.

66. Eissens, D. N. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues / D. N. Eissens, J. Spanholtz, A. van der Meer, B. van Cranenbroek, H. Dolstra, J. Kwekkeboom, F. W. M. B. Preijers, I. Joosten // *PLoS One.* – 2012. – vol. 7. – № 2. – p. e30930.

67. Engel, P. CD nomenclature 2015: Human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology / P. Engel, L. Boumsell, R. Balderas, A. Bensussan, V. Gattei, V. Horejsi, B.-Q. Jin, F. Malavasi, F. Mortari, R. Schwartz-Albiez, H. Stockinger, M. C. van Zelm, H. Zola, G. Clark // *J. Immunol.* – 2015. – vol. 195. – № 10. – pp. 4555–4563.

68. Fletcher, A. L. Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment / A. L. Fletcher, T. E. Lowen, S. Sakkal, J. J. Reiseger, M. V. Hammett, N. Seach, H. S. Scott, R. L. Boyd, A. P. Chidgey // *J. Immunol.* – 2009. – vol. 183. – № 2. – pp. 823–831.

69. Freeman, S. D. Measurable residual disease at induction redefines partial response in acute myeloid leukemia and stratifies outcomes in patients at standard risk without NPM1 mutations / S. D. Freeman, R. K. Hills, P. Virgo, N. Khan, S. Couzens,

R. Dillon, A. Gilkes, L. Upton, O. J. Nielsen, J. D. Cavenagh, G. Jones, A. Khwaja, P. Cahalin, I. Thomas, D. Grimwade, A. K. Burnett, N. H. Russell // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – vol. 36. – № 15. – pp. 1486–1497.

70. Gabert, J. 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 / J. Gabert, E. Beillard, V. H. J. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J. M. Cayuela, H. Cavé, F. Pane, J. L. E. Aerts, D. De Micheli, X. Thirion, V. Pradel, M. González, S. Viehmann, M. Malec, G. Saglio, J. J. M. van Dongen // *Leukemia.* – 2003. – vol. 17. – № 12. – pp. 2318–2357.

71. Gardiner, J. C. Evaluating the accuracy of clinical prediction models for binary and survival outcomes / J. C. Gardiner // *Pap.* 2831-2018. – 2018. – pp. 1–21.

72. Gennery, A. R. Infection following haematopoietic stem cell transplantation / A. R. Gennery, P. Maggina // *Paediatr. Child Heal.* – 2014. – vol. 24. – № 6. – pp. 236–241.

73. Geyer, M. B. A comparison of immune reconstitution and graft-versus-host disease following myeloablative conditioning versus reduced toxicity conditioning and umbilical cord blood transplantation in paediatric recipients / M. B. Geyer, J. S. Jacobson, J. Freedman, D. George, V. Moore, C. Van De Ven, P. Satwani, M. Bhatia, J. H. Garvin, M. B. Bradley, L. Harrison, E. Morris, P. Della-Latta, J. Schwartz, L. A. Baxter-Lowe, M. S. Cairo // *Br. J. Haematol.* – 2011. – vol. 155. – № 2. – pp. 218–234.

74. Giebel, S. Comparable results of autologous and allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for adults with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia in first complete molecular remission: An analysis by the Acute Leukemia Working Party of the EBMT / S. Giebel, M. Labopin, M. Potter, X. Poiré, H. Sengeloev, G. Socié, A. Huynh, B. V Afanasyev, U. Schanz, O. Ringden, P. Kalhs, D. W. Beelen, A. M. Campos, T. Masszi, J. Canaani, M. Mohty, A. Nagler // *Eur. J. Cancer.* – 2018. – vol. 96. – pp. 73–81.

75. Gill, J. E. 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties / J. E. Gill, M. M. Jotz, S. G. Young, E. J. Modest, S. K. Sengupta // *J.*

Histochem. Cytochem. – 1975. – vol. 23. – № 11. – pp. 793–799.

76. Gilliland, D. G. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia / D. G. Gilliland, J. D. Griffin // *Blood*. – 2002. – vol. 100 – № 5. – pp. 1532–1542.

77. Goardon, N. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia / N. Goardon, E. Marchi, A. Atzberger, L. Quek, A. Schuh, S. Soneji, P. Woll, A. Mead, K. A. Alford, R. Rout, S. Chaudhury, A. Gilkes, S. Knapper, K. Beldjord, S. Begum, S. Rose, N. Geddes, M. Griffiths, G. Standen, A. Sternberg, J. Cavenagh, H. Hunter, D. Bowen, S. Killick, L. Robinson, A. Price, E. Macintyre, P. Virgo, A. Burnett, C. Craddock, T. Enver, S. E. W. Jacobsen, C. Porcher, P. Vyas // *Cancer Cell*. – 2011. – vol. 19. – № 1. – pp. 138–152.

78. Gökbuget, N. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia / N. Gökbuget, H. Dombret, M. Bonifacio, A. Reichle, C. Graux, C. Faul, H. Diedrich, M. S. Topp, M. Brüggemann, H. A. Horst, V. Havelange, J. Stieglmaier, H. Wessels, V. Haddad, J. E. Benjamin, G. Zugmaier, D. Nagorsen, R. C. Bargou // *Blood*. – 2018. – vol. 131. – № 14. – pp. 1522–1531.

79. Gökbuget, N. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies / N. Gökbuget, M. Kneba, T. Raff, H. Trautmann, C.-R. Bartram, R. Arnold, R. Fietkau, M. Freund, A. Ganser, W.-D. Ludwig, G. Maschmeyer, H. Rieder, S. Schwartz, H. Serve, E. Thiel, M. Brüggemann, D. Hoelzer, German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia // *Blood*. – 2012. – vol. 120. – № 9. – pp. 1868–1876.

80. Gratwohl, A. The EBMT risk score / A. Gratwohl // *Bone Marrow Transplant*. – 2012. – vol. 47. – № 6. – pp. 749–756.

81. Gratwohl, A. Pre-transplantation risks and transplant-techniques in haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia / A. Gratwohl, R. Duarte, J. A. Snowden, A. van Biezen, H. Baldomero, J. Apperley, J. Cornelissen, H. T. Greinix, E. M. Grath, M. Mohty, N. Kroeger, A. Nagler, D. Niederwieser, H. Putter, R. Brand // *EClinicalMedicine*. – 2019. – vol. 15. – pp. 33–41.

82. Grimwade, D. Defining minimal residual disease in acute myeloid

leukemia: which platforms are ready for “prime time”? / D. Grimwade, S. D. Freeman // *Hematology*. – 2014. – vol. 2014. – № 1. – pp. 222–233.

83. Grimwade, D. 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 / D. Grimwade, R. K. Hills, A. V Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett // *Blood*. – 2010. – vol. 116. – № 3. – pp. 354–365.

84. Guo, C. Evaluating predictive accuracy of survival models with PROC PHREG changbin / C. Guo, Y. So, W. Jang // *Pap. SAS462-2017*. – pp. 1–16.

85. Guo, C. Analyzing interval-censored data with the ICLIFETEST procedure / C. Guo, Y. So, G. Johnston // *Pap. SAS279-2014*. – 2014. – pp. 1–9.

86. Gutman, J. A. Single-unit dominance after double-unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8+ T-cell response against the nonengrafted unit / J. A. Gutman, C. J. Turtle, T. J. Manley, S. Heimfeld, I. D. Bernstein, S. R. Riddell, C. Delaney // *Blood*. – 2010. – vol. 115. – № 4. – pp. 757–765.

87. Hakki, M. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation / M. Hakki, S. R. Riddell, J. Storek, R. A. Carter, T. Stevens-Ayers, P. Sudour, K. White, L. Corey, M. Boeckh // *Blood*. – 2003. – vol. 102 – № 8. – pp. 3060–3067.

88. Hämäläinen, M. M. Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia / M. M. Hämäläinen, V. Kairisto, V. Juvonen, J. Johansson, J. Aurén, K. Kohonen, K. Remes, T. T. Salmi, H. Helenius, T.-T. Pelliniemi // *Eur. J. Haematol.* – 2008. – vol. 80 – № 3. – pp. 201–207.

89. Hansen, L. O. Interventions to reduce 30-day rehospitalization: A systematic review / L. O. Hansen, R. S. Young, K. Hinami, A. Leung, M. V. Williams // *Ann. Intern. Med.* – 2011. – vol. 155. – № 8. – pp. 520–528.

90. Hill, A. J. Occurrence of T-cell and NK-cell subsets with less well-

recognized phenotypes in peripheral blood submitted for routine flow cytometry analysis / A. J. Hill, C. Zhang, M. Kusakabe, K. Gowing, X. Wang, R. R. Brinkman, A. P. Weng, J. P. Weng // *Cytom. Part B – Clin. Cytom.* – 2021. – vol. 100. – № 2. – pp. 235–239.

91. Hogan, K. A. The multi-faceted ecto-enzyme CD38: roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases / K. A. Hogan, C. C. S. Chini, E. N. Chini // *Front. Immunol.* – 2019. – vol. 10.

92. Hovorkova, L. Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology / L. Hovorkova, M. Zaliova, N. C. Venn, K. Bleckmann, M. Trkova, E. Potuckova, M. Vaskova, J. Linhartova, K. Machova Polakova, E. Fronkova, W. Muskovic, J. E. Giles, P. J. Shaw, G. Cario, R. Sutton, J. Stary, J. Trka, J. Zuna // *Blood.* – 2017. – vol. 129. – № 20. – pp. 2771–2781.

93. Ibrahim, S. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia / S. Ibrahim, M. Keating, K. A. Do, S. O'Brien, Y. O. Huh, I. Jilani, S. Lerner, H. M. Kantarjian, M. Albitar // *Blood.* – 2001. – vol. 98. – № 1. – pp. 181–186.

94. Inaba, H. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. / H. Inaba, E. Coustan-Smith, X. Cao, S. B. Pounds, S. A. Shurtleff, K. Y. Wang, S. C. Raimondi, M. Onciu, J. Jacobsen, R. C. Ribeiro, G. V Dahl, W. P. Bowman, J. W. Taub, B. Degar, W. Leung, J. R. Downing, C.-H. Pui, J. E. Rubnitz, D. Campana // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – vol. 30. – № 29. – pp. 3625–3632.

95. Jaso, J. M. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future / J. M. Jaso, S. A. Wang, J. L. Jorgensen, P. Lin // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – vol. 49. – № 9. – pp. 1129–38.

96. Jegalian, A. G. Plasmacytoid dendritic cells physiologic roles and pathologic states / A. G. Jegalian, F. Facchetti, E. S. Jaffe // *Adv. Anat. Pathol.* – 2009. – vol. 16. – № 6. – pp. 392–404.

97. Jorgensen, J. L. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid

leukemia: methods and best applications / J. L. Jorgensen, S. S. Chen // Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk. – 2011. – vol. 11 Suppl 1. – pp. S49-53.

98. Kanda, J. Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation / J. Kanda, L. W. Chiou, P. Szabolcs, G. D. Sempowski, D. A. Rizzieri, G. D. Long, K. M. Sullivan, C. Gasparetto, J. P. Chute, A. Morris, J. McPherson, J. Hale, J. A. Livingston, G. Broadwater, D. Niedzwiecki, N. J. Chao, M. E. Horwitz // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2012. – vol. 18. – № 11. – pp. 1664–1676.

99. Karawajew, L. Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia / L. Karawajew, M. Dworzak, R. Ratei, P. Rhein, G. Gaipa, B. Buldini, G. Basso, O. Hrusak, W. D. Ludwig, G. Henze, K. Seeger, A. Von Stackelberg, E. Mejstrikova, C. Eckert // Haematologica. – 2015. – vol. 100. – № 7. – pp. 935–944.

100. Keeney, M. A QA program for MRD testing demonstrates that systematic education can reduce discordance among experienced interpreters / M. Keeney, B. L. Wood, B. D. Hedley, J. A. DiGiuseppe, M. Stetler-Stevenson, E. Paietta, G. Lozanski, A. C. Seegmiller, B. W. Greig, A. C. Shaver, L. Mukundan, H. R. Higley, C. C. Sigman, G. Kelloff, J. M. Jessup, M. J. Borowitz // Cytom. Part B - Clin. Cytom. – 2018. – vol. 94. – № 2. – pp. 239–249.

101. Kern, W. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML / W. Kern, U. Bacher, C. Haferlach, S. Schnittger, T. Haferlach // Best Pract. Res. Clin. Haematol. – 2010. – vol. 23. – № 3. – pp. 379–390.

102. Klyuchnikov, E. Post-transplant immune reconstitution after unrelated allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia / E. Klyuchnikov, S. Asenova, W. Kern, G. Kilinc, F. Ayuk, B. Wiedemann, M. Lioznov, P. Freiburger, Y. Zalyalov, A. R. Zander, N. Krger, U. Bacher // Leuk. Lymphoma. – 2010. – vol. 51. – № 8. – pp. 1450–1463.

103. Klyuchnikov, E. Role of pre-transplant MRD level detected by flow cytometry in recipients of allogeneic stem cell transplantation with AML / E. Klyuchnikov, M. Christopeit, A. Badbaran, U. Bacher, U. Fritzsche-Friedland, U.-M.

von Pein, C. Wolschke, N. Kröger // *Eur. J. Haematol.* – 2021. – vol. 106. – № 5. – pp. 606–615.

104. Körbling, M. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: Does the source of hematopoietic stem cells matter? / M. Körbling, P. Anderlini // *Blood.* – 2001. – vol. 98. – № 10. – pp. 2900–2908.

105. Kottaridis, P. D. 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 / P. D. Kottaridis, R. E. Gale, S. E. Langabeer, M. E. Frew, D. T. Bowen, D. C. Linch // *Blood.* – 2002. – vol. 100. – № 7. – pp. 2393–2398.

106. Krenger, W. The immunopathology of thymic GVHD // *Semin. Immunopathol.* – 2008. – vol. 30. – № 4. – pp. 439–456.

107. Krenger, W. Apoptosis of thymocytes during acute graft-versus-host disease is independent of glucocorticoids / W. Krenger, S. Rossi, G. A. Holländer // *Transplantation.* – 2000. – vol. 69. – № 10. – pp. 2190–2193.

108. Lang, P. Transplantation of CD3/CD19 depleted allografts from haploidentical family donors in paediatric leukaemia / P. Lang, H. M. Teltschik, T. Feuchtinger, I. Müller, M. Pfeiffer, M. Schumm, M. Ebinger, C. P. Schwarze, B. Gruhn, A. Schrauder, M. H. Albert, J. Greil, C. Urban, R. Handgretinger // *Br. J. Haematol.* – 2014. – vol. 165. – № 5. – pp. 688–698.

109. Langebrake, C. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring / C. Langebrake, I. Brinkmann, A. Teigler-Schlegel, U. Creutzig, F. Griesinger, U. Puhlmann, D. Reinhardt // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2005. – vol. 63. – № 1. – pp. 1–9.

110. Lee, R. V. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia / R. V. Lee, R. C. Braylan, L. M. Rimsza // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2005. – vol. 123. – № 1. – pp. 119–124.

111. Liao, H. The prognostic significance of hematogones and CD34+ myeloblasts in bone marrow for adult B-cell lymphoblastic leukemia without minimal

residual disease / H. Liao, Q. Zheng, Y. Jin, T. Chozom, Y. Zhu, L. Liu, N. Jiang // *Sci. Rep.* – 2019. – vol. 9. – № 1. – p. 19722.

112. Lindström, M. S. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. / M. S. Lindström // *Biochem. Res. Int.* – 2011. – T. 2011. – p. 195209.

113. Ljungman, P. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients / P. Ljungman, M. Hakki, M. Boeckh // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2011. – vol. 25. – № 1. – pp. 151–169.

114. Lobanova, T. Negative minimal residual disease status by multicolour flow cytometry after 1st course is the most predictive factor for aml patients / T. Lobanova, E. Parovichnikova, I. Galtseva, V. Troitskaya, Y. Davydova, N. Kapranov, S. Kulikov, I. Lukianova, A. Sokolov, V. Savchenko // *HemaSphere.* – 2019. – vol. 3. – p. 477.

115. Lochem, E. G. van. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy / E. G. Van Lochem, Y. M. Wieggers, R. Van Den Beemd, K. Hähnen, J. J. M. Van Dongen, H. Hooijkaas // *Leukemia.* – 2000. – vol. 14. – № 4. – pp. 688–695

116. Lúcio, P. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: A frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL / P. Lúcio, A. Parreira, M. W. M. Van Den Beemd, E. G. Van Lochem, E. R. Van Wering, E. Baars, A. Porwit-MacDonald, E. Bjorklund, G. Gaipa, A. Biondi, A. Orfao, G. Janossy, J. J. M. Van Dongen, J. F. San Miguel // *Leukemia.* – 1999. – vol. 13. – № 3. – pp. 419–427.

117. Lugthart, S. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated / S. Lugthart, E. van Drunen, Y. van Norden, A. van Hoven, C. A. J. Erpelinck, P. J. M. Valk, H. B. Beverloo, B. Löwenberg, R. Delwel // *Blood.* – 2008. – vol. 111. – № 8. – pp. 4329–4337.

118. Luznik, L. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation / L. Luznik, P. V. O'Donnell, E. J. Fuchs // *Semin. Oncol.* – 2012. – vol. 39. – № 6. – pp. 683–693.

119. Mackall, C. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery / C. Mackall, T. Fry, R. Gress, K. Peggs, J. Storek, A. Toubert // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – vol. 44. – № 8. – pp. 457–462.

120. Mackall, C. L. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy / C. L. Mackall, T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein, I. T. Magrath, L. H. Wexler, D. S. Dimitrov, R. E. Gress // *Blood.* – 1997. – vol. 89. – № 10. – pp. 3700–3707.

121. Maher, O. M. Etiologies and impact of readmission rates in the first 180 days after hematopoietic stem cell transplantation in children, adolescents, and young adults / O. M. Maher, J. G. Silva, W. W. Huh, B. Cuglievan, A. Depombo, P. Kebriaei, M. Park, D. Liu, C. Tillman, N. Tarek, L. J. N. Cooper, P. Tewari // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* – 2017. – vol. 39. – № 8. – pp. 609–613.

122. Majhail, N. S. Costs of autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation in the United States: a study using a large national private claims database / N. S. Majhail, L. W. Mau, E. M. Denzen, T. J. Arneson // *Bone Marrow Transplant.* – 2013. – vol. 48 – № 2. – pp. 294–300.

123. Maksimovic, N. Incidence and mortality patterns of acute myeloid leukemia in Belgrade, Serbia (1999-2013) / N. Maksimovic, M. Zaric, T. Gazibara, G. Trajkovic, G. Maric, D. Miljus, N. S. Vukovic, D. Tomin, M. Virijevec, D. K. Tepavcevic, T. Pekmezovic // *Med.* – 2018. – vol. 54. – № 1. – p. 5.

124. Martínez, C. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation / C. Martínez, A. Urbano-Ispizua, M. Rovira, E. Carreras, C. Rozman, E. Montserrat // *Leuk Lymphoma.* – 2009. – vol. 37. – №(5–6). –pp. 535–542.

125. Maurillo, L. Minimal residual disease as biomarker for optimal biologic dosing of ARA-C in patients with acute myeloid leukemia / L. Maurillo, F. Buccisano, A. Piciocchi, M. I. Del Principe, C. Sarlo, A. Di Veroli, P. Panetta, M. Irno-Consalvo, D. Nasso, C. Ditto, M. Refrigeri, G. De Angelis, R. Cerretti, W. Arcese, G. Sconocchia, F. Lo-Coco, S. Amadori, A. Venditti // *Am. J. Hematol.* – 2015. – vol. 90. – № 2. – pp.

125–131.

126. Maurillo, L. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia / L. Maurillo, F. Buccisano, M. I. Del Principe, G. Del Poeta, A. Spagnoli, P. Panetta, E. Ammatuna, B. Neri, L. Ottaviani, C. Sarlo, D. Venditti, M. Quaresima, R. Cerretti, M. Rizzo, P. de Fabritiis, F. Lo Coco, W. Arcese, S. Amadori, A. Venditti // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – vol. 26 – № 30. – pp. 4944–51.

127. McIlvennan, C. K. Hospital readmissions reduction program / C. K. McIlvennan, Z. J. Eapen, L. A. Allen // *Circulation.* – 2015. – vol. 131. – № 20. – pp. 1796–1803.

128. Mejstříková, E. CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment // *Blood Cancer J.* – 2017. – vol. 7. – № 12. – p.659.

129. Morecki, S. Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen / S. Morecki, Y. Gelfand, A. Nagler, R. Or, E. Naparstek, G. Varadi, D. Engelhard, A. Akerstein, S. Slavin // *Bone Marrow Transplant.* – 2001. – vol. 28. – № 3. – pp. 243–249.

130. Moss, P. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation / P. Moss, A. Rickinson // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – vol. 5 – № 1. – pp. 9–20.

131. Muzzafar, T. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. / T. Muzzafar, L. J. Medeiros, S. A. Wang, A. Brahmandam, D. A. Thomas, J. L. Jorgensen // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2009. – vol. 132. – № 5. – pp. 692–698.

132. Na, I. K. The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease / I. K. Na, S. X. Lu, N. L. Yim, G. L. Goldberg, J. Tsai, U. Rao, O. M. Smith, C. G. King, D. Suh, D. Hirschhorn-Cymerman, L. Palomba, O. Penack, A. M. Holland, R. R. Jenq, A. Ghosh, H. Tran, T. Merghoub, C. Liu, G. D. Sempowski, M. Ventevogel, N. Beauchemin, M. R. M. Van Den Brink // *J.*

Clin. Invest. – 2010. – vol. 120. – № 1. – pp. 343–356.

133. Nagel, I. Hematopoietic stem cell involvement in BCR-ABL1-positive ALL as a potential mechanism of resistance to blinatumomab therapy / I. Nagel, M. Bartels, J. Duell, H.-H. Oberg, S. Ussat, H. Bruckmueller, O. Ottmann, H. Pfeifer, H. Trautmann, N. Gökbüget, A. Caliebe, D. Kabelitz, M. Kneba, H.-A. Horst, D. Hoelzer, M. S. Topp, I. Cascorbi, R. Siebert, M. Brüggemann // *Blood*. – 2017. – vol. 130. – № 18. – pp. 2027–2031.

134. Neale, G. A. M. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia / G. A. M. Neale, E. Coustan-Smith, P. Stow, Q. Pan, X. Chen, C.-H. Pui, D. Campana // *Leukemia*. – 2004. – vol. 18. – № 5. – pp. 934–938.

135. Nunes, V. An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2017. – vol. 17. – № 11. – pp. 953–963.

136. Ostendorf, B. N. Phenotypic characterization of aberrant stem and progenitor cell populations in myelodysplastic syndromes / B. N. Ostendorf, E. Flenner, A. Flörcken, J. Westermann // *PLoS One*. – 2018. – vol. 13 – № 5. –p. e0197823.

137. Ouyang, J. 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 / J. Ouyang, M. Goswami, J. Peng, Z. Zuo, N. Daver, G. Borthakur, G. Tang, L. J. Medeiros, J. L. Jorgensen, F. Ravandi, S. A. Wang // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2016. – vol. 145. – № 6. – pp. 769–777.

138. Palmieri, R. Clinical relevance of- limit of detection (LOD) - limit of quantification (LOQ) - based flow cytometry approach for measurable residual disease (MRD) assessment in acute myeloid leukemia (AML) / R. Palmieri, A. Piciocchi, V. Arena, L. Maurillo, M. I. Del Principe, G. Paterno, T. Ottone, M. Divona, S. Lavoragna, M. Irno Consalvo, C. Conti, C. Attrotto, D. Fraboni, M. T. Voso, W. Arcese, A. Venditti, F. Buccisano // *Blood*. – 2020. – vol. 136. – № Supplement 1. – pp. 37–38.

139. Papaemmanuil E. Genomic classification and prognosis in acute myeloid

leukemia / E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Bullinger, V. I. Gaidzik, P. Paschka, N. D. Roberts, N. E. Potter, M. Heuser, F. Thol, N. Bolli, G. Gundem, P. Van Loo, I. Martincorena, P. Ganly, L. Mudie, S. McLaren, S. O'Meara, K. Raine, D. R. Jones, J. W. Teague, A. P. Butler, M. F. Greaves, A. Ganser, K. Döhner, R. F. Schlenk, H. Döhner, P. J. Campbell // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – vol. 374. – № 23. – pp. 2209–2221.

140. Park, B. G. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: Comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients / B. G. Park, C. J. Park, S. Jang, H. S. Chi, D. Y. Kim, J. H. Lee, J. H. Lee, K. H. Lee // *Leuk. Res.* – 2015. – vol. 39. – № 12. – pp. 1334–1341.

141. Patel, B. 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 / B. Patel, L. Rai, G. Buck, S. M. Richards, Y. Mortuza, W. Mitchell, G. Gerrard, A. V Moorman, V. Duke, A. V. Hoffbrand, A. K. Fielding, A. H. Goldstone, L. Foroni // *Br. J. Haematol.* – 2010. – vol. 148. – № 1. – pp. 80–89.

142. Pavlu, J. The role of measurable residual disease (MRD) at time of allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia transplanted after myeloablative conditioning. a study on behalf of the acute leukemia working party of the european society for blood and marrow transplantation / J. Pavlu, M. Labopin, R. Niittyvuopio, G. Socié, I. Yakoub-Agha, D. Wu, P. Remenyi, J. Passweg, D. Beelen, M. Aljurf, N. Kröger, H. Labussière-Wallet, S. Giebel, A. Nagler, M. Mohty // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2019. – vol. 25. – № 3. – p. S7.

143. Peggs, K. S. Immune reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation / K. S. Peggs, S. Mackinnon // *Br. J. Haematol.* – 2004. – vol. 124. – № 4. – pp. 407–420.

144. Pemmaraju, N. Significance of recurrence of minimal residual disease detected by multi-parameter flow cytometry in patients with acute lymphoblastic leukemia in morphological remission / N. Pemmaraju, H. Kantarjian, J. L. Jorgensen, E.

Jabbour, N. Jain, D. Thomas, S. O'Brien, X. Wang, X. Huang, S. A. Wang, M. Konopleva, S. Konoplev, T. Kadia, R. Garris, S. Pierce, G. Garcia-Manero, J. Cortes, F. Ravandi // *Am. J. Hematol.* – 2017. – vol. 92. – № 3. – pp. 279–285.

145. Petersen, S. L. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – vol. 32. – № 1. – pp. 65–72.

146. Pfeifer, H. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia / H. Pfeifer, B. Wassmann, W. Bethge, J. Dengler, M. Bornhäuser, M. Stadler, D. Beelen, V. Vucinic, T. Burmeister, M. Stelljes, C. Faul, P. Dreger, A. Kiani, K. Schäfer-Eckart, R. Schwerdtfeger, E. Lange, B. Kubuschok, H. A. Horst, M. Gramatzki, P. Brück, H. Serve, D. Hoelzer, N. Gökbüget, O. G. Ottmann, GMALL Study Group // *Leukemia.* – 2013. – vol. 27. – № 6. – pp. 1254–62.

147. Poeta, G. Del. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia / G. Del Poeta, L. Maurillo, A. Venditti, F. Buccisano, A. M. Epiceno, G. Capelli, A. Tamburini, G. Suppo, A. Battaglia, M. I. Del Principe, B. Del Moro, M. Masi, S. Amadori // *Blood.* – 2001. – vol. 98. – № 9. – pp. 2633–2639.

148. Porter, D. L. NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / D. L. Porter, E. P. Alyea, J. H. Antin, M. DeLima, E. Estey, J. H. F. Falkenburg, N. Hardy, N. Kroeger, J. Leis, J. Levine, D. G. Maloney, K. Peggs, J. M. Rowe, A. S. Wayne, S. Giralt, M. R. Bishop, K. van Besien // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2010. – vol. 16 – № 11. – pp. 1467–1503.

149. Porwit-MacDonald, A. 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) / A. Porwit-MacDonald, E. Björklund, P. Lucio, E. G. van Lochem, J. Mazur, A. Parreira,

M. W. van den Beemd, E. R. van Wering, E. Baars, G. Gaipa, A. Biondi, J. Ciudad, J. J. van Dongen, J. F. San Miguel, A. Orfao // *Leukemia*. – 2000. – vol. 14 – № 5. – pp. 816–825.

150. Preisler, H. Some reasons for the lack of progress in the treatment of acute myelogenous leukemia: a review of three consecutive trials of the treatment of poor prognosis patients / H. Preisler, A. Raza, R. Larson, J. Goldberg // *Leuk Res.* – 1991. – vol. 15. – № 9. – pp. 773–780.

151. Pui, C. H. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study / C. H. Pui, D. Pei, E. Coustan-Smith, S. Jeha, C. Cheng, W. P. Bowman, J. T. Sandlund, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, H. Inaba, D. Bhojwani, T. A. Gruber, W. H. Leung, J. R. Downing, W. E. Evans, M. V Relling, D. Campana // *Lancet. Oncol.* – 2015. – vol. 16. – № 4. – pp. 465–474.

152. Pui, C. H. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. / C. H. Pui, D. Campana // *Leukemia*. – 2000. – vol. 14. – № 5. – pp. 783–785.

153. Purton, J. F. Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death / J. F. Purton, J. A. Monk, D. R. Liddicoat, K. Kyparissoudis, S. Sakkal, S. J. Richardson, D. I. Godfrey, T. J. Cole // *J. Immunol.* – 2004. – vol. 173. – № 6. – pp. 3816–3824.

154. Raff, T. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: Data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials / T. Raff, N. Gökbuget, S. Lüschen, R. Reutzel, M. Ritgen, S. Irmer, S. Böttcher, H. A. Horst, M. Kneba, D. Hoelzer, M. Brüggemann // *Blood*. – 2007. – vol. 109. – № 3. – pp. 910–915.

155. Rautenberg, C. Relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation: Prevention, detection, and treatment // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – vol. 20. – № 1. – p. 228.

156. Ravandi, F. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia / F.

Ravandi, J. L. Jorgensen, S. M. O'Brien, E. Jabbour, D. A. Thomas, G. Borthakur, R. Garris, X. Huang, G. Garcia-Manero, J. A. Burger, A. Ferrajoli, W. Wierda, T. Kadia, N. Jain, S. A. Wang, S. Konoplev, P. Kebriaei, R. E. Champlin, D. Mccue, Z. Estrov, J. E. Cortes, H. M. Kantarjian // *Br. J. Haematol.* – 2016. – vol. 172. – № 3. – pp. 392–400.

157. Ravandi, F. Detection of MRD may predict the outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive ALL treated with tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy / F. Ravandi, J. L. Jorgensen, D. A. Thomas, S. O'Brien, R. Garris, S. Faderl, X. Huang, S. Wen, J. A. Burger, A. Ferrajoli, P. Kebriaei, R. E. Champlin, Z. Estrov, P. Challagundla, S. A. Wang, R. Luthra, J. E. Cortes, H. M. Kantarjian // *Blood.* – 2013. – vol. 122. – № 7. – pp. 1214–1221.

158. Reading, C. L. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia / C. L. Reading, E. H. Estey, Y. O. Huh, D. F. Claxton, G. Sanchez, L. W. M. M. Terstappen, M. C. O'Brien // *Blood.* – 1993. – vol. 81. – № 11. – pp. 3083–3090.

159. Ribera, J.-M. 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.-M. Ribera, A. Oriol, M. Morgades, P. Montesinos, J. Sarrà, J. González-Campos, S. Brunet, M. Tormo, P. Fernández-Abellán, R. Guàrdia, M.-T. Bernal, J. Esteve, P. Barba, M.-J. Moreno, A. Bermúdez, A. Cladera, L. Escoda, R. García-Boyero, E. Del Potro, J. Bergua, M.-L. Amigo, C. Grande, M.-J. Rabuñal, J.-M. Hernández-Rivas, E. Feliu // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – vol. 32. – № 15. – pp. 1595–1604.

160. Riddell, S. R. The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / S. R. Riddell, C. Berger, M. Murata, S. Randolph, E. H. Warren // *Blood Rev.* – 2003. – vol. 17. – № 3. – pp. 153–162.

161. Rimsza, L. M. 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 / L. M. Rimsza, R. S. Larson, S. S. Winter, K. Foucar, Y. Y. Chong, K. W. Garner, C. P. Leith // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2000. – vol. 114. – № 1. – pp. 66–75.

162. Rubnitz, J. E. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukemia: results of the AML02 multicenter trial / J. E. Rubnitz, H. Inaba, G. Dahl, R. C. Ribeiro, N. J. Lacayo, X. Cao, S. Meshinchi // *Lancet Oncol.* – 2010. – vol. 11. – № 6. – pp. 543–552.

163. Russo, A. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: Dynamics and clinical implications / A. Russo, G. Oliveira, S. Berglund, R. Greco, V. Gambacorta, N. Cieri, C. Toffalori, L. Zito, F. Lorentino, S. Piemontese, M. Morelli, F. Giglio, A. Assanelli, M. T. L. Stanghellini, C. Bonini, J. Peccatori, F. Ciceri, L. Luznik, L. Vago // *Blood.* – 2018. – vol. 131. – № 2. – pp. 247–262.

164. San Miguel, J. F. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification / J. F. San Miguel, M. B. Vidriales, C. López-Berges, J. Díaz-Mediavilla, N. Gutiérrez, C. Cañizo, F. Ramos, M. J. Calmuntia, J. J. Pérez, M. González, A. Orfao // *Blood.* – 2001. – vol. 98. – № 6. – pp. 1746–1751.

165. Sanoja-Flores, L. Next generation flow (NGF): a high sensitive technique to detect circulating peripheral blood (PB) clonal plasma cells (cPC) in patients with newly diagnosed of plasma cell neoplasms (PCN) / L. Sanoja-Flores, B. Paiva, J. A. Flores-Montero, N. Puig, L. Burgos, O. García, F. Prosper, J. Merino, M. B. Vidriales, M.-V. Mateos, R. Garcia, L. Palomera, R. Rios, M. C. Cañizo, B. G. M. Durie, J. J. M. van Dongen, J. San Miguel, A. Orfao // *Blood.* – 2015. – vol. 126. – № 23. – p. 4180.

166. Schenk, T. M. Multilineage involvement of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia / T. M. Schenk, A. Keyhani, S. Bottcher, K. O. Kliche, A. Goodacre, J. Q. Guo, R. B. Arlinghaus, H. M. Kantarjian, M. Andreeff // *Leukemia.* – 1998. – vol. 12. – № 5. – pp. 666–674.

167. Schmid, C. Outcome after relapse of myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia following allogeneic stem cell transplantation: a

retrospective registry analysis on 698 patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation / C. Schmid, L. C. de Wreede, A. van Biezen, J. Finke, G. Ehninger, A. Ganser, L. Volin, D. Niederwieser, D. Beelen, P. Alessandrino, L. Kanz, M. Schleuning, J. Passweg, H. Veelken, J. Maertens, J. J. Cornelissen, D. Blaise, M. Gramatzki, N. Milpied, I. Yakoub-Agha, G. Mufti, M. Rovira, R. Arnold, T. de Witte, M. Robin, N. Kröger // *Haematologica*. – 2018. – vol. 103. – № 2. – pp. 237–245.

168. Schnittger S. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML / S. Schnittger, W. Kern, C. Tschulik, T. Weiss, F. Dicker, B. Falini, C. Haferlach, T. Haferlach // *Blood*. – 2009. – vol. 114. – № 11. – 2220–2231.

169. Scholl, C. 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 / C. Scholl, H. Breitingner, R. F. Schlenk, H. Döhner, S. Fröhling, K. Döhner, AML Study Group Ulm // *Genes. Chromosomes Cancer*. – 2003. – vol. 38. – № 3. – pp. 274–80.

170. Schuurhuis, G. J. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party / G. J. Schuurhuis, M. Heuser, S. Freeman, M.-C. Béné, F. Buccisano, J. Cloos, D. Grimwade, T. Haferlach, R. K. Hills, C. S. Hourigan, J. L. Jorgensen, W. Kern, F. Lacombe, L. Maurillo, C. Preudhomme, B. A. van der Reijden, C. Thiede, A. Venditti, P. Vyas, B. L. Wood, R. B. Walter, K. Döhner, G. J. Roboz, G. J. Ossenkoppele // *Blood*. – 2018. – vol. 131. – № 12. – pp. 1275–1291.

171. Seggewiss, R. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: An update / R. Seggewiss, H. Einsele // *Blood*. – 2010. – vol. 115. – № 19. – pp. 3861–3868.

172. Seto, A. Impact of hospital length of stay on the risk of readmission and overall survival after allogeneic stem cell transplantation / A. Seto, Y. Atsuta, N. Kawashima, Y. Ozawa, K. Miyamura, H. Kiyoi // *Int. J. Hematol.* – 2018. – vol. 108. – № 3. – pp. 290–297.

173. Shameli, A. Exploring blast composition in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: CD45RA and CD371 improve diagnostic value of flow cytometry through assessment of myeloblast heterogeneity and stem cell aberrancy / A. Shameli, P. Dharmani-Khan, J. Luider, I. Auer, M. T. Shabani-Rad // *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* – 2021. – vol. 100. – № 5. – pp. 574–589.

174. Shen, X. Impact of pre-transplantation minimal residual disease (MRD) on the outcome of Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia / X. Shen, J. Pan, C. Qi, Y. Feng, H. Wu, S. Qian, H. Lu, L. Chen, J. Li, K. Miao, H. Qiu, H. Zhu // *Hematology.* – 2021. – vol. 26. – № 1. – pp. 295–300.

175. Shen, Z. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: systematic review and meta-analysis / Z. Shen, X. Gu, W. Mao, L. Yin, L. Yang, Z. Zhang, K. Liu, L. Wang, Y. Huang // *BMC Cancer.* – 2018. – vol. 18. – № 1. – p. 755.

176. Soderling, C. C. A correlation between conditioning and engraftment in recipients of MHC-mismatched T cell-depleted murine bone marrow transplants / C. C. Soderling, C. W. Song, B. R. Blazar, D. A. Valleria // *J. Immunol.* – 1985. – vol. 135. – № 2. – pp. 941–946.

177. Srour, S. A. Haploidentical transplantation for acute myeloid leukemia patients with minimal/measurable residual disease at transplantation / S. A. Srour, R. M. Saliba, M. C. B. Bittencourt, J. M. R. Perez, P. Kongtim, A. Alousi, G. Al-Atrash, A. Olson, O. Betul, R. Mehta, U. Popat, C. Hosing, Q. Bashir, I. Khouri, P. Kebriaei, L. Masarova, N. Short, E. Jabbour, N. Daver, M. Konopleva, F. Ravandi, H. Kantarjian, R. E. Champlin, S. O. Ciurea // *Am. J. Hematol.* – 2019. – vol. 94. – № 12. – pp. 1382–1387.

178. Stetler-Stevenson, M. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition / M. Stetler-Stevenson, B. Paiva, L. Stoolman, P. Lin, J. L. Jorgensen, A. Orfao, J. Van Dongen, A. C. Rawstron // *Cytom. Part B Clin. Cytom.* – 2016. – vol. 90. – № 1. – pp. 26–30.

179. Storek, J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft / J. Storek // *Expert Opin. Biol.*

Ther. – 2008. – vol. 8 – № 5. – pp. 583–597.

180. Storek, J. Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation / J. Storek, G. Espino, M. A. Dawson, B. Storer, M. E. Flowers, D. G. Maloney // *Blood*. – 2000. – vol. 96. – № 9. – pp. 3290-3293.

181. Storek, J. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation / J. Storek, M. A. Dawson, B. Storer, T. Stevens-Ayers, D. G. Maloney, K. A. Marr, R. P. Witherspoon, W. Bensinger, M. E. Flowers, P. Martin, R. Storb, F. R. Appelbaum, M. Boeckh // *Blood*. – 2001. – vol. 97. – № 11. – pp. 3380–3389.

182. Szczepański, T. 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 / T. Szczepański, V. H. J. van der Velden, T. Raff, D. C. H. Jacobs, E. R. van Wering, M. Brüggemann, M. Kneba, J. J. M. van Dongen // *Leukemia*. – 2003. – vol. 17. – № 11. – pp. 2149–2156.

183. Szilvassy, S. J. Differential homing and engraftment properties of hematopoietic progenitor cells from murine bone marrow, mobilized peripheral blood, and fetal liver / S. J. Szilvassy, T. E. Meyerrose, P. L. Ragland, B. Grimes // *Blood*. – 2001. – vol. 98. – № 7. – pp. 2108–2115.

184. Tembhare, P. R. Eleven-marker 10-color flow cytometric assessment of measurable residual disease for T-cell acute lymphoblastic leukemia using an approach of exclusion / P. R. Tembhare, G. Chatterjee, T. Khanka, S. Ghogale, Y. Badrinath, N. Deshpande, D. Panda, N. V. Patkar, G. Narula, K. Girase, S. Verma, M. Sanyal, H. N. Sriram, S. Banavali, S. Gujral, P. G. Subramanian // *Cytom. Part B Clin. Cytom.* – 2021. – vol. 100. – № 4. – pp. 421–433.

185. Terstappen, B. Detection of residual leukemic cells in AML / B. Terstappen, S. Wörmann, A. Könnemann, M. Humpe, K. Safford, K. Zurlutter, K. Schreiber, T. Piechotka, W. Büchner, L. W. Hiddemann // 1991. – pp. 196–203.

186. Terwijn, M. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual

disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study / M. Terwijn, W. L. J. van Putten, A. Kelder, V. H. J. van der Velden, R. A. Brooimans, T. Pabst, J. Maertens, N. Boeckx, G. E. de Greef, P. J. M. Valk, F. W. M. B. Preijers, P. C. Huijgens, A. M. Dräger, U. Schanz, M. Jongen-Lavrecic, B. J. Biemond, J. R. Passweg, M. van Gelder, P. Wijermans, C. Graux, M. Bargetzi, M.-C. Legdeur, J. Kuball, O. de Weerd, Y. Chalandon, U. Hess, L. F. Verdonck, J. W. Gratama, Y. J. M. Oussoren, W. J. Scholten, J. Slomp, A. N. Snel, M.-C. Vekemans, B. Löwenberg, G. J. Ossenkoppele, G. J. Schuurhuis // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – vol. 31. – № 31. – pp. 3889–3897.

187. Theunissen, P. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia / P. Theunissen, E. Mejstrikova, L. Sedek, A. J. Van Der Sluijs-Gelling, G. Gaipa, M. Bartels, E. Sobral da Costa, M. Kotrová, M. Novakova, E. Sonneveld, C. Buracchi, P. Bonaccorso, E. Oliveira, J. G. Te Marvelde, T. Szczepanski, L. Lhermitte, O. Hrusak, Q. Lecrevisse, G. E. Grigore, E. Froňková, J. Trka, M. Brüggemann, A. Orfao, J. J. M. Van Dongen, V. H. J. Van Der Velden // *Blood.* – 2017. – vol. 129. – № 3. – pp. 347–357.

188. Theunissen, P. M. J. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients: implications for minimal residual disease detection / P. M. J. Theunissen, L. Sedek, V. De Haas, T. Szczepanski, A. Van Der Sluijs, E. Mejstrikova, M. Nováková, T. Kalina, Q. Lecrevisse, A. Orfao, A. C. Lankester, J. J. M. van Dongen, V. H. J. Van Der Velden, EuroFlow Consortium // *Br. J. Haematol.* – 2017. – vol. 178 – № 2. – pp. 257–266.

189. Thörn, I. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry / I. Thörn, E. Forestier, J. Botling, B. Thuresson, C. Wasslavik, E. Björklund, A. Li, E. Lindström-Eriksson, M. Malec, E. Grönlund, K. Torikka, J. Heldrup, J. Abrahamsson, M. Behrendtz, S. Söderhäll, S. Jacobsson, T. Olofsson, A. Porwit, G. Lönnerholm, R. Rosenquist, C. Sundström // *Br. J. Haematol.* – 2011. – vol. 152. – № 6. – pp. 743–753.

190. Tien, H. F. CD7 positive hematopoietic progenitors and acute myeloid

leukemia and other minimally differentiated leukemia / H. F. Tien, C. H. Wang // *Leuk. Lymphoma*. – 1998. – vol. 31 – № (1–2). – pp. 93–98c.

191. Torelli, G.F. The immune reconstitution after an allogeneic stem cell transplant correlates with the risk of graft-versus-host disease and cytomegalovirus infection / G. F. Torelli, B. Lucarelli, A. P. Iori, M. S. De Propriis, A. Capobianchi, W. Barberi, V. Valle, E. Iannella, F. Natalino, C. Mercanti, S. Perrone, G. Gentile, A. Guarini, R. Foà // *Leuk. Res.* – 2011. – vol. 35. – № 8. – pp. 1124–1126.

192. Velden, V. H. J. van der. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data / V. H. J. van der Velden, G. Cazzaniga, A. Schrauder, J. Hancock, P. Bader, E. R. Panzer-Grumayer, T. Flohr, R. Sutton, H. Cave, H. O. Madsen, J. M. Cayuela, J. Trka, C. Eckert, L. Foroni, U. Zur Stadt, K. Beldjord, T. Raff, C. E. van der Schoot, J. J. M. van Dongen // *Leukemia*. – 2007. – vol. 21. – № 4. – pp. 604–611.

193. Velden, V. H. J. van der. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol / V. H. J. van der Velden, A. van der Sluijs-Geling, B. E. S. Gibson, J. G. te Marvelde, P. G. Hoogeveen, W. C. J. Hop, K. Wheatley, M. B. Bierings, G. J. Schuurhuis, S. S. N. de Graaf, E. R. van Wering, J. J. M. van Dongen // *Leukemia*. – 2010. – vol. 24. – № 9. – pp. 1599–1606.

194. Venditti, A. GIMEMA AML1310 trial of risk-adapted, MRD-directed therapy for young adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia / A. Venditti, A. Piciocchi, A. Candoni, L. Melillo, V. Calafiore, R. Cairoli, P. De Fabritiis, G. Storti, P. Salutari, F. Lanza, G. Martinelli, M. Luppi, P. Mazza, M. P. Martelli, A. Cuneo, F. Albano, F. Fabbiano, A. Tafuri, A. Chierichini, A. Tieghi, N. S. Fracchiolla, D. Capelli, R. Foà, C. Alati, E. La Sala, P. Fazi, M. Vignetti, L. Maurillo, F. Buccisano, M. I. Del Principe, M. Irno-Consalvo, T. Ottone, S. Lavorgna, M. T. Voso, F. Lo-Coco, W. Arcese, S. Amadori // *Blood*. – 2019. – vol. 134. – № 12. – pp. 935–945.

195. Vitale, C. Phenotypic and functional analysis of the HLA-class I-specific inhibitory receptors of natural killer cells isolated from peripheral blood of patients undergoing bone marrow transplantation from matched unrelated donors / C. Vitale, A.

Pitto, F. Benvenuto, M. Ponte, R. Bellomo, F. Frassoni, M. C. Mingari, A. Bacigalupo, L. Moretta // *Hematol. J.* – 2000. – vol. 1. – № 2. – pp. 136–144.

196. Voskova, D. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings / D. Voskova, C. Schoch, S. Schnittger, W. Hiddemann, T. Haferlach, W. Kern // *Cytometry.* – 2004. – vol. 62B. – № 1. – pp. 25–38.

197. Waele, M. De. Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts / M. De Waele, W. Renmans, K. Jochmans, R. Schots, P. Lacor, F. Trullemans, J. Otten, N. Balduck, K. Vander Gucht, B. Van Camp, I. Van Riet // *Eur. J. Haematol.* – 1999. – vol. 63. – № 3. – pp. 192–201.

198. Wei, C. OMIP-003: Phenotypic analysis of human memory B cells // *Cytom. Part A.* – 2011. – vol. 79 A. – № 11. – pp. 894–896.

199. Welniak, L. A. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / L. A. Welniak, B. R. Blazar, W. J. Murphy // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – vol. 25. – № 1. – pp. 139–170.

200. Wering, E. R. Van. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: Implications for monitoring of minimal residual disease / E. R. Van Wering, B. E. M. Van Der Linden-Schrever, T. Szczepanski, M. J. Willems, E. A. Baars, H. M. Van Wijngaarde-Schmitz, W. A. Kamps, J. J. M. Van Dongen // *Br. J. Haematol.* – 2000. – vol. 110. – № 1. – pp. 139–146.

201. Williams, K. M. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2008. – vol. 21. – № 3. – pp. 579–596.

202. Wingard, J. R. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology / J. R. Wingard, J. Hsu, J. W. Hiemenz // *Infect. Dis. Clin. North Am.* – 2010. – vol. 24. – № 2. – pp. 257–272.

203. Wohlfahrt, A. B. The importance of immunophenotyping by flow

cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts / A. B. Wohlfahrt, L. Hannel, L. Z. Oliveira, P. B. Soares, J. E. P. Silva, A. B. Wohlfahrt, L. Hannel, L. Z. Oliveira, P. B. Soares, J. E. P. Silva // *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* – 2015. – vol. 51 – № 1. – pp. 7–12.

204. Wood, B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis / B. Wood // *Methods Cell Biol.* – 2004. – vol. 75 – pp. 559–576.

205. Wood, B. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia / B. Wood // *Methods Mol Biol.* – 2013. – vol. 999. – pp. 123–136.

206. Wood, B. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry / B. Wood // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2016. – vol. 90. – № 1. – pp. 47–53.

207. Wood, B. Acute myeloid leukemia minimal residual disease detection: the difference from normal approach / B. Wood // *Curr. Protoc. Cytom.* – 2020. – vol. 93 – № 1. – p. e73.

208. Wood, B. High-throughput screening by flow cytometry identifies reduced expression of CD48 as a universal characteristic of T-ALL and a suitable target for minimal residual disease (MRD) detection / B. L. Wood, G. Levin, M. Wilson, S. S. Winter, K. Dunsmore, M. L. Loh, M. J. Borowitz // *Blood.* – 2011. – vol. 118. – № 21. – p. 2547.

209. Wu, D. Efficacy and safety of different doses of cytarabine in consolidation therapy for adult acute myeloid leukemia patients: a network meta-analysis / D. Wu, C. Duan, L. Chen, S. Chen // *Sci Rep.* – 2017. – vol. 25.– № 7 (1). – p. 9509.

210. Zhou, Y. The effect of peritransplant minimal residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / Y. Zhou, R. Slack, J. L. Jorgensen, S. A. Wang, G. Rondon, M. De Lima, E. Shpall, U. Popat, S. Ciurea, A. Alousi, M. Qazilbash, C. Hosing, S. O'Brien, D. Thomas, H. Kantarjian, L. J. Medeiros, R. E. Champlin, P. Kebriaei // *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* – 2014. – vol. 14. – № 4. – pp. 319–326.

211. Zitvogel, L. Immunological aspects of cancer chemotherapy / L. Zitvogel,

L. Apetoh, F. Ghiringhelli, G. Kroemer // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – vol. 8 – № 1. – pp. 59–73.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных острыми лейкозами для 6-цветного проточного цитометра

Лазер, нм	Синий, 488				Красный, 633	
Фильтры, нм	530/30	585/42	670>	780/60	660/20	780/60
флюорохром	FITC	PE	PerCP / PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7 / APC-H7
<i>Пробирки для определения МОБ у больных В-ОЛЛ</i>						
Номера пробирок	Антиген (клон)					
1	CD38 (HIT2)	CD10 (HI10a)	CD45 (2D1)	CD34 (8G12)	CD19 (SJ25C1)	CD20 (L27)
2	CD58 (AICD58 или IC3)	CD10 (HI10a)	CD38 (HIT2)	CD34 (8G12)	CD19 (SJ25C1)	CD20 (L27)
<i>Пробирки для определения МОБ у больных Т-ОЛЛ</i>						
Номера пробирок	Антиген (клон)					
1	CD4 (13B8.2)	CD7 (8H8.1)	CD8 (SK1)	cytCD3 (SK7)	CD5 (L17F12)	CD3 (SK7)
2	CD99 (3B2/TA8)	CD7 (8H8.1)	CD45 (2D1)	cytCD3 (SK7)	CD5 (L17F12)	CD3 (SK7)
3	CD1a (HI149)	CD7 (8H8.1)	CD2 (RPA- 2.10)	cytCD3 (SK7)	CD5 (L17F12)	CD3 (SK7)
<i>Пробирки для определения МОБ у больных ОМЛ (набор 1)</i>						
Номера пробирок	Антиген (клон)					
1	CD7 (8H8.1) или CD56 (NCAM16.2)	CD19(SJ25C1) или CD4 (RPA-T4)	HLA-DR (L243)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)	CD45 (2D1)
2	CD65 (VIM8)	CD15 (HI98)	CD14 (MφP9)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)	CD45 (2D1)
3	CD66b (G10F5)	CD11b (D12)	CD16 (3G8)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)	CD45 (2D1)
4	CD99 (3B2/TA8)	CD13 (L138)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)	CD45 (2D1)
<i>Пробирки для определения МОБ у больных ОМЛ (набор 2)</i>						
Номера пробирок	Антиген (клон)					
1	CD38 (HIT2)	CD7 (8H8.1) или CD56 (NCAM16.2) или CD4 (RPA-T4)	HLA-DR (L243)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)	CD45 (2D1)
2	CD38 (HIT2)	CD133	CD19	CD117	CD34	CD45

		(clone 7)	(SJ25C1)	(104D2)	(8G12)	(2D1)
3	CD99 (3B2/TA8)	CD33 (WM53)	CD13 (WM15)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)	CD45 (2D1)
4	CD65 (88H7)	CD33 (WM53)	CD13 (WM15)	CD56 (NCAM16.2)	CD123 (7G3)	CD45 (2D1)

Продолжение Таблицы А1 – Панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных острыми лейкозами для 6-цветного проточного цитометра

Номера пробирок	Антиген (клон)					
5	CD66b (G10F5)	CD33 (WM53)	CD14 (MφP9)	HLA-DR (L243)	CD36 (CB38)	CD11b (ICRF44)
6	CD15 (MMA)	CD33 (WM53)	HLA-DR (L243)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)	CD11b (ICRF44)

Примечание: FITC – флуоресцеина изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate), PE – фикоэритрин (phycoerythrin), PerCP – перидинин-хлорофилл протеин, PerCP-Cy5.5 – перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5 (peridinin chlorophyll protein complex - cyanine 5.5), PE-Cy7 – фикоэритрин-цианин 7 (phycoerythrin-cyanine 7), APC – алофикоцианин (allophycocyanine), APC-Cy7 – алофикоцианин-цианин 7 (allophycocyanine-cyanine 7).

Таблица А2 – Панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных острыми лейкозами для 13-цветного проточного цитометра

Лазер, нм	Синий, 488					Красный, 633			Фиолетовый, 405 нм				
Фильтры, нм	525/40	585/42	610/20	690/50	780/60	660/10	712/60	780/60	450/45	525/40	610/20	660/10	780/60
<i>Пробирка для определения МОБ у больных В-ОЛЛ (набор 1)</i>													
флюорохром	FITC	PE	ECD	PC5.5	PE-Cy7	APC	APC-R700	APC-Cy7	-	KrO	-	-	-
Антиген (клон)	CD58 (AICD58)	CD24 (ALB9)	CD34 (581)	CD10 (ALB1)	CD19 (J3-119)	CD22 (S-HCL-1)	CD38 (LS198-4-3)	CD20 (B9E9)	Syto41	CD45 (J33)	-	-	-
<i>Пробирка для определения МОБ у больных В-ОЛЛ (набор 2)</i>													
флюорохром	FITC	PE	PE-Dazzle 594	-	PE-Cy7	APC	APC-R700	APC-Fire750	BV421	-	-	BV650	-
Антиген (клон)	CD58 (AICD58)	CD10 (Hi10a)	CD34 (581)	7-AAD	CD19 (SJ25C1)	CD22 (S-HCL-1)	CD38 (HIT2)	CD45 (Hi30)	CD24 (ML5)	-	-	CD20 (2H7)	-
<i>Пробирка для определения МОБ у больных Т-ОЛЛ (набор 1)</i>													
флюорохром	FITC	PE	PE-Dazzle594	PE-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-R700	APC-Fire750	BV421	BV510	-	BV650	-
Антиген (клон)	CD45 (J33)	CD99 (3B2/TA8)	CD34 (581)	CD2 (RPA-2.10)	cytCD3 (SK7)	CD3 (SK7)	CD56 (NCAM16.2)	CD4 (SK3)	CD7 (M-701)	CD5 (L17F12)	-	CD8 (SK1)	-
<i>Пробирка для определения МОБ у больных Т-ОЛЛ (набор 2)</i>													
флюорохром	FITC	PE	PE-Dazzle594	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-A700	APC-Fire750	-	BV510	-	-	-
Антиген (клон)	CD99 (3B2/TA8)	CD7 (8H8.1)	CD34 (581)	CD8 (RPA-T8)	CD3 (SK7)	CD5 (L17F12)	CD3 (OKT3)	CD4 (SK3)	-	CD45 (2D1)	-	-	-

Продолжение Таблицы А2 – Панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных острыми лейкозами для 13-цветного проточного цитометра

Лазер, нм	Синий, 488					Красный, 633			Фиолетовый, 405 нм				
Фильтры, нм	525/40	585/42	610/20	690/50	780/60	660/10	712/60	780/60	450/45	525/40	610/20	660/10	780/60
<i>Пробирки для определения МОБ у больных ОМЛ</i>													
флюорохром	FITC	PE	PE-Dazzle594	PC5.5	PE-Cy7	APC	APC-A700	APC-Cy7	BV421	BV510	BV605	-	-
1	CD15 (80H5 или MMA)	CD2 (39C1.5)/CD7 (8H8.1)/CD11a (25.3)/CD19 (J3-119)/CD56 (NCAM16.2)	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3HL6 0.251)	CD13 (WM15)	CD14 (RMO52)	CD11b (ICRF44)	HLA-DR (L243)	CD45 (2D1)	CD16 (3G8)	-	-
2	CD38 (HIT2 или T16)	CD371 (50C1)	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3HL6 0.251)	CD99 (3B2/TA8)	CD123 (SSDCLY107D2)	CD45RA (2H4LDH11 LDB9)	HLA-DR (L243)	CD45 (2D1)	CD10 (Hi10a)	-	-

Примечание: 7-AAD – 7-аминоактиномицин D, FITC – флуоресцеин изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate), PE – фикоэритрин (phycoerythrin), ECD – краситель с энергетической связью (energy coupled dye), PE-Dazzle594 – фикоэритрин Даззл 594 (phycoerythrin Dazzle594), PE-Cy5.5 – фикоэритрин цианин 5.5 (phycoerythrin-cyanine 5.5), PerCP-Cy5.5 – перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5 (peridinin chlorophyll protein complex-cyanine 5.5), PE-Cy7 – фикоэритрин-цианин 7 (phycoerythrin-cyanine 7), APC – алофикоцианин (allophycocyanine), APC-A700 – алофикоцианин Алекса Флюор 700 (allophycocyanine Alexa Fluor 700), APC-Fire750 – алофикоцианин Fire750 (allophycocyanine Fire750), APC-Cy7 – алофикоцианин-цианин 7 (allophycocyanine-cyanine 7), KrO – кром-оранжевый (Krome Orange), BV – бриллиантовый фиолетовый (brilliant violet).

Таблица А3. Результаты сравнения субпопуляций лимфоцитов у пациентов с и без повторной госпитализации на различных сроках после алло-ТГСК. Данные представлены в виде: медиана (межквартильный размах).

Параметр	+3 - +6 месяц			+6 - +9 месяц			+9 - +12 месяц		
	Регоспитализация на +3, +6 месяц (n=31)	Без регоспитализации (n=40)	P	Регоспитализация на +6, +9 месяц (n=26)	Без регоспитализации (n=38)	P	Регоспитализация на +9, +12 месяц (n=13)	Без регоспитализации (n=30)	P
Лейкоциты	2,6 (2,2-4,0)	2,8 (1,8-4,1)	0,96	3,7 (1,7-5,9)	4,8 (3,1-6,4)	0,19	5,4 (2,7-7,5)	6,1 (4,3-7,0)	0,48
% Т-клеток	75,2 (61,2-81,3)	53,9 (31-76)	0,02	74,4 (60,1-85,6)	67,3 (54,9-77,6)	0,09	76,5 (60,1-87,8)	69,5 (57,6-76)	0,17
% Т-хэлперов	21,5 (14,6-35,2)	16,6 (12,7-24,2)	0,09	16,8 (10,5-24,3)	15,5 (9,7-23,3)	0,51	13,5 (8,7-20,7)	17,1 (13,1-24,6)	0,17
% ЦТЛ	40,9 (25,7-56,7)	23,5 (13,2-52,9)	0,09	52,9 (29,3-62,1)	43,5 (26,3-61,1)	0,36	53,8 (45,7-66,3)	46,9 (32,5-56)	0,08
% НК	15,9 (7,7-22,8)	23,9 (11,5-48,2)	0,03	14,3 (11,3-30,2)	14,5 (7,5-28,7)	0,66	9,8 (6,5-27,9)	12,2 (7,8-22,2)	0,79
% В-клеток	3,2 (0,7-7,1)	2,9 (0,9-8,7)	0,71	2,1 (0,3-8,6)	7,7 (4,3-14,4)	0,007	3 (0,45-11,3)	9,3 (6-18,8)	0,037
Абс. кол-во Т-клеток	0,35 (0,22-0,72)	0,28 (0,14-0,79)	0,37	0,39 (0,26-0,9)	0,81 (0,34-1,88)	0,08	1,22 (0,25-1,86)	1,33 (1,0-2,06)	0,27
Абс. кол-во Т-хэлперов	0,14 (0,08-0,21)	0,11 (0,04-0,25)	0,55	0,12 (0,08-0,19)	0,2 (0,11-0,32)	0,04	0,1 (0,05-0,32)	0,32 (0,26-0,46)	0,009
Абс. кол-во ЦТЛ	0,2 (0,08-0,46)	0,14 (0,04-0,51)	0,39	0,22 (0,12-0,65)	0,41 (0,15-1,32)	0,27	0,91 (0,16-1,45)	0,99 (0,58-1,45)	0,52
Абс. кол-во НК	0,09 (0,05-0,17)	0,16 (0,08-0,24)	0,03	0,11 (0,04-0,23)	0,22 (0,08-0,37)	0,13	0,14 (0,05-0,2)	0,3 (0,16-0,43)	0,02
Абс. кол-во В-клеток	0,01 (0,01-0,06)	0,02 (0,01-0,08)	0,61	0,02 (0-0,09)	0,1 (0,03-0,22)	0,0006	0,05 (0-0,21)	0,23 (0,09-0,37)	0,019

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

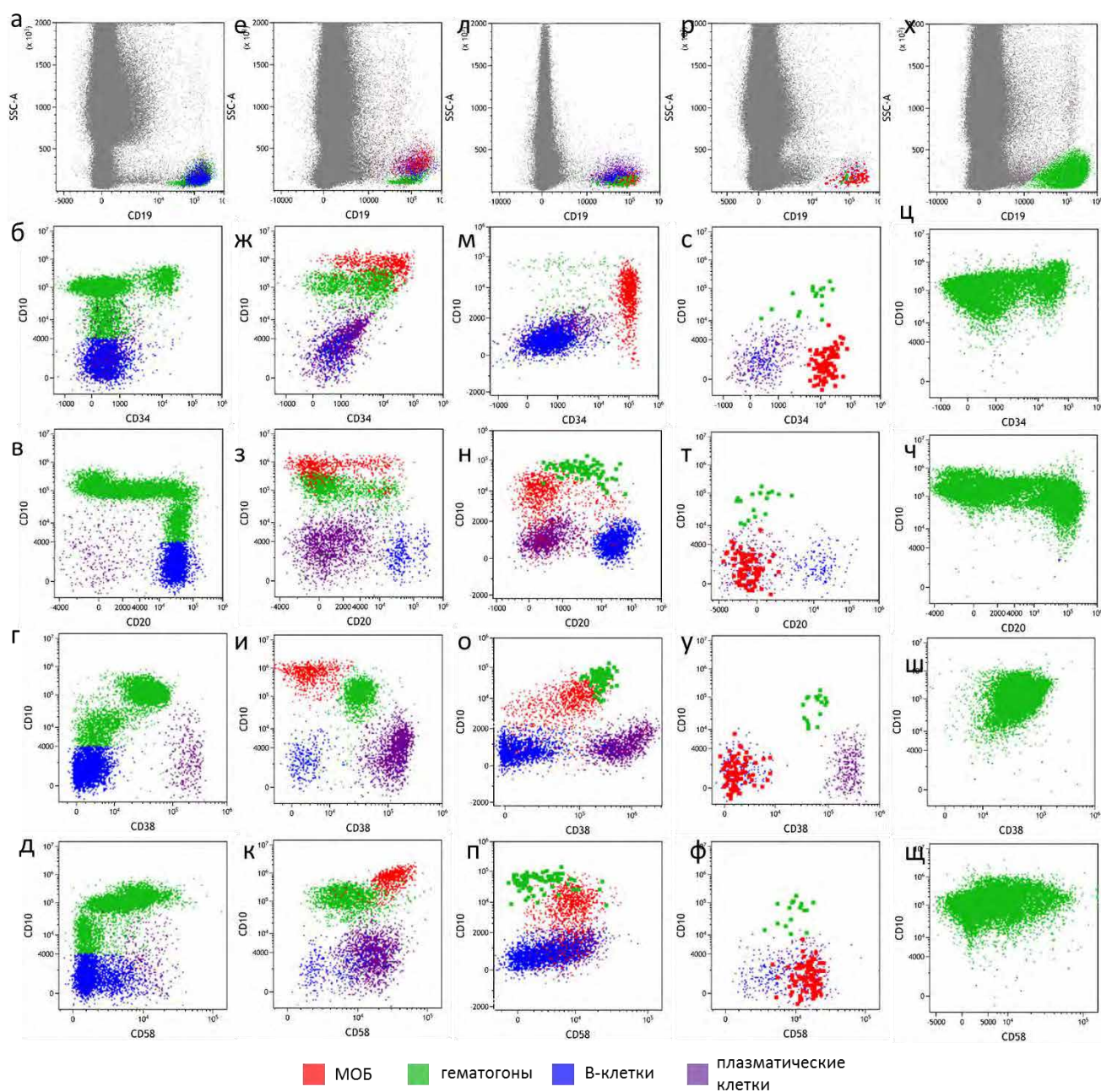


Рисунок Б1 – Примеры цитометрических диаграмм, полученных с помощью панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных В-ОЛЛ: *a–д* – образец КМ донора аллогенных стволовых гемопоэтических клеток; *e–к* – первый пример МОБ; *л–п* – второй пример МОБ; *р–ф* – третий пример МОБ; *х–щ* – пример интенсивной регенерации КМ после химиотерапии

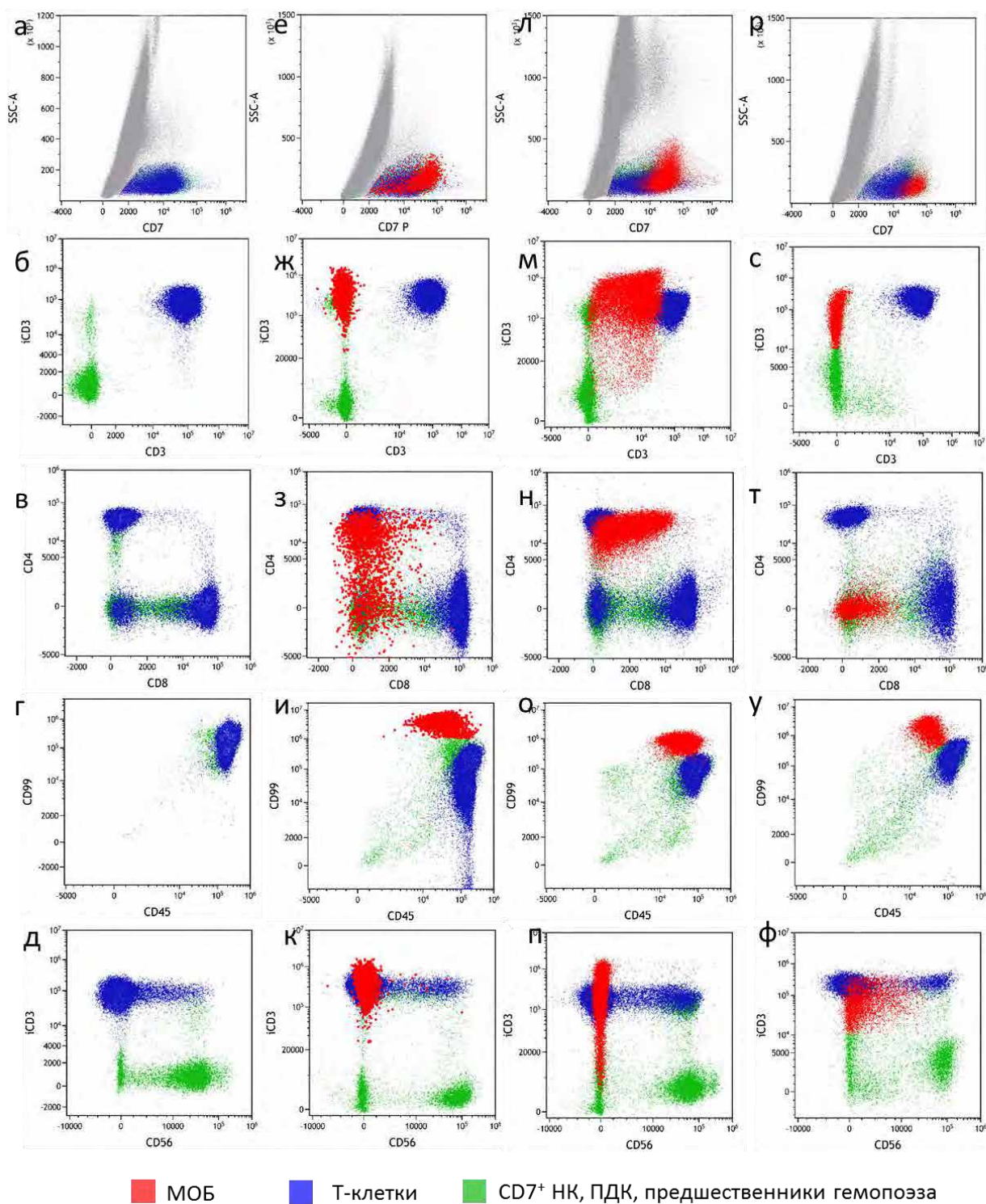


Рисунок Б2 – Примеры цитометрических диаграмм, полученных с помощью панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных Т-ОЛЛ: *a–d* – образец КМ донора аллогенных стволовых гемопоэтических клеток; *e–k* – первый пример МОБ; *l–n* – второй пример МОБ; *p–f* – третий пример МОБ

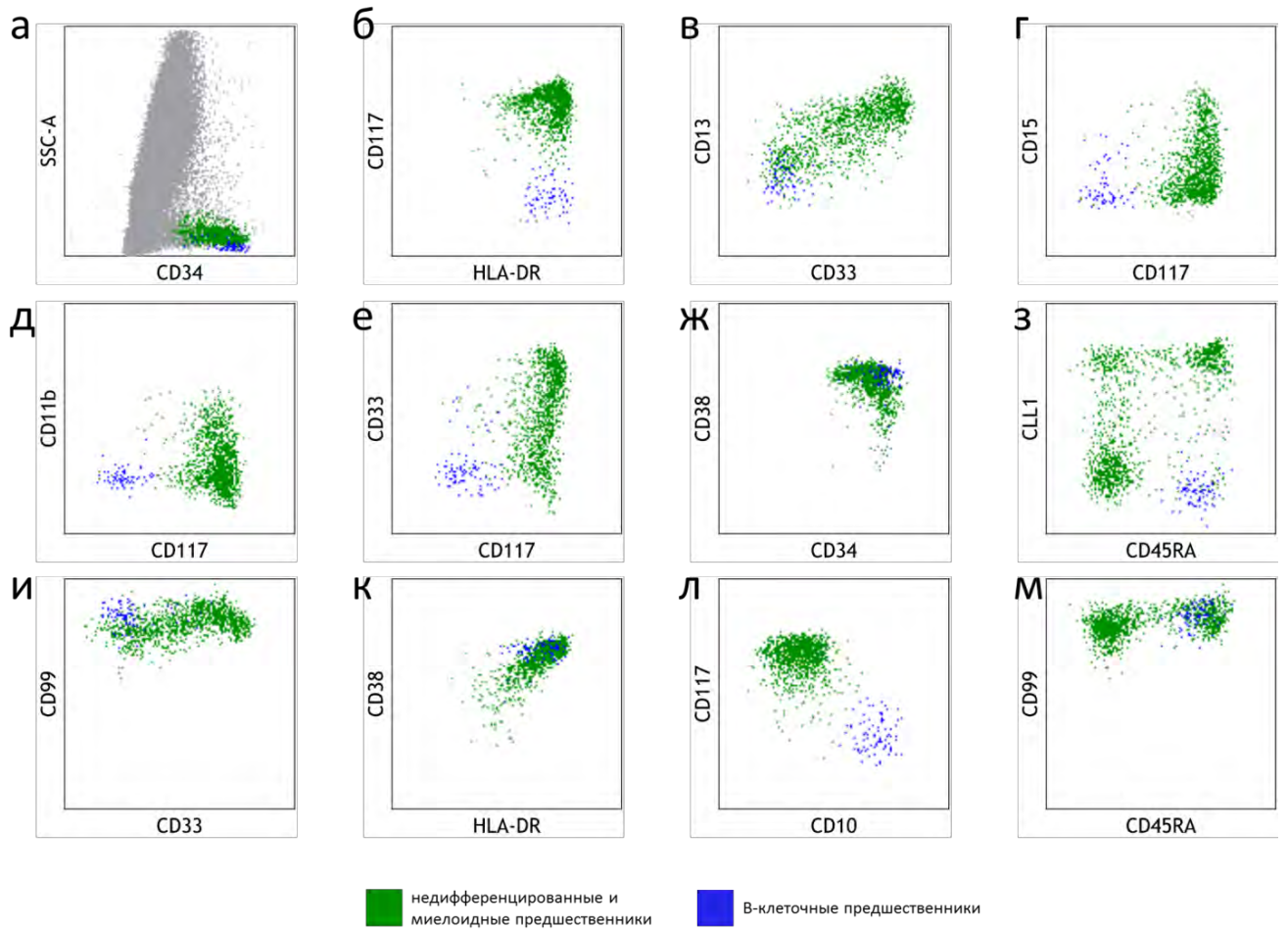


Рисунок Б3 – Точечные диаграммы, полученные при анализе костного мозга донора гемопоэтических стволовых клеток: *a* – выделение $CD34^+$ клеток на графике $CD34$ и SSC ; *б–м* – диаграммы различных антигенов, показывающих нормальное расположение $CD34^+$ клеток

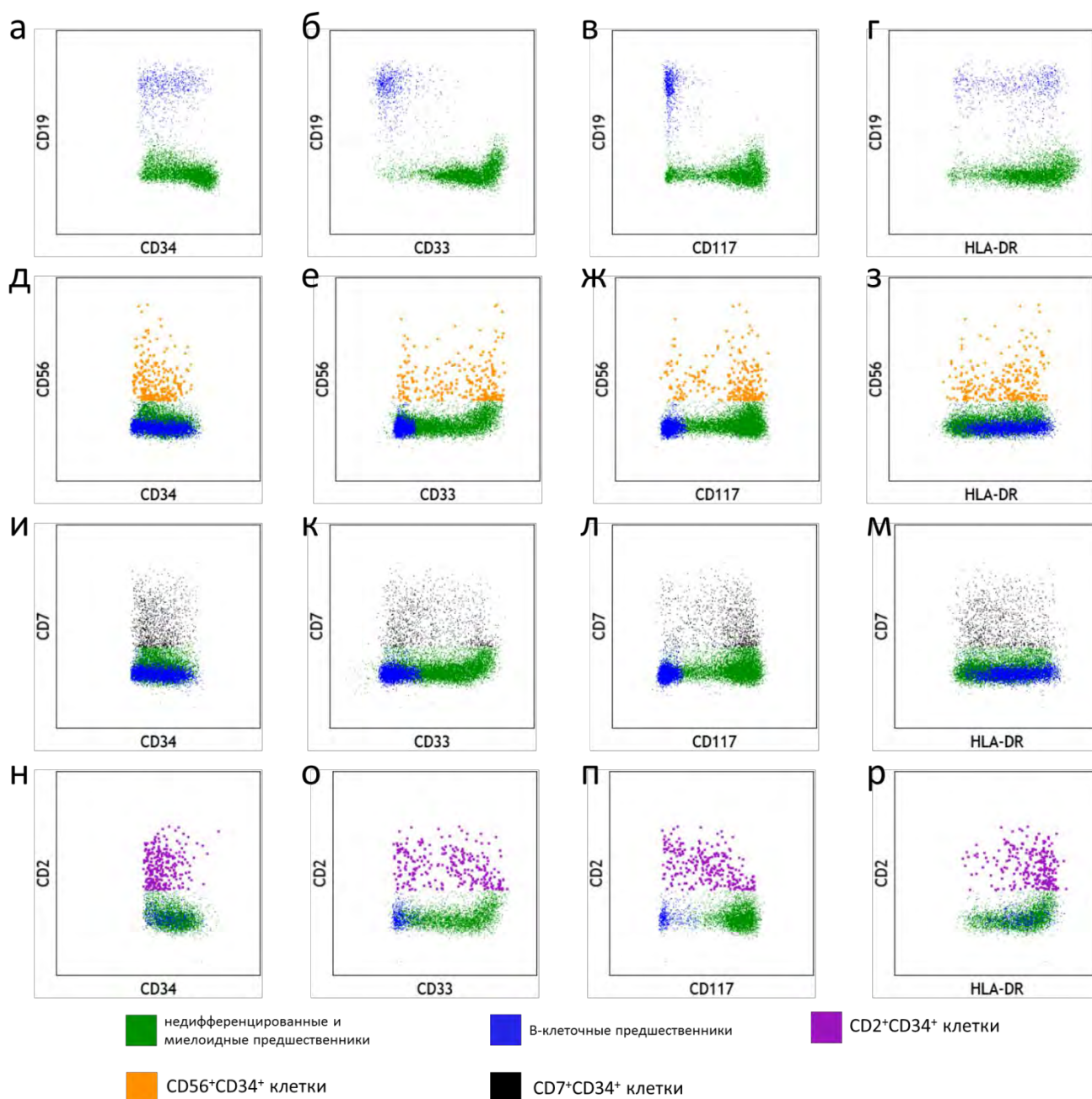


Рисунок Б4 – Точечные диаграммы, полученные при анализе костного мозга доноров гемопоэтических стволовых клеток, отображающие CD34⁺ клетки: *а–г* – нормальная экспрессия антигена CD19; *д–з* – нормальная экспрессия антигена CD56; *и–м* – нормальная экспрессия антигена CD7; *н–р* – нормальная экспрессия антигена CD2

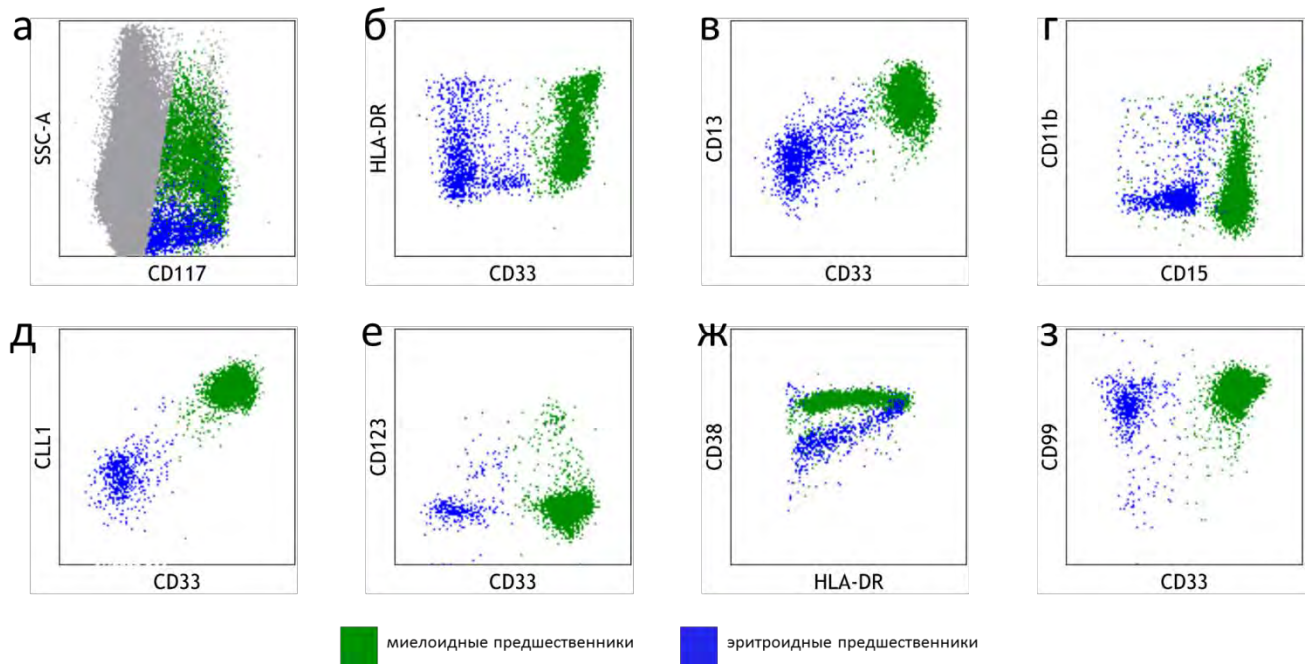


Рисунок Б5 – Точечные диаграммы, полученные при анализе костного мозга донора гемопоэтических стволовых клеток: *а* – выделение $CD117^+CD34^-$ клеток на графике CD117 и SSC; *б–м* – диаграммы различных антигенов, показывающих нормальное расположение $CD117^+$ клеток

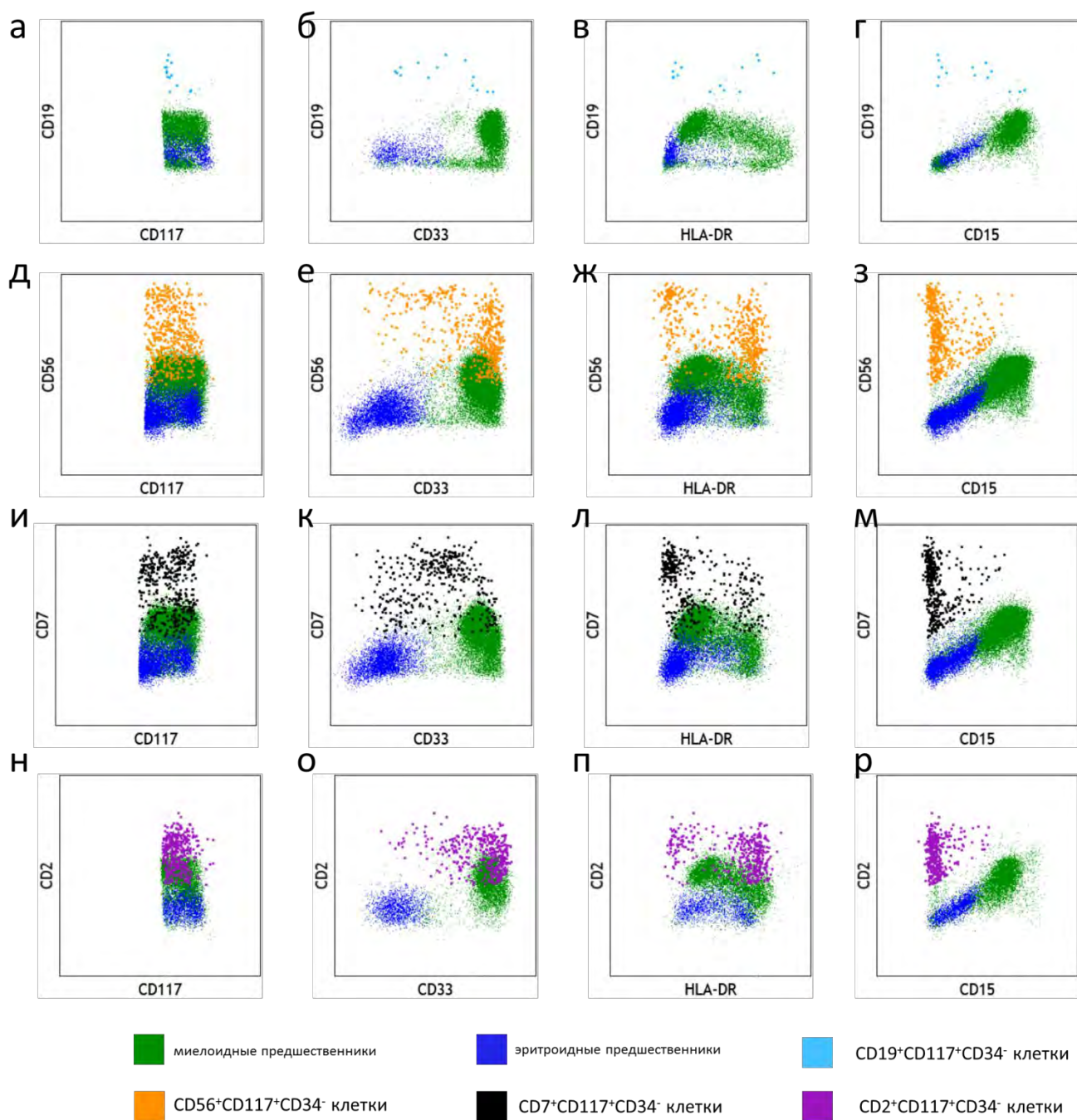


Рисунок Б5 – Точечные диаграммы, полученные при анализе костного мозга доноров гемопоэтических стволовых клеток, отображающие CD117⁺CD34⁻ клетки: а–г – нормальная экспрессия антигена CD19; д–з – нормальная экспрессия антигена CD56; и–м – нормальная экспрессия антигена CD7; н–р – нормальная экспрессия антигена CD2

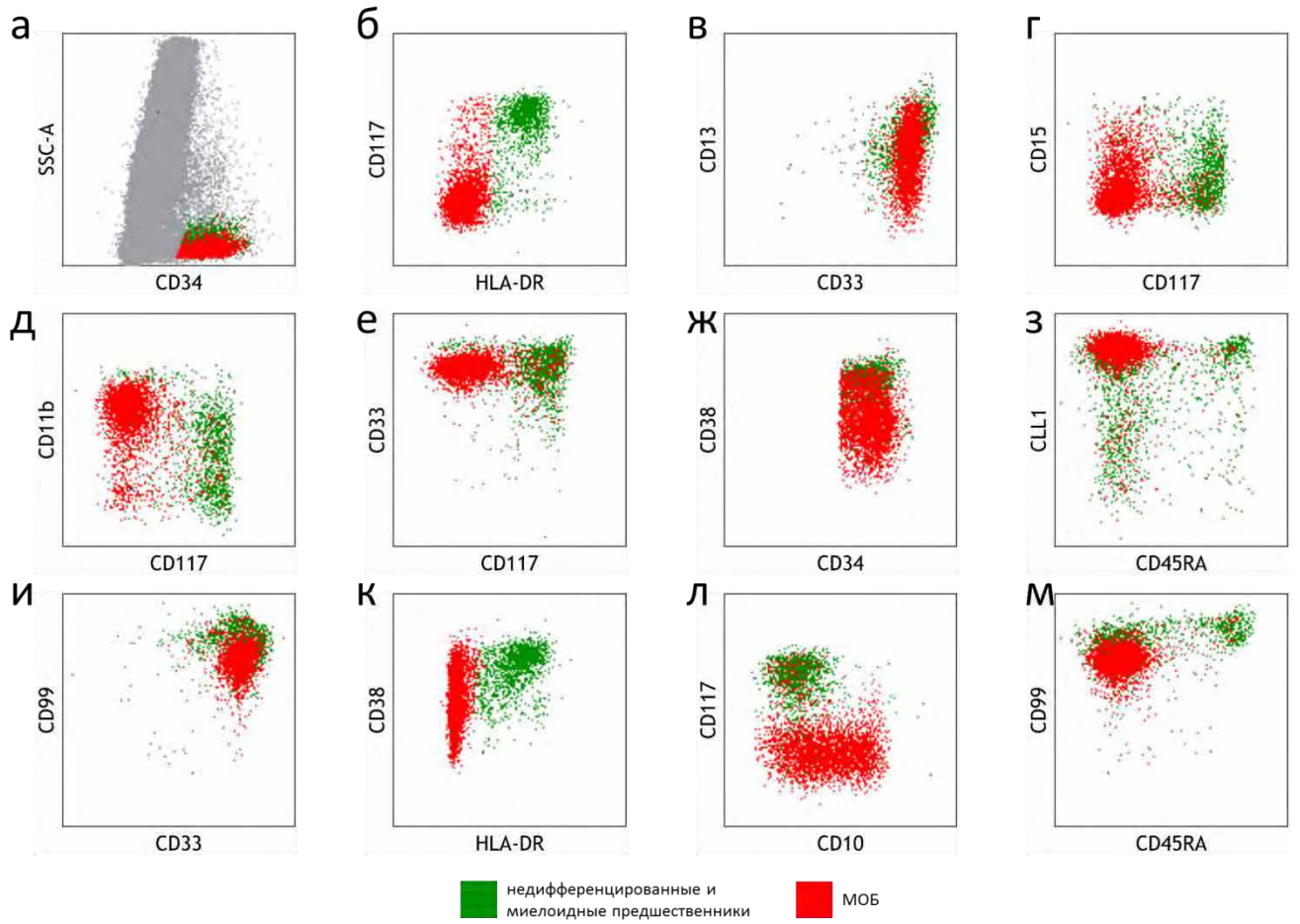


Рисунок Б6 – Пример детекции остаточной опухолевой популяции с асинхронной ко-экспрессией CD11b и CD34, сниженной экспрессией CD38, HLA-DR, CD117 и ко-экспрессией лимфоидного маркера CD10 у больного ОМЛ

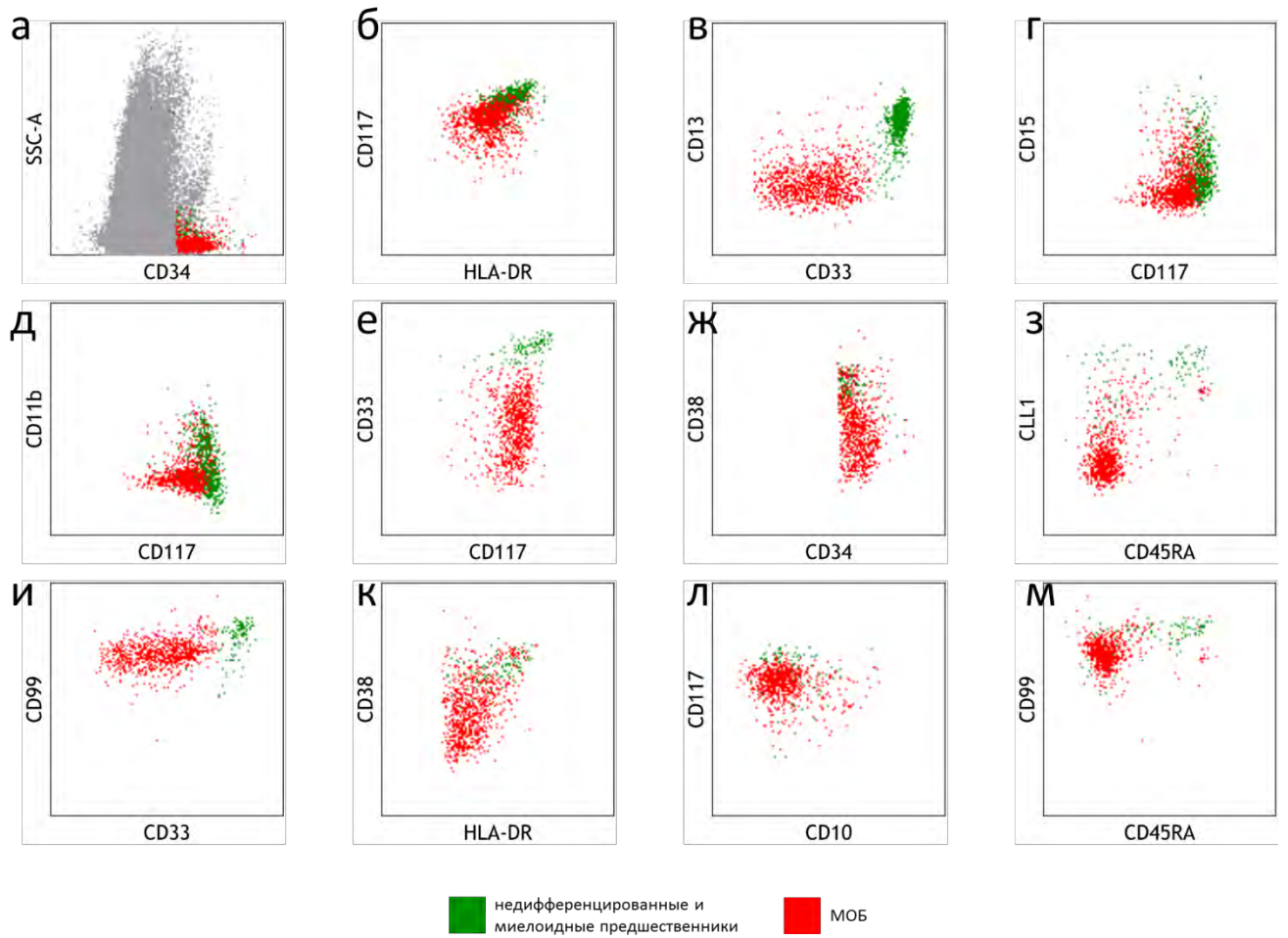


Рисунок Б7 – Пример детекции остаточной опухолевой популяции со сниженной экспрессией CD38, HLA-DR и CD13 среди CD34⁺ клеток у больного ОМЛ

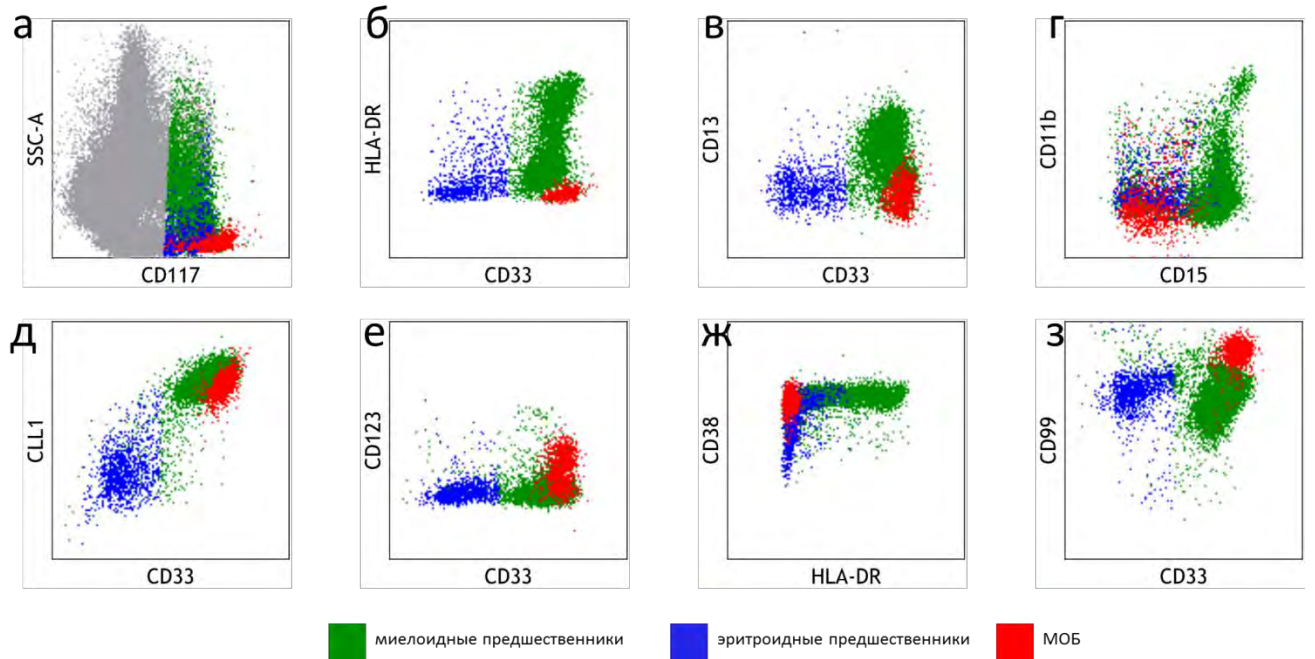
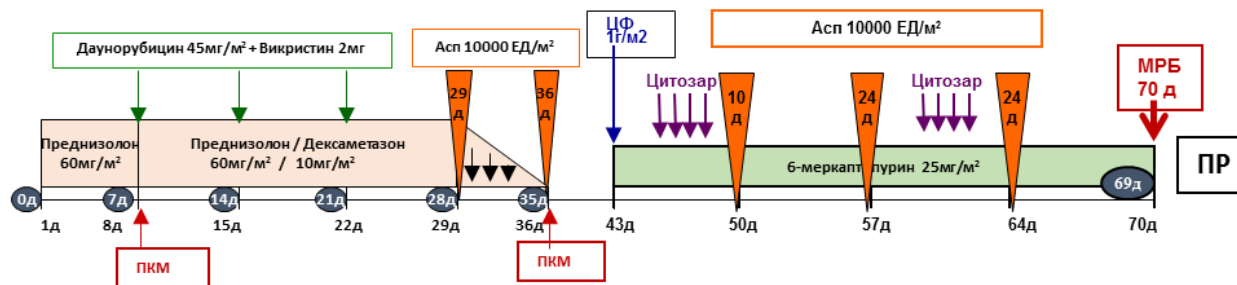
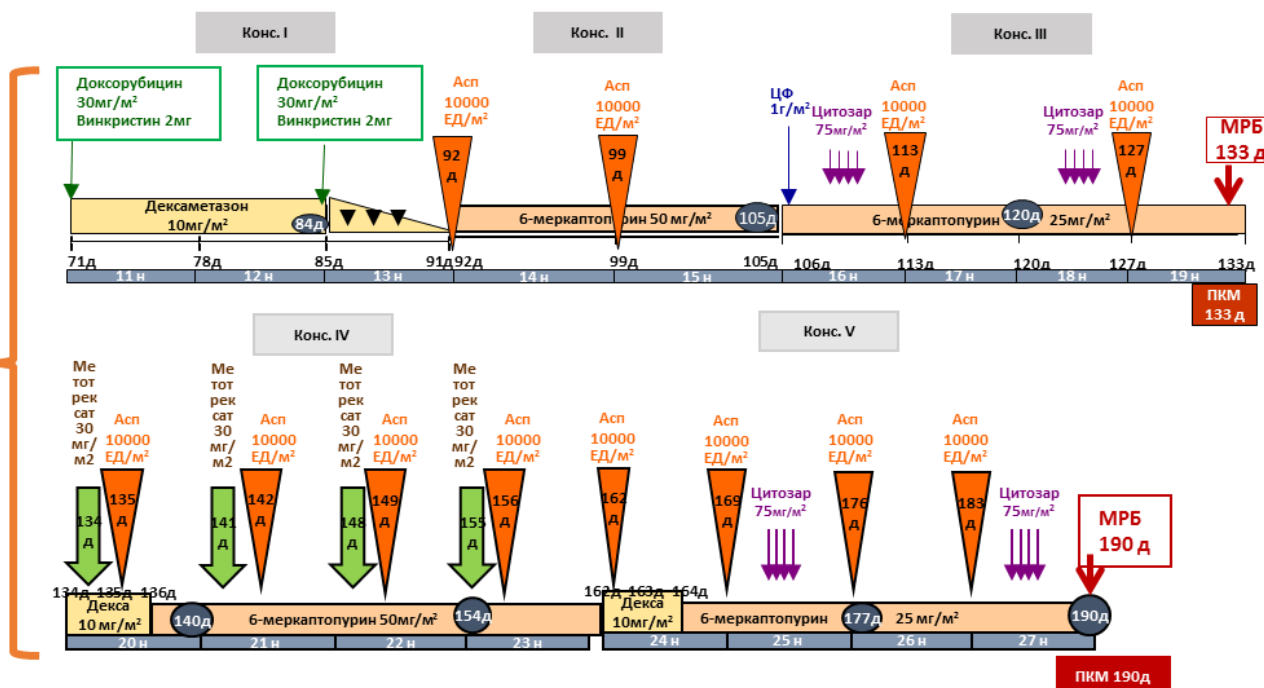


Рисунок Б8 – Пример детекции остаточной опухолевой популяции среди $CD117^+CD34^-$ клеток с отсутствием HLA-DR, высокой плотностью CD33 и CD99, а также частично-позитивных по маркеру CD123 у больной ОМЛ

Индукция



Консолидация



Поддержка

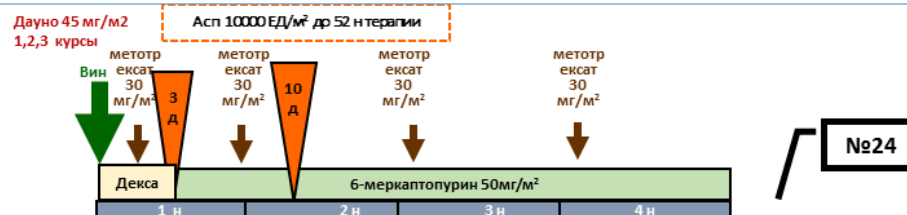


Рисунок Б9 – Схема терапии по протоколу «ОЛЛ-2016»