

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

**ПАЛЛАДИНА
АЛЕКСАНДРА ДМИТРИЕВНА**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ
ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Тупицын Николай Николаевич
доктор медицинских наук, профессор РАН
Попа Александр Валентинович

Москва – 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 3 |
| ГЛАВА 1 | |
| ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 10 |
| 1.1 Биология ОМЛ..... | 10 |
| 1.2 Классификация ОМЛ..... | 11 |
| 1.3 Диагностика ОМЛ..... | 23 |
| 1.4 Иммунофенотипирование в оценке глубины ремиссии ОМЛ, минимальная остаточная болезнь | 26 |
| ГЛАВА 2 | |
| ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 39 |
| ГЛАВА 3 | |
| МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ ПРИ ОМЛ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА | 44 |
| 3.1 Диагностика МОБ при коэкспрессии CD7, CD56, CD64..... | 46 |
| 3.2 Диагностика МОБ при коэкспрессии В-линейных антигенов | 64 |
| 3.3 Диагностика МОБ при мегакариобластном варианте ОМЛ | 67 |
| ГЛАВА 4 | |
| ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОБ ПРИ ОПУХОЛИ ИЗ БЛАСТНЫХ ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК | 81 |
| ГЛАВА 5 | |
| РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ПРОГНОЗЕ ОМЛ | 92 |
| ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 99 |
| ВЫВОДЫ..... | 111 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 113 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 115 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её разработанности

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) детского возраста – это одна из наиболее сложных групп заболеваний, до сих пор не имеющая надежных способов излечения. Это чрезвычайно гетерогенная группа заболеваний, включающая 8 морфоцитохимических и иммунофенотипических вариантов. Некоторые из этих вариантов встречаются редкие, другие встречаются более часто, но в целом ОМЛ у детей встречается значительно реже, чем острые лимфобластные лейкозы (примерно 15-20% от острых лейкозов), и это в сочетании с гетерогенностью болезни делает поиск диагностических и лечебных средств более сложным. Важно отметить, что в лечении ОМЛ у детей достигнуты значительные успехи, которые обусловлены, в том числе, индивидуализацией терапии в зависимости от варианта ОМЛ и групп риска. Одним из главных прогностических факторов при данном заболевании является достижение ремиссии у больного после первого курса индукционного лечения. Ранее факт достижения костномозговой ремиссии документировался на основании наличия менее 5% бластных клеток в костном мозге. В настоящее время существуют методы, позволяющие существенно повысить порог обнаружения злокачественных миелобластов в костном мозге. Это, в первую очередь, проточная цитометрия, позволяющая обнаруживать одну злокачественную клетку на 100000 и более миелокариоцитов. Более того, метод проточной цитометрии позволяет точно следить за динамикой опухолевого процесса в костном мозге, проводить мониторинг наличия остаточной лейкоэмической популяции. Это дает возможность судить о наличии минимальной остаточной болезни (МОБ) на всем протяжении заболевания, а также диагностировать возобновление процесса (молекулярный рецидив) даже при появлении малого количества злокачественных миелобластов (0,1% и менее среди миелокариоцитов). Подобные углубленные исследования абсолютно необходимы, так как доказано, что наличие минимальной остаточной болезни является мощным предиктором рецидива, а своевременная модификация лечения, в том числе его интенсификация с

использованием высокодозной химиотерапии, таргетных препаратов и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток позволяет остановить болезнь и продлить жизнь пациента или даже добиться его излечения. В связи с этим поиск методов молекулярного слежения за злокачественными клетками ОМЛ представляет одну из наиболее актуальных задач детской онкогематологии.

Цель исследования

Оценка возможностей проточно-цитометрической диагностики минимальной остаточной болезни при ОМЛ у детей.

Задачи исследования

1. Провести изучение бластных клеток при диагностике ОМЛ с использованием многопараметровой проточной цитометрии.
2. Оценить возможность использования данных первичного (при диагностике) иммунофенотипа в мониторинге достижения ремиссии и диагностике минимальной остаточной болезни.
3. Дать описание алгоритма диагностики ОМЛ с помощью моноклональных антител при различных морфоцитохимических вариантах заболевания.
4. Установить наиболее частые маркерные комбинации, позволяющие диагностировать МОБ при различных морфоцитохимических вариантах ОМЛ.
5. Установить соотношение МОБ - статуса с диагностикой групп риска при ОМЛ у детей.
6. Оценить роль иммунологических маркеров бластных клеток в достижении ремиссии у больных ОМЛ.

Научная новизна

На основании исследования первичного иммунофенотипа у 135 детей с ОМЛ установлены наиболее часто встречающиеся антигены бластных клеток и их комбинации.

Показано, что ОМЛ детского возраста является чрезвычайно гетерогенным

по морфологическим, цитохимическим и иммунофенотипическим признакам заболеванием. Показано, что диагностика МОБ может базироваться только на данных первичного многопараметрового иммунофенотипирования. В нашей работе в качестве стандарта использованы рекомендации Европейского консорциума Еврофлоу, основанные на 8-цветных панелях моноклональных антител к различным линиям гемопоэза, стадиям зрелости лейкозных клеток, aberrантной экспрессии маркеров.

Показано, что наиболее частым лимфоидным маркером на клетках ОМЛ является Т-клеточно-ассоциированный антиген CD7. Мониторинг МОБ у больных ОМЛ по данному маркеру представляет большую ценность.

Другим лимфоидно-ассоциированным маркером клеток ОМЛ явился В-клеточный антиген CD19. Установлена достоверная связь экспрессии CD19 с вариантом М2 ОМЛ и t(8;21).

Установлено, что В-линейный антиген CD19 ассоциирован с благоприятным прогнозом на основании достоверной связи с частотой достижения ремиссий.

Нами показано, что в случаях мегакариобластного варианта ОМЛ определение МОБ должно базироваться на определении линейной принадлежности бластных клеток.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные могут использоваться на практике в диагностике и мониторинге МОБ при ОМЛ у детей. Это в первую очередь относится к первичной диагностике лейкоза, которая должна быть многопараметровой, базироваться на оценке экспрессии маркеров всех клеточных линий миелопоэза и дополнительных маркеров несвойственных линий.

Доказано, что диагностика МОБ является важным клиническим критерием, взаимосвязанным с безрецидивной выживаемостью у больных ОМЛ. Это позволяет внести данный критерий в признаки, на основании которых осуществляется стратификация больных на группы риска. Использование критерия МОБ позволит своевременно корректировать терапию и улучшить

результаты лечения.

В случаях выявления МОБ-позитивного статуса необходимо тщательное иммунофенотипическое наблюдение за больным, оценка динамики клиренса популяции аберрантных клеток и разработка стратегии модификации лечения.

Методология и методы исследования

В работу включены данные 137 детей с впервые выявленным острым миелоидным лейкозом (60 девочек и 77 мальчиков) в возрасте от 3 месяцев до 17 лет (медиана 7,0 лет), и ребёнок 16 лет, у которого была диагностирована опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток. Все пациенты проходили обследование в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клиническо-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всем больным проводились диагностические морфоцитохимическое исследование – в клиническо-диагностической лаборатории и иммунофенотипическое исследование – в лаборатории иммунологии гемопоэза. Диагноз устанавливали на основании клиническо-гематологических показателей, морфологического, цитохимического и иммунофенотипического исследований костного мозга, большинству больных (74,1%) выполнялись цитогенетическое и молекулярное исследования. Для иммунологического изучения костного мозга применялся метод многопараметровой проточной цитометрии с применением моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами. Учет реакции производился на проточном цитометре BD FACSCANTO II. Анализ полученных данных выполнен с помощью программы FCS3. При диагностике острого лейкоза всем больным выполняли иммунофенотипирование бластных клеток, с 2014 года – с использованием 8-цветной концепции Еврофлоу, которая представляет собой оценку линейности бластов по ориентационной пробе с последующим их анализом в пределах миелоидной линии гемопоэза.

Лечение больных осуществлялось по протоколам AML BFM 87, AML BFM 2004, НИИ ДОГ ОМЛ 2002, НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012.

Минимальная остаточная болезнь проанализирована у 28 пациентов,

получавших лечение по поводу ОМЛ в период с 2014 г. по 2021 г. по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012, а также у пациента 16 лет, у которого была диагностирована опухоль из бластных плазмацитоидных дендритных клеток. У всех пациентов группы на момент определения минимальной остаточной болезни была достигнута костномозговая ремиссия (бластные клетки менее 5%). Большинству пациентов группы уровень МОБ оценивался перед началом 2 курса химиотерапии с эпигенетическими препаратами, у 5 пациентов МОБ оценивалась в более поздние сроки. При определении минимальной остаточной болезни панель антител составлялась индивидуально для каждого случая согласно первичному иммунофенотипу бластных клеток пациента. Анализировались 2 миллиона событий. Путем последовательного гейтирования выделялась малая популяция клеток с иммунологической абберрантностью, соответствующей таковой при первичном исследовании. Оценка МОБ-статуса в работе производилась относительно величины 0,1% от миелокариоцитов.

Для статистической обработки результатов применяли программу «IBM SPSS Statistics 21». Оценка функции выживаемости пациентов проводилась с помощью метода Каплана-Мейера. Статистическая значимость различий кривых выживаемости проводилось методами лог-ранк, бреслоу, тарон-уоре. Сравнение данных двух независимых групп проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона. Достоверность различий устанавливалась при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Оценка минимальной остаточной болезни при ОМЛ у детей, учитывая выраженную иммунологическую гетерогенность заболевания, должна основываться на особенностях иммунофенотипа бластных клеток, установленного при диагностике заболевания.

2. Наиболее частым признаком абберрантности ОМЛ у детей, позволяющим проводить определение МОБ, является экспрессия лимфоидно-ассоциированных антигенов (CD7, CD19), а также экспрессия CD56. В случаях острых мегакариобластных лейкозов и опухолях из бластных предшественников плазмацитоидных дендритных клеток, мониторинг МОБ может осуществляться

на основании линейной принадлежности бластных клеток – мегакариобластной (CD61, CD41, CD42), плазмцитоподобных дендритных клеток (CD123, CD4, CD56 при отсутствии маркеров других клеточных линий) в сочетании с маркерами аберрантности, выявленными при диагностике.

3. Диагностическая панель при оценке МОБ при миелоидных вариантах ОМЛ (M0-M2) у детей должна базироваться на экспрессии маркеров CD45 (гейтирование клеток-предшественников), CD117 (миелоидные предшественники), CD34 (стволовые гемопоэтические клетки), CD33 (пан-миелоидный антиген) в пределах ядродержащих клеток костного мозга с учетом аберрантной экспрессии антигенов, установленной при диагностике ОМЛ.

4. Достижение костномозговой ремиссии у больных ОМЛ не взаимосвязано с возрастом, полом больных и морфо-цитохимическим вариантом заболевания. При уровнях МОБ выше 0,1% отмечены более низкие показатели безрецидивной выживаемости (различия близки к достоверным, $p=0,09$). По этой причине персистенция МОБ в сочетании с другими факторами неблагоприятного прогноза может являться критерием рестратификации больных в группу более высокого риска.

5. Диагностика минимальной остаточной болезни при опухоли из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток должна основываться не только процентном содержании плазмцитоподобных дендритных клеток и их аберрантности, но и на соотношении $CD123^+CD4^+CD56^+$ клеток к $CD123^+CD4^+CD56^-$ клеткам.

6. Особенности иммунофенотипа бластных клеток при острых миелоидных лейкозах у детей имеют прямую взаимосвязь с эффективностью терапии – достижением ремиссии: экспрессия CD19 на бластных клетках ОМЛ у детей характеризует группу благоприятного прогноза – частота ремиссий 100% (в CD19- негативной группе – 81,2%), $p=0,024$.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема клинического материала. В работе

использованы современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований.

Апробация диссертации состоялась 18 июня 2021 года на совместной научной конференции лаборатории иммунологии гемопоэза, клинко-диагностической лаборатории, лаборатории клинической иммунологии отдела клинко-лабораторной диагностики, отделения химиотерапии гемобластозов и отделения трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток отдела гематологии и трансплантации НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и отделения химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – это гетерогенная группа опухолевых клональных заболеваний системы кроветворения, каждое из которых характеризуется блоком дифференцировки миелоидных предшественников, неконтролируемой их пролиферацией и накоплением в костном мозге, крови, печени, селезёнке и, реже, – в других органах. Частота ОМЛ детского возраста составляет примерно 0,7-1,2 случая на 100000 детей в год, или около 20% от общего числа детских лейкозов [1].

Биология ОМЛ

В редких случаях ОМЛ является следствием предлейкемических врождённых и наследственных заболеваний (агаммаглобулинемия, атаксия-телеангиоэктазия, синдром Швахмана-Даймонда, синдром Луи-Фраумени, анемия Даймонда-Блекфана, транзиторный аномальный миелопоэз у пациентов с синдромом Дауна, анемия Фанкони, нейрофиброматоз типа II, и некоторые другие), приобретенной апластической анемии, миелодиспластического синдрома и некоторых других заболеваний [1,92]. Также существуют несколько факторов, которые увеличивают риск возникновения ОМЛ: это ионизирующая радиация в результате взрыва атомной бомбы, а также химиотерапия по поводу других опухолей. Впервые ассоциация между химиотерапией опухолевых заболеваний и увеличением риска развития ОМЛ была отмечена у пациентов, получавших лечение по поводу лимфомы Ходжкина. Риск развития ОМЛ, связанного с предшествующей химиотерапией, наиболее высок в период от 2 до 9 лет после завершения специфического лечения, однако определяющий развитие второй опухоли патогенетический механизм к настоящему времени изучен не полностью [1,50,51].

Возникновение подавляющего большинства случаев ОМЛ не связано с предшествующими этиологическими факторами. ОМЛ является следствием кооперирующих мутаций в стволовых кроветворных клетках, так называемых мутаций I и II типа: мутаций, приводящих к активации сигнальной трансдукции, и

мутаций, воздействующих на факторы транскрипции и ведущих к блоку дифференцировки [133,134,141]. В результате мутаций нарушается транскрипция и продукция ключевых белков, а линейная гематологическая дифференцировка блокируется и заменяется неконтролируемой пролиферацией злокачественных миелобластов [81-89]. Возникновение ОМЛ в результате генетических поломок часто подтверждается при цитогенетических и молекулярных исследованиях бластов: определяются хромосомные перестройки (транслокации, моносомии), мутации отдельных генов и патологические молекулярные транскрипты [131,133,134].

Классификации ОМЛ

Острый миелоидный лейкоз гетерогенен по своей природе: существует множество вариантов этого заболевания, которые разграничены по совокупности морфоцитохимических, иммунологических, хромосомных и молекулярно-генетических характеристик опухолевой клетки.

Первая классификация ОМЛ была принята в 1976 году Франко-Американо-Британской (ФАБ) группой исследователей. В ней были выделены 6 вариантов ОМЛ (M1 – M6). При пересмотре в 1985 году [3,4,91] ОМЛ были подразделены на 8 вариантов от M0 до M7. Все эти варианты встречаются в детском возрасте.

ФАБ-классификация основывается на морфологии опухолевой клетки и результатах цитохимических реакций в ней.

M0 – острый миелоидный лейкоз с минимальной дифференцировкой. В бластных клетках отсутствуют реакции с миелопероксидазой (<3%) и суданом черным (также <3%).

M1 – острый миелоидный лейкоз без признаков созревания. В клетках присутствует зернистость. Миелопероксидаза (МПО) активна в 3% и более клеток. Клетки гранулоцитарного ростка составляют менее 10% от миелокариоцитов костного мозга.

M2 – острый миелоидный лейкоз с признаками созревания. В бластных клетках также присутствует зернистость, реакция на миелопероксидазу позитивна в 3% и более бластов. Гранулоцитарный росток составляет более 10% от

миелокариоцитов костного мозга.

М3 – острый промиелоцитарный лейкоз. Морфологически этот вариант характеризуется обильной зернистостью в цитоплазме бластов, наличием большого количества пучков палочек Ауэра. Реакции с миелопероксидазой, суданом черным ярко-позитивные. Также выделяют гипогранулярный вариант ОПЛ: в бластных клетках присутствует слабая зернистость, ядро может характеризоваться лобулярностью, палочки Ауэра в умеренном количестве, либо отсутствуют. Для достоверной диагностики острого промиелоцитарного лейкоза необходимо выявление $t(15;17)$ либо транскрипта PML-RAR α в опухолевых клетках.

М4 – острый миеломонобластный лейкоз. При цитохимическом исследовании бластные клетки характеризуются наличием одновременно миелопероксидазы (>3%) и неспецифической эстеразы (>15%), ингибируемой фторидом натрия.

М5 – острый монобластный лейкоз. Опухолевые клетки представлены монобластами – они имеют ядро неправильной, моноцитоидной формы, зернистость в цитоплазме отсутствует или отмечается в минимальном количестве бластов. Выделяют вариант М5а, при котором больше 80% бластных клеток относятся к монобластам, и М5b, где опухолевые клетки представлены промоноцитами и монобластами. Цитохимические признаки одинаковы для обоих подвариантов: реакция с миелопероксидазой позитивна менее чем в 3% бластов, в то время как неспецифическая эстераза, ингибируемая фторидом натрия, присутствует в более чем 15% бластных клеток.

М6 – острый эритробластный лейкоз. Цитохимически бластные клетки характеризуются отсутствием миелопероксидазы (менее чем в 3% клеток наблюдается позитивная реакция), гликоген располагается в цитоплазме в форме крупных гранул. Морфологическая дифференциальная диагностика между эритроидной гиперплазией при миелодиспластическом синдроме и эритробластным лейкозом представляется сложной. В классификации ВОЗ 2017 г. изменена методика подсчёта бластных клеток. Если ранее в случае, если

эритроидный росток составлял более 50% от миелокариоцитов, миелобласты пересчитывались как процент от неэритроидных клеток, то, согласно новой классификации, количество бластных клеток подсчитывается как процент от всех миелокариоцитов вне зависимости от величины эритроидного ростка. Изменились также критерии диагноза при наличии эритроидной гиперплазии: понятие острого эритромиелоза выведено из классификации, и при наличии более 5% и менее 20% бластов вне зависимости от наличия эритроидной гиперплазии состояние классифицируется как миелодиспластический синдром с избытком бластов; при наличии более 20% бластов – как острый миелоидный лейкоз. При диагнозе острого эритробластного лейкоза в настоящее время подразумевается наличие в костном мозге более 80% клеток эритроидного ряда, из которых более 30% являются проэритробластами при условии, что миелобластный компонент составляет не более 5% [5,6,7].

М7 – острый мегакариобластный лейкоз (ОМегЛ). Морфологически бласты могут быть представлены полиморфными клетками с округлыми ядрами и базофильной отростчатой цитоплазмой. Наличие зернистости и палочек Ауэра нехарактерно для М7-варианта. Бластные клетки могут также быть представлены округлыми клетками с ядрами правильной формы, схожими с лимфобластами. При цитохимическом исследовании активность миелопероксидазы присутствует менее чем в 3% бластов, PAS-реакция может выявлять крупные капли гликогена в цитоплазме. Единственным специфичным для ОМегЛ цитохимическим признаком является тромбоцитарная пероксидаза, которая определяется в ядерной мембране и в эндоплазматическом ретикулуме мегакариобластов при электронной микроскопии. [8,90].

Таким образом, стандартное морфоцитохимическое исследование не позволяет дифференцировать М0, М7 варианты ОМЛ и лимфобластные варианты острых лейкозов. Для подтверждения ОМегЛ необходимо иммунологическое выявление одного и более мегакариоцитарных антигенов CD61, CD42a, CD42b или CD41.

Субстратом острого мегакариобластного лейкоза являются

мегакариоцитарные предшественники. Первое описание острого мегакариобластного лейкоза относится к 1931 году, его автор – J. Von Boros [9,10]. В течение нескольких последующих десятилетий сообщения об ОмегаЛ были редкими, так как отсутствовали диагностические критерии. В 1978 году французские ученые J. Breton-Gorius et al [11] впервые описали выявление тромбоцитарной пероксидазы в бластных клетках при электронной микроскопии трепанобиоптата костного мозга пациента с острым лейкозом. Это открытие стало первым из объективных критериев диагностики острого мегакариобластного лейкоза. В 1985 году диагноз острого мегакариобластного лейкоза с уточненными диагностическими критериями был внесен во Франко-Американо-Британскую классификацию.

Острый мегакариобластный лейкоз имеет двойное распределение по возрастам: пики заболеваемости наблюдаются у детей 1-3 лет и у взрослых 50-60 лет [10,12]. Острый мегакариобластный лейкоз составляет 3-10% от всех острых миелоидных лейкозов детей и является прогностически неблагоприятным типом лейкоза для всех пациентов, кроме детей с синдромом Дауна, прогноз которых, напротив, благоприятен [10,13,14,15].

Происхождение и развитие острого мегакариобластного лейкоза являются сложными и разнородными процессами у взрослых и у детей. Опухолевая масса при этом заболевании может состоять из мегакариобластов разной степени созревания. У взрослых пациентов острый мегакариобластный лейкоз может быть первичным процессом или являться результатом лейкемической трансформации предсуществовавшего гематологического заболевания. Сообщается, что вторичный острый мегакариобластный лейкоз часто возникает в результате трансформации хронического миелоидного лейкоза, истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии или первичного миелофиброза. Часто при остром мегакариобластном лейкозе у взрослых наблюдаются комплексные кариотипы опухолевых клеток, что наводит на мысль о том, что ещё большее, чем известно сейчас, количество острых мегакариобластных лейкозов могут оказаться вторичными по отношению к миелопролиферативным заболеваниям [10,16].

Ранее диагностика острого мегакариобластного лейкоза была затруднительна из-за того, что его сложно отличить от острого панмиелоэоза с миелофиброзом на основании гистологического исследования костного мозга. Появление диагностических критериев ФАБ-классификации и внедрение в практику проточной цитометрии существенно улучшили точность диагностики острого мегакариобластного лейкоза. В процессе пролиферации мегакариобласты способны синтезировать факторы активации роста фибробластов, что зачастую приводит к выраженному диффузному фиброзу стромы костного мозга. Такой фиброз препятствует аспирации костного мозга: полученные образцы характеризуются недостаточным объемом и клеточностью («сухой пунктат»), разбавлены кровью и содержат недостоверную пропорцию бластных клеток. Это обуславливает трудности дифференциальной диагностики между острым мегакариобластным лейкозом и миелопролиферативными заболеваниями [17,18]. При невозможности получения качественного аспирата костного мозга выполняются мазки-отпечатки трепанобиоптата костного мозга, которые позволяют более адекватно определить процент бластных клеток и выполнить иммуногистохимическое исследование. Orazi et al. установили, что при ИГХ-исследовании бластные клетки М7-ОМЛ позитивны по антигену CD34 лишь в 60% случаев, в то время как при остром панмиелоэозе с миелофиброзом бластные клетки всегда экспрессируют CD34. При остром мегакариобластном лейкозе бластные клетки обычно не экспрессируют миелопероксидазу; также, в отличие от бластных клеток при остром панмиелоэозе с миелофиброзом, они экспрессируют специфические мегакариоцитарные маркеры [19].

При проточно-цитометрическом исследовании острого мегакариобластного лейкоза мегакариобласты экспрессируют такие маркеры мегакариоцитарной линии как CD61, CD42a, CD42b, CD41. по некоторым данным острый мегакариобластный лейкоз у детей с синдромом Дауна имеет характерный иммунофенотип с экспрессией CD7, CD11b и CD36. [10,18].

Долгое время этот вариант ОМЛ был ассоциирован только с одной специфической цитогенетической аномалией: транслокация $t(1;22)(p13;q13)$, в

результате которой образуется химерный ген *RBM15-MKLL1*. Такая транслокация чаще всего обнаруживается у пациентов моложе 2 лет; ее наличие в ряде исследований признается как благоприятный прогностический признак [15,18,20]. Однако с появлением NGS (метода полногеномного секвенирования) были обнаружены другие характерные для ОмегаЛ цитогенетические поломки с различной частотой выявления и прогностическим значением: это *inv(16)(p13.3q24.3)*, *t(11;15)(p15;q35)*, реаранжировки гена *KMT2A* и некоторые другие [17]. Также при ОмегаЛ в бластах могут обнаруживаться и неспецифичные для этого заболевания цитогенетические поломки, например, сложный кариотип и/или моносомия 5, 7, 9 хромосомы. Их наличие является дополнительным фактором плохого прогноза.

Острый мегакариобластный лейкоз, ассоциированный с синдромом Дауна, является уникальным заболеванием, которое вызывает особый интерес исследователей в связи с тем, что он дебютирует во время внутриутробной жизни плода; считается, что это заболевание является моделью многоступенчатого процесса лейкогенеза. У 5-10% новорожденных с синдромом Дауна развивается транзиторный аномальный миелопоэз (ТАМ) – это миелопролиферативное заболевание, которое обычно самостоятельно разрешается без лечения в течение 3-4 первых месяцев жизни. Однако у 20-30% детей с транзиторным аномальным миелопоэзом на фоне синдрома Дауна впоследствии в периоде раннего детства развивается острый мегакариобластный лейкоз. Было показано, что сама трисомия 21 хромосомы способна вызывать искажение одновременно во всех трёх линиях кроветворения как при внутриутробном, так и в неонатальном гемопоэзе, однако молекулярные основы этого процесса считаются комплексными и известны не до конца. Wechsler et al. обнаружили, что при всех случаях ТАМ присутствует «усекающая» N-терминальный конец белка мутация в экзоне 4 гена *GATA1*, ДНК-связывающий фактор транскрипции на X-хромосоме, в дополнение к трисомии 21 хромосомы. Мутация гена *GATA1* исчезает при наступлении ремиссии ТАМ; считается, что такая мутация специфична для острого мегакариобластного лейкоза при синдроме Дауна [18,21,22].

В то время как трисомия 21 хромосомы в сочетании с мутацией *GATA1* необходима для развития ТАМ, Yoshida et al. показали, что мутации гена когезина присутствуют в 23 из 49 случаев острого мегакариобластного лейкоза с синдромом Дауна и отсутствуют (0/49 случаев) при ТАМ. Эти данные подразумевают важную роль когезина как третьего генетического повреждения, необходимого для трансформации ТАМ в острый мегакариобластный лейкоз при синдроме Дауна. Когезин представляет собой белковый комплекс из 4 субъединиц, который соединяет сестринские хроматиды в процессе репликации ДНК вплоть до их разделения во время митоза [23,24,25].

В целом, риск развития острого миелоидного лейкоза у детей с синдромом Дауна в 150 раз превышает таковой у остальных детей. При этом ОМЛ при синдроме Дауна характеризуется высокой химиочувствительностью: частота ремиссий составляет 90%, уровень 5-летней общей выживаемости – более 80% [135-138]. Таким образом, генетические различия между острым мегакариобластным лейкозом при синдроме Дауна и у детей без синдрома Дауна представляют клинический интерес.

У взрослых пациентов с острым мегакариобластным лейкозом отмечается ещё большее разнообразие цитогенетических аномалий, чем у детей. Наиболее часто у взрослых встречаются $inv(3)(q21;q26)$, аберрации 5 и 7 хромосом и $t(9;22)(q34;q11)$ [10,26,27]. Мутация $inv(3)(q21;q26)$ часто наблюдается у пациентов с предсуществовавшими миелопролиферативными заболеваниями и бывает ассоциирована с нормальным или повышенным уровнем тромбоцитов крови. Dastugue et al. показали, что острые мегакариобластные лейкозы взрослых в отличие от других первичных ОМЛ характеризуются более частым наличием сложных кариотипов и неклассифицируемых аномалий кариотипа. Исследователи также показали, что взрослые пациенты с острым мегакариобластным лейкозом с наличием несбалансированных перестроек 5 и 7-й хромосом составляют отдельные подгруппы [10,16]. Выделение подгруппы на основе этих цитогенетических аномалий в качестве критерия схоже с таковым при диагностике ОМЛ, ассоциированного с миелодиспластическими (МДС)

изменениями. ОМЛ с цитогенетическими изменениями, характерными для МДС, имеет неблагоприятный прогноз, что частично объясняет низкую общую выживаемость взрослых пациентов с острым мегакариобластным лейкозом. Сложность и гетерогенность перестроек при остром мегакариобластном лейкозе также заставляет думать о роли мутаций хромосомы 17p или p53, однако к настоящему времени соответствующие исследования отсутствуют.

Недавно было представлено масштабное популяционное исследование, основанное на базе данных SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results), объединившей данные о 5-летней общей выживаемости при остром мегакариобластном лейкозе в общей совокупности пациентов с ОМЛ. Были получены достоверные результаты, указывающие на необходимость обновления подходов к прогнозу и лечению острого мегакариобластного лейкоза взрослых. Заболеваемость острым мегакариобластным лейкозом у взрослых по данным академических центров составила ~1% с меньшей медианой возраста (~50 лет), чем при других подтипах ОМЛ. Индукционное лечение представляло собой режимы, включающие антрациклины и цитарабин, которые традиционно используются и при других типах ОМЛ. Частота достижения полной ремиссии (ПР) составила от 43 до 84%, что соответствует результатам при других типах ОМЛ, кроме варианта М3. Однако медиана общей выживаемости при остром мегакариобластном лейкозе оказалась значительно ниже, чем при других ОМЛ, и составляет 18-40 недель. Более того, при дополнительном анализе базы SEER исследовательской группой Nahn et al. было показано, что отношение рисков при остром мегакариобластном лейкозе в сравнении с другими типами ОМЛ составляет 1,223 (конфиденциальный интервал 95% 1.086–1.377, $p = 0.001$) [10,28].

Несмотря на сопоставимую с другими типами ОМЛ частоту достижения ремиссии низкий уровень общей выживаемости при М7-ОМЛ свидетельствует об очевидной необходимости улучшений в терапии консолидации ремиссии при данном варианте лейкоза. Опубликовано множество как единичных клинических случаев, так и серий случаев, в которых рассматривается роль трансплантации

гемопозитических стволовых клеток (ТГСК) в качестве консолидации полученной ремиссии при М7-ОМЛ, однако их результаты противоречивы. Ретроспективное исследование Европейского общества по трансплантации костного мозга (European Group for Bone Marrow Transplant (ЕВМТ)) представило анализ роли ТГСК в качестве консолидации ремиссии при первичном мегакариобластном лейкозе. Трёхлетняя общая выживаемость (ОВ) как у взрослых пациентов, так и у детей была более низкой при аутологичной ТГСК (61% и 30%, соответственно), чем при аллогенной ТГСК (82%, 43%). Отмечалась высокая частота рецидивов как в группе взрослых, так и в педиатрической группе. Учитывая высокую частоту рецидивов в группе взрослых пациентов, аутологичную ТГСК не следует рассматривать у них в качестве терапевтической опции. В то же время аллогенная ТГСК является для взрослых пациентов с М7-ОМЛ лучшей стратегией лечения, чем стандартная консолидация ремиссии: трёхлетняя выживаемость, свободная от прогрессирования является в этом случае достаточно высокой и составляет 46%. В группе детей с отсутствием синдрома Дауна аллогенная ТГСК также оказалась лучшей терапевтической опцией, чем стандартная химиотерапия, несмотря на высокий уровень рецидивов [10,29].

Таким образом, аллогенная ТГСК, выполненная после достижения ПР, является лучшей опцией консолидации ремиссии и для взрослых, и для педиатрических пациентов в отсутствие синдрома Дауна, чем стандартная химиотерапия, так как мегакариобластный вариант ОМЛ является неблагоприятным фактором прогноза ОВ при ОМЛ. Требуется анализ клинической эффективности аллогенной ТГСК в качестве консолидации ремиссии, а также выделение групп пациентов, нуждающихся в аллоТГСК, и установление для них оптимальных сроков и условий её проведения. В настоящее время достоверно установлена взаимосвязь эрадикации минимальной остаточной болезни (достижение МОБ-негативного статуса) у пациентов перед аллогенной ТГСК с увеличением общей и безрецидивной выживаемости [30,31,32,33]. Определение МОБ при остром мегакариобластном лейкозе является важной задачей исследователей, особенно в случаях заболевания в отсутствие t(1;22).

С развитием иммунологии, генетики и появлением молекулярных исследований классификация ОМЛ дополнялась и видоизменялась. В настоящее время для полноценной диагностики ОМЛ в соответствии с классификацией, принятой ВОЗ в 2017 году, необходимо не только определение ФАБ-варианта и иммунофенотипирование, но и выявление цитогенетических и молекулярно-генетических характеристик. Согласно классификации ВОЗ (2017) все ОМЛ и другие опухоли с миелоидной дифференцировкой подразделяются на основе цитогенетических и молекулярно-генетических особенностей.

Перечень вариантов ОМЛ и других опухолей с миелоидной дифференцировкой (ВОЗ, 2017) [6]:

ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями:

1. ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22)$; *RUNX1-RUNX1T1*
2. ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; *CBFB-MYH11*
3. Острый промиелоцитарный лейкоз с $t(15;17)(q22;q12)$; *PML-RARA*
4. ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23)$; *MLLT3-MLL*
5. ОМЛ с $t(6;9)(p23;q34)$; *DEK-NUP214*
6. ОМЛ с $inv(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$; *RPN1-EVII*
7. ОМЛ (мегакариобластный) с $t(1;22)(p13;q13)$; *RBM15-MKLI*
8. ОМЛ с BCR/ABL1

ОМЛ с генными мутациями:

1. ОМЛ с мутированным геном *NPM1*
2. ОМЛ с биаллельной мутацией гена *CEBPA*[120]
3. ОМЛ с мутированным геном *RUNX1*

ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией (категория включает в себя ОМЛ с предшествующим миелодиспластическим синдромом, ОМЛ с МДС-ассоциированными цитогенетическими аномалиями и ОМЛ с диспластическими изменениями двух или более миелоидных ростков гемопоэза)

Миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей химиотерапией

ОМЛ, по-другому не специфицированные (AML Not Otherwise Specified or AML

NOS):

1. Острый миелобластный лейкоз с минимальной дифференцировкой
2. Острый миелобластный лейкоз без созревания
3. Острый миелобластный лейкоз с созреванием
4. Острый миеломонобластный лейкоз
5. Острый монобластный/моноцитарный лейкоз
6. Острый эритробластный лейкоз
7. Острый мегакариобластный лейкоз
8. Острый лейкоз из базофилов

Острый панмиелоз с миелофиброзом (синоним: острый миелофиброз; острый миелосклероз)

Миелоидная саркома (синонимы: экстрамедуллярная миелоидная опухоль; гранулоцитарная саркома; хлорома)

Миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна:

1. Транзиторный аномальный миелопоз (синоним: транзиторное миелопролиферативное заболевание)
2. Миелоидный лейкоз, связанный с синдромом Дауна

Опухоль из плазмоцитоидных дендритных клеток

Острые лейкозы неопределенной линии дифференцировки

1. Острый недифференцированный лейкоз
2. Острый лейкоз смешанного фенотипа с $t(9;22)(q34;q11.2)$; *BCRABL1*
3. Острый лейкоз смешанного фенотипа с $t(v;11q23.3)$; реаранжировка гена *KMT2A* (ранее – *MLL*)
4. Острый лейкоз смешанного фенотипа, В/миелоидный, NOS
5. Острый лейкоз смешанного фенотипа, Т/миелоидный, NOS
6. Острый лейкоз смешанного фенотипа NOS
7. Острые лейкозы неопределенной линии дифференцировки NOS

Опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (ОБПДК, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm) – это крайне редкая опухоль с агрессивным течением, субстратом которой являются патологические плазмоцитоидные

дендритные клетки. При анализе профиля экспрессии генов опухолевых клеток при ОБПДК было показано их биологическое сходство с миелоидными опухолями. Впервые заболевание вошло под этим названием в классификацию ВОЗ 2008 года, ОБПДК относилась к группе острых миелоидных лейкозов. [6,7,34-38,162].

По различным оценкам заболеваемость ОБПДК составляет около 0,5% среди всех гематологических новообразований; преобладает мужской пол (2,5-3:1) и возраст старше 60 лет [39-42]. Однако существуют единичные описания случаев ОБПДК в более молодом и в детском возрасте [43,44].

При ОБПДК поражаются многие ткани и органы, но в первую очередь в процесс вовлекаются костный мозг, кожа, лимфатические узлы [121]. При поражении кожи главным образом вовлекается дерма, в меньшей степени – эпидермис и подкожная клетчатка. В биоптате пораженного опухолью лимфатического узла определяется диффузная инфильтрация опухолью межфолликулярной и медуллярной зон. Поражение костного мозга может быть как очаговым, так и диффузным, при этом остальная кроветворная ткань часто имеет признаки дисплазии, чаще – дисмегакариоцитопоза [45].

Специфические морфоцитохимические признаки ОБПДК не выделены: опухолевые клетки чаще имеют неправильной формы ядра с бластоидной структурой хроматина и несколькими нуклеолами. Цитохимические реакции с миелопероксидазой и альфа-нафтилбутиратэстеразой негативны.

При иммунологических исследованиях пораженных тканей опухолевые клетки экспрессируют антигены плазмцитоподобных дендритных клеток: CD123, TCL1, CD303; а также определяются антигены CD4, CD43, CD45RA, CD56. В 60-80% случаев экспрессирован антиген CD68, характерный для зрелых плазмцитоподобных дендритных клеток. Часто наблюдается экспрессия антигенов CD7 и CD33, а также некоторых других – CD2, CD5, CD36, CD38, суCD79а в отсутствие CD19, CD20, CD13, MPO, суCD3 и мембранного CD3 [46-49, 122].

При цитогенетическом исследовании в большинстве случаев ОБПДК определяются аномалии кариотипа. Специфичные для заболевания

цитогенетические поломки не выделены, однако наиболее часто встречаются сложный кариотип и 6 цитогенетических аномалий: 5q21 или 5q34 (в 72% случаев), 12p13 (в 64%), 13q13-21 (в 64%), 6q23-qter (в 50%), 15q (в 43%) и утрата 9ой хромосомы (в 28%) [6,163,164,165].

Заболевание имеет крайне агрессивное течение, средняя выживаемость составляет всего 10 - 19,8 месяцев. В связи с этим всем пациентам, впервые достигшим полной ремиссии при ОБПДК, рекомендуется выполнение аллогенной ТГСК.

Диагностика ОМЛ

Диагностика ОМЛ основана на обнаружении в костном мозге или крови 20% и более бластных клеток с миелоидной линией дифференцировки. При наличии в бластах следующих патогномоничных для ОМЛ хромосомных аномалий $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q12;q11-12)$ *PML/RAR α* , *inv(16)* или $t(16;16)(p12; q23)$ *CBF β /MYH11*, $t(1;22)$ независимо от процентного содержания бластных клеток также устанавливается диагноз ОМЛ [1,6,52].

При проточно-цитометрическом исследовании опухолевых клеток миелоидно-специфичным антигеном является миелопероксидаза при условии отсутствия на бластных клетках маркеров, специфичных для лимфоидных линий дифференцировки – суCD79альфа и суCD3.

В настоящее время используются три фактора, определяющих прогноз при ОМЛ у детей:

1. Наличие гиперлейкоцитоза
2. Цитогенетические и молекулярные факторы прогноза
3. Ответ на первый курс индукции ремиссии – недостижение ремиссии

по окончании индукционного курса лечения является важным предиктором плохого прогноза даже при достижении полной ремиссии при последующем лечении [2,132,139].

Генетические aberrации являются критическими детерминантами исхода, они обычно используются для риск-стратификации (Таблица 1).

Таблица 1 – Прогностически значимые генетические аномалии при ОМЛ у детей

| Риск | Генетические/молекулярные характеристики лейкоза |
|---------------|---|
| Стандартный | <p>t(8;21)(q22;q22)/<i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB-MYH11</i> t(15;17)(q22;q21)/<i>PML-RARA</i> t(1;11)(q21;q23)/<i>MLLT11-KMT2A</i> мутация <i>NPM1</i> в отсутствие <i>FLT3-ITD/FLT3-ITD^{low}</i> биаллельная мутация <i>CEBPA</i> в отсутствие <i>FLT3-ITD</i></p> |
| Промежуточный | <p>t(9;11)(p12;q23)/<i>MLLT3-KMT2A</i>, остальные перестройки <i>KMT2A</i> «дикий» тип <i>NPM1</i> в отсутствие <i>FLT3-ITD/FLT3-ITD^{low}</i> t(1;22)(p13;q13)/<i>RBM15-MKL1</i></p> |
| Высокий | <p>t(6;11)(q27;q23)/<i>MLLT4-KMT2A</i> t(10;11)(p12;q23)/<i>MLLT10-KMT2A</i> t(10;11)(p11.2;q23)/<i>AB11-KMT2A</i> t(6;9)(p23;q34)/<i>DEK-NUP214</i> t(8;16)(p11;p13)/<i>KAT6A-CREBBP</i> t(16;21)(q24;q22)/<i>RUNX1-CBFA2T3</i> t(5;11)(q35;p15.5)/<i>NUP98-NSD1</i> t(11;15)(p15;q35)/<i>NUP98-KDM5A</i> inv(16)(p13.3q24.3)/<i>CBFA2T3-GLIS2</i> t(3;5)(q25;q34)/<i>NPM1-MLF1</i> inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> «Дикий» тип гена <i>NPM1</i> в сочетании с <i>FLT3-ITD^{high}</i> (с высокой аллельной нагрузкой) -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Сложный кариотип Моносомный кариотип t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> Мутации <i>ASXL1, TP53</i></p> |

Абсолютное большинство исследований относит пациентов, у которых определяются $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1$, $inv(16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11$, или $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11$, к группе низкого риска. Также к группе низкого риска у детей относится острый промиелоцитарный лейкоз.

Нарушения, связанные с высоким риском рецидива ОМЛ в детском возрасте, включают моносомию 7, внутренние tandemные дупликации (ITD) *FLT3* и менее распространенные изменения, такие как $t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98-NSD1$, $t(6;9)(p23;q34)/DEK-NUP214$, $t(8;16)(p11;p13)/KAT6A-CREBBP$ и $t(16;21)(q24;q22)/RUNX1-CBFA2T3$. Мутации в гене *fms*-связанной тирозинкиназы 3 (*fms*-related tyrosine kinase, *FLT3*) обнаруживают при различных вариантах ОМЛ, и их относят к мутациям 1-го класса, определяющим преимущество опухолевых клеток в пролиферации и/или выживании. ОМЛ с мутациями *FLT3* не выделяются в отдельную категорию, однако они имеют прогностическую значимость [119]. Прогностическое значение мутаций гена *FLT3* зависит от аллельного соотношения (аллельной нагрузки) ITD: показано, что мутация *FLT3*-ITD с низким аллельным соотношением ($<0,5$, *FLT3*-ITD^{low}) в сочетании с мутацией NPM1 является благоприятным прогностическим фактором. В то же время высокое аллельное соотношение ($>0,5$, *FLT3*-ITD^{high}) ассоциировано с более низкой безрецидивной и общей выживаемостью [60,168]. ОМЛ с реаранжировками *KMT2A* (ранее известный как *MLL*) - разнородный подтип ОМЛ. Внутри этой группы пациенты с $t(6;11)(q27;q23)$, $t(10;11)(p12;q23)$ и $t(10;11)(p11.2;q23)$ имеют высокую частоту рецидивов, тогда как у пациентов с $t(1;11)(q21;q23)$ чаще наблюдается благоприятный исход болезни, а остальные варианты перестроек *KMT2A* относятся к группе промежуточного прогноза. К группе высокого риска относят также пациентов с вторичным ОМЛ [2,60].

Оценка ответа производится обычно на 22-29 день индукционного лечения. Наличие $>5\%$ бластов в костном мозге (при морфологическом подсчёте не менее 200 миелокариоцитов) является основанием для отнесения пациента к группе высокого риска вне зависимости от цитогенетической группы, и, следовательно, является показанием для выполнения аллотГГСК в первой ремиссии. В то же

время у 20-41% пациентов младше 18 лет, достигших костномозговой ремиссии после индукционной терапии, в последующем развивается рецидив [53].

В настоящее время для более точной оценки глубины полученной ремиссии при окончании первого этапа специфического лечения – определения минимальной остаточной болезни – при острых лейкозах используется полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и многоцветная проточная цитофлуориметрия. Оба этих метода показали высокую чувствительность [123,124,125,167,175] и широко используются у пациентов с ОМЛ, зачастую – параллельно, однако гетерогенность заболевания и ограничения обоих методов препятствуют их окончательному внедрению в риск-стратификацию. Так, одним из главных ограничений молекулярно-генетического метода оценки МОБ является его применимость только к пациентам с известной и доступной для исследования молекулярной поломкой: по различным оценкам, от 20-35% до 60-70% пациентов имеют такие молекулярные аберрации [126, 140]. К настоящему времени с использованием NGS (next generation sequencing, секвенирование нового поколения) у 75-89% пациентов с ОМЛ удается выделить генетические/молекулярные аномалии [54]. Молекулярный мониторинг МОБ при помощи ПЦР применяется для отслеживания процента клеток, содержащих мутации *NPM1*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* или *PML-RARA*, *WT1*. Остальные мутации (*FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, *NRAS*, *KRAS*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *MLL-PTD*) не могут применяться как основа определения МОБ-статуса в связи с недостаточной корреляцией значений МОБ с течением заболевания [55,56,129,130]. Также к ограничениям метода оценки МОБ при помощи ПЦР относят клональную разнородность опухолевого субстрата при ОМЛ: часто он состоит из множества субклонов, которые несут различные дополнительные мутации. В процессе терапии субклоны с некоторыми молекулярными поломками могут уменьшаться до недетектируемого уровня, уступая место минорным субклонам с другими мутациями; в рецидиве заболевания также могут появляться новые генетические аномалии [124,125,127,128].

Иммунофенотипирование в оценке глубины ремиссии при ОМЛ, минимальная остаточная болезнь

Подробное иммунофенотипирование бластных клеток в дебюте заболевания дает возможность выявить aberrантность экспрессии иммунологических маркеров, на основании которой возможна количественная оценка остаточной опухоли в костном мозге после лечения. Также некоторые особенности иммунофенотипа опухолевых клеток достоверно ассоциируются с вероятностью достижения ремиссии при ОМЛ у детей.

В настоящее время общепринята диагностика лимфопролиферативных заболеваний и острых лейкозов с использованием иммунофенотипических панелей консорциума Еврофлоу [57,145,158,171,173]. На первом этапе выполняют ориентационную пробу ALOT (acute leukemia orientation tube, ориентационная проба при диагностике острых лейкозов), которая позволяет определиться с линейностью острого лейкоза и выбрать панель для дальнейшего изучения иммунофенотипа заболевания. Эти панели обеспечивают подробную характеристику опухолевых клеток и в то же время они максимально стандартизируют процесс пробоподготовки и анализа образцов, что делает результаты более точными и воспроизводимыми. Применение таких (Таблицы 2, 3) панелей при диагностике острого лейкоза в большинстве случаев позволяет определить лейкоз-ассоциированный иммунофенотип для дальнейшего определения МОБ.

Таблица 2 – Ориентационная проба ALOT

| Флуорохром | V450 | V500 | FITC | PE | PE- cy5 | PE- cy7 | APC | APC- H7 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|--------------------|--------------------|------------|--------------------|
| Маркер | cyCD3 | CD45 | cyMPO | cyCD79 α | CD34 | CD19 | CD7 | sCD3 |

В ориентационной пробе оценивается экспрессия на бластных клетках трёх линейно-специфичных маркеров, которые в большинстве случаев позволяют определить принадлежность лейкоза к миелоидной (MPO), T (cyCD3) и B

(суCD79 α) линии дифференцировки, выявить признаки смешанно-линейного острого лейкоза.

Таблица 3 – Панель моноклональных антител Еврофлоу

| Флуорохром № пробы | V450 | V500 | FITC | PE | PE- cy5 | PE-cy7 | APC | APC H7 |
|-----------------------|--------|------|----------------|--------|------------|--------|--------|-----------|
| 1 | HLA-DR | CD45 | CD16 | CD13 | CD34 | CD117 | CD11b | CD10 |
| 2 | HLA-DR | CD45 | CD35 | CD64 | CD34 | CD117 | CD300e | CD14 |
| 3 | HLA-DR | CD45 | CD36 | CD105 | CD34 | CD117 | CD33 | CD71 |
| 4 | HLA-DR | CD45 | nuTdT | CD56 | CD34 | CD117 | CD7 | CD19 |
| 5 | HLA-DR | CD45 | CD15 | NG2 | CD34 | CD117 | CD22 | CD38 |
| 6 | HLA-DR | CD45 | CD42a/ CD61 | CD203c | CD34 | CD117 | CD123 | CD4 |
| 7 | HLA-DR | CD45 | CD41 | CD25 | CD34 | CD117 | CD42b | CD9 |

Основополагающим событием в развитии ОМЛ является возникновение мутаций, приводящих к блоку линейной гемопоэтической дифференцировки и неконтролируемому размножению злокачественных аналогов миелоидных предшественников. Блок дифференцировки может возникнуть на разных этапах сложной, многоуровневой система миелопоэза, обуславливая возможность происхождения лейкоза из различных по степени созревания клеток и, следовательно, вероятность множества вариантов опухолевых иммунофенотипов. Высокая гетерогенность иммунофенотипических вариантов ОМЛ диктует необходимость использования широких панелей антител при диагностическом исследовании.

Выделение гетерогенной популяции миелоидных бластов в панелях Еврофлоу осуществляется с использованием 4 каркасных маркеров (HLA-DR,

CD45, CD34, CD117).

Пробы 1 и 2 (Таблица 3) посвящены нейтрофильному и моноцитарному созреванию: антигены CD10 и CD35 (проба 2) в норме впервые появляются на зрелых нейтрофилах. CD16 появляется на уровне метамиелоцитов, а CD11b слабо экспрессируется уже на миелоцитах; экспрессия обоих антигенов постепенно нарастает по мере созревания нейтрофила. На ранних этапах дифференцировки нейтрофилов по мере нарастания CD33 снижается экспрессия CD34 и HLA-DR, при этом на зрелых нейтрофилах экспрессия CD33 слабее, чем на уровне промиелоцитов и миелоцитов.

Монобласты экспрессируют антигены миелоидных предшественников CD117, CD34, HLADR, и по мере созревания приобретают экспрессию CD64, CD33, CD36, CD15, CD11b с исчезновением CD117, CD34. Яркая экспрессия CD33, CD14, CD300, CD64, CD36 и промежуточная – HLADR, CD15, CD4 – в норме характерна для зрелых моноцитов.

В пробе 3 находятся маркеры для выявления эритроидных предшественников разной степени зрелости. Ранние эритроидные предшественники характеризуются экспрессией CD36, CD71, CD105, а также CD117, CD34, HLA-DR; CD45 отсутствует/экспрессирован слабо. По мере созревания исчезает экспрессия CD117, CD34, постепенно снижается интенсивность экспрессии HLA-DR, CD105 и CD71, часть эритроидных клеток слабо экспрессирует CD36.

Проба 4 позволяет идентифицировать коэкспрессию наиболее часто встречающихся на клетках ОМЛ лимфоидных маркеров CD7, CD19, CD56. Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (nuTdT) в сочетании с CD19 позволяет дифференцировать опухолевую популяцию от популяции нормальных В-линейных предшественников (их доля может составлять до 20-30% миелокариоцитов у детей младшего возраста и присутствовать в костном мозге наряду с опухолевой популяцией), либо выявить aberrантную коэкспрессию CD19 на миелобластах.

Проба 5 выявляет антигены стволовых клеток и маркеры aberrантности.

Так, CD15 слабо экспрессируется нормальными миелоидными предшественниками; NG2 в норме отсутствует на гемопоэтических клетках. Его экспрессия (наблюдается в 10% случаев ОМЛ) ассоциирована с мутациями гена *MLL*.

Пробы 6 и 7 позволяют выявить мегакариоцитарную, базофильную, тучноклеточную природу бластов, а также исключить опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток.

При диагностике острого лейкоза необходимо учитывать характерные для детского возраста особенности популяционного состава и процентного соотношения ростков кроветворения [142,143,144]. В таблице 4 представлены возрастные особенности состава клеток костного мозга.

Таблица 4 – Соотношение ряда субпопуляций миелокариоцитов в разных возрастных группах

| Популяции клеток костного мозга | Процентное содержание клеточных популяций костного мозга в зависимости от возраста, в среднем (%) | | | |
|---------------------------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Дети до 1 года | Дети от 1 до 7 лет | Дети старше 7 лет | Взрослые до 70 лет |
| CD34+ миелобласты | 1,4 (1,0-2,0) | 0,9 (0,6-1,6) | 0,6 (0,2-1,1) | 0,7 (0,3-1,3) |
| Гранулоциты | 53,8 (34,9-77,1) | 62,3 (51,3-73,7) | 70,7 (62,9-87,8) | 69,3 (57,9-79,7) |
| В-линейные предшественники | 15,5 (2,2-32,9) | 9,0 (1,3-22,8) | 2,0 (0,2-4,9) | 0,9 (0,0-2,6) |
| Зрелые В-лимфоциты | 6,4 (2,4-10,8) | 4,3 (1,2-7,5) | 2,6 (0,6-5,0) | 1,8 (0,4-3,5) |

В костном мозге детей в возрасте 1-2 лет присутствует более широкая популяция нормальных В-линейных и миелоидных предшественников. С возрастом количество В-линейных и миелоидных клеток-предшественниц, а также зрелых В-лимфоцитов сокращается, а популяция зрелых гранулоцитов увеличивается. Процент В-линейных предшественников может широко варьировать в среднем от 2,2 до 32,9% у детей младше 1 года и от 1,3 до 22,8% у детей в возрасте от 1 года до 7 лет. В связи с этим при диагностике острого лейкоза (как миелоидного, так и лимфобластного) у детей важно подробно установить состав CD45^{low} клеток, разделяя нормальные В-линейные, миелоидные и опухолевые бласты. Нормальные показатели крови детского возраста также имеют свои особенности: у новорожденных возможно появление в формуле крови единичных метамиелоцитов и миелоцитов, повышенный уровень палочкоядерных нейтрофилов, а в период с 1ого месяца жизни по достижении 6 лет отмечается «физиологический» лимфоцитоз [172].

Морфологический подсчет костного мозга остается стандартным подходом к оценке ответа на лечение, как в условиях рутинной практики, так и в клинических исследованиях, и результаты подсчета позволяют принять решение об аллогенной ТГСК. Однако точность подсчета бластной популяции с помощью светового микроскопа затрудняется ограниченной чувствительностью метода и его относительной субъективностью. Так, недавнее исследование, проведенное на большой когорте ОМЛ у детей (n=203), показало значимые несоответствия в оценке ремиссии между морфологическим методом и проточной цитофлуориметрией. Некоторым пациентам морфологическим путем была констатирована ремиссия, однако по данным проточной цитометрии в их костном мозге оставалось более чем 5% бластных клеток. Напротив, 67% пациентов из тех, кто морфологически были расценены как имеющие частичный ответ (от 5 до 15% бластов), и 26% из тех, кто были признаны первично резистентными (более 15% бластных клеток), по данным проточной цитометрии имели полный ответ, минимальная резидуальная болезнь не определялась [58,104]. Некоторые другие исследования также показали схожие несоответствия между морфологическим

методом и проточной цитометрией, причем второй метод оказывал большее влияние на прогноз [59,60].

Современные интенсивные режимы терапии в большинстве случаев приводят к быстрому снижению лейкозных клеток, и опухоль становится нераспознаваемой при морфологическом методе. Проточно-цитометрическое определение количества остаточных аберрантных клеток позволяет оценить динамику опухолевой нагрузки на фоне костномозговой ремиссии. Определение МОБ с этого этапа лечения порой является единственным показателем динамики клиренса опухолевых клеток [74]. К настоящему времени в большинстве исследований посвящено определению МОБ на ранних этапах специфической терапии [59,75,97,100,110,174]. Во многих зарубежных клинических исследованиях показано, что МОБ-негативный статус (в части работ - недетектируемая МОБ) является фактором благоприятного прогноза [61,64,117].

Изучение возможностей оценки МОБ с помощью многоцветной проточной цитометрии (в докладах Vuccisano et al и Kern et al, [62,63]) не оставляет сомнений в том, что данный метод может быть использован для риск-адаптированного подхода как у детей, так и среди взрослых пациентов. Данный подход используется в том числе для оценки состояния костного мозга после аллогенной ТГСК. [64,65,66]. Прогностическая значимость МОБ по данным цитометрии неоспорима даже несмотря на межлабораторные различия и особенности панелей антител [53,67,93,94,96-100,102-104,106,109-112,115]. Её клиническую ценность как показателя, позволяющего определить эффективность проведенной терапии в конкретном случае, трудно переоценить, это показано, в том числе, при оценке взаимосвязи проточно-цитометрического уровня МОБ с течением ОМЛ у детей [95,101,107,108,111,112].

При острых миелоидных лейкозах критерий проточно-цитометрического МОБ-статуса введен в рекомендации лишь недавно [55]. Однозначное определение МОБ-статуса при ОМЛ часто бывает более затруднительно, чем при остром лимфобластном лейкозе и В-клеточном хроническом лимфолейкозе; это объясняется высокой гетерогенностью иммунологических характеристик

бластных клеток при диагностике. Оценка минимальной остаточной болезни при ОМЛ может быть основана на одном из принципов: первый – поиск клеток с индивидуальным лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ), соответствующим иммунофенотипу при диагностике, а второй – метод «пустых мест», или подсчёт всех иммунологически отличных от нормы миелоидных клеток [55,68,69]. Применение первого принципа требует подробного изучения иммунофенотипа опухоли в дебюте болезни.

Опухолевые клетки при ОМЛ отличаются от нормальных миелоидных предшественников; данные отличия могут быть выявлены при помощи проточной цитометрии – при поиске признаков aberrантного иммунофенотипа. К ним относятся коэкспрессия антигенов, не свойственных миелоидной линии дифференцировки; отличная от свойственной нормальным миелобластам интенсивность экспрессии антигенов миелоидной линии; сочетание на опухолевых клетках антигенов ранних стадий дифференцировки с антигенами зрелых гранулоцитов. Примером первого вида aberrантности может являться коэкспрессия CD19. Экспрессия на миелобластах маркеров зрелых гранулоцитов, таких как CD11b, отсутствие CD34, HLA-DR является признаком aberrантности [176].

Современная проточная цитометрия дает возможность одновременно оценить до 8 и более антигенов на мембране и в цитоплазме нескольких миллионов клеток образца, что определяет высокую чувствительность метода, которая может составлять 10^{-5} и выше. При определении МОБ методом проточной цитометрии первый этап состоит в выделении ядросодержащих клеток костного мозга. Далее происходит инкубирование клеток с моноклональными антителами, специфичными к поверхностным/цитоплазматическим/ядерным антигенам. Антитела мечены различными флуорохромами. Когда флуоресцентно меченые клетки проходят через лазерный луч, флуоресцентные зонды возбуждаются, и происходит регистрация сигнала проточным цитометром. Важным свойством метода проточной цитометрии является высокая скорость измерения флуоресценции. Обнаружение испускаемого света и, в конечном счете,

определенных клеточных свойств, происходит со скоростью до 10000 событий в 1 секунду. Ограничениями определения МОБ методом проточной цитометрии являются невозможность выявления изменений иммунофенотипа опухолевых клеток на фоне лечения, наличие лейкозных клеток с иммунофенотипом, приближенным к нормальному иммунофенотипу клеток-предшественниц, неизбежная потеря клеток во время пробоподготовки. Также аспирация костного мозга зачастую сопровождается разбавлением образца периферической кровью, что может приводить к снижению процента популяции aberrantных опухолевых клеток. Данной проблемы можно избежать при тщательном соблюдении техники забора костного мозга; для проточно-цитометрических исследований используют первые 0,5-1 мл костномозговой взвеси, полученной при пункции [162].

Прогрессивные улучшения в технологии многоцветной проточной цитометрии и чувствительности реагентов позволяют в настоящий момент изучить до 20 и более антигенов клетки, что несравнимо с первыми сообщениями о МОБ при ОМЛ. Также выросло разрешение метода - количество детектируемых клеток костного мозга. Визуализация и анализ получаемых иммунофенотипических данных, возможно, скоро будут преобразованы - готовится внедрение автоматических аналитических алгоритмов, но в настоящий момент, выделение и подсчет лейкоэмических клеток среди массы клеток костного мозга, оцененных на проточном цитометре, по-прежнему осуществляется вручную по двум параметрам в двумерной системе координат с помощью множества последовательных выделений групп клеток. Оценка МОБ с помощью многоцветной проточной цитометрии уточняется в связи с увеличением количества флюорохромов, которые можно одновременно оценить на одной клетке, а также в связи с техническим усовершенствованием приборов; так, современные проточные цитометры позволяют оценивать от 6 до 16 цветов одновременно.

Таким образом, необходим набор антител, который учитывает сочетания маркеров aberrantного фенотипа, используемые для диагностики МОБ.

Исследования по изучению использования мембранных антигенов для

дифференцирования нормальных гемопоэтических клеток от лейкозных бластов продолжаются в течение десятилетий. В обзоре, опубликованном в 1973 г., Harris et al [70] описали возможные изменения сочетаний мембранных антигенов на клетках при острых лейкозах и описали попытки определения этих антигенов преимущественно с использованием антисывороток животного происхождения.

Исследование, проведенное Бейкером и др. в 1974 г. [71], показало: кроличья антисыворотка, которая не реагировала с нормальными клетками, активно связывалась с лейкозными бластными клетками пациентов с ОЛЛ и ОМЛ. Таким образом, было показано существование антигенных различий между лейкемическими и нормальными клетками. В 1975 году по результатам изучения этих данных M.Greaves, G.Janossy и соавт. [72,73,93] выдвинули гипотезу о том, что использование иммунофлуоресцентных реагентов и антител, направленных против антигенов, ассоциированных с лейкозными клетками, могут быть использованы для выявления остаточных количеств лейкозных клеток и, таким образом, прогнозировать наступление рецидива.

Последующие исследования не привели к определению специфичного для ОМЛ антигенного профиля; однако в течение двух десятилетий после публикации обзора Greaves и соавт., несколькими группами было продемонстрировано наличие aberrантных антигенов на мембране лейкемических клеток, которые могут быть использованы для выявления МОБ. Такие нарушения экспрессии антигенов носят название "лейкоз-ассоциированные иммунофенотипы" (ЛАИФ) и являются основой для иммунологической оценки МОБ.

San-Miguel и соавт. опубликовали обширный список возможных ЛАИФ и частоту их обнаружения [74,75]. Используя пятицветную проточную цитометрию, Al-Mawali и соавт [76,77] показали, что наиболее частыми видами ЛАИФ являются асинхронная экспрессия антигенов на определенных стадиях миелоидной дифференцировки, а также коэкспрессия лимфоидных маркеров на миелобластах.

Один из возможных подходов к определению МОБ основан на идентификации одного или нескольких ЛАИФ в исходном диагностическом

исследовании при ОМЛ с последующим построением индивидуальной для каждого пациента панели антител для оценки уровня МОБ. Далее при оценке эффекта лечения методом проточной цитометрии возможно отследить исчезновение либо персистенцию клеток с ЛАИФ и подсчитать их [113,76,98,171,173,175]. Этот метод показал свою эффективность в нескольких крупных исследованиях, однако он имеет некоторые ограничения.

В-первых, иммунологическая аберрантность лейкозных миелобластов не всегда сохраняется при рецидиве: этот феномен обозначается как «иммунологический сдвиг». Более чем у 91% пациентов при рецидиве изменяется экспрессия как минимум одного из антигенов по сравнению с первичной диагностикой [114]. Изменения чаще всего затрагивают нарастание интенсивности экспрессии миелоидных (CD13, CD33) и стволовыхклеточных (CD34, CD117) антигенов. По данным одного из исследований, у 98% пациентов иммунофенотип бластных клеток при рецидиве не совпадал с таковым при первичной диагностике [115]. Такие изменения могут быть связаны как с антигенной нестабильностью первичного лейкоэмического клона, так и с происхождением бластных клеток при рецидиве из малого субклона бластных клеток, который уже существовал при диагностике. Также не исключается возможность появления нового клона бластных клеток, полностью отличного от первичной популяции. В любом случае, «иммунофенотипический сдвиг» может являться причиной ложноотрицательных результатов в том случае, если при определении МОБ учитываются только данные ЛАИФ. Также, некоторые «ЛАИФ» могут в малых количествах присутствовать на клетках нормального костного мозга, а также на миелоидных предшественниках во время восстановления костного мозга под действием колониестимулирующих факторов [123,174,175,176]. Применение подхода, основанного на ЛАИФ, возможно только при наличии данных первичного иммунофенотипа.

Таким образом, ЛАИФ является важным, но недостаточным компонентом определения МОБ методом проточной цитометрии, и для более достоверного выявления остаточной опухоли важно использовать не только данные первичного

иммунофенотипа, но и более расширенную панель антител для выявления всех отличных от нормы популяций миелоидных клеток. Такой подход называется «методом пустых мест». Метод основан на принципе построения нормального гемопоэза: поэтапная экспрессия генов, регулирующих созревание и дифференцировку клеток-предшественников, отражается в известных и предсказуемых изменениях экспрессии антигенов на поверхности гемопоэтических клеток. С помощью многоцветной проточной цитометрии возможно отследить все этапы миелоидной дифференцировки. Например, процесс созревания миелобластов в норме характеризуется постепенным снижением экспрессии CD33 и CD13. Опухолевые бластные клетки с гиперэкспрессией или сниженной экспрессией CD33 и CD13 формируют кластеры, которые выходят за пределы диапазона нормальной экспрессии этих антигенов, что позволяет выявить и подсчитать такие клетки. На основе использования такого метода была показана корреляция между уровнем МОБ, риском рецидива и длительностью выживаемости при детском ОМЛ.

В настоящее время опубликованы несколько работ по определению МОБ методом проточной цитометрии, в каждой из которых представлены стандартизованные панели антител: некоторые панели составлены с учётом только «метода пустых мест», в других используется сочетание этого метода с подходом, основанным на первичном ЛАИФ. На настоящий момент в отечественной литературе подобные публикации отсутствуют.

Степень чувствительности измерения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии зависит от трёх главных факторов:

- 1) принятое в качестве константы минимально определяемое количество клеток с аберрантным иммунофенотипом, при обнаружении которого МОБ-статус пациента считается позитивным;
- 2) количество учтенных на проточном цитометре событий;
- 3) специфичность выделенного при диагностике ЛАИФ и характеристики выбранной панели антител.

Существует также метод определения МОБ в костном мозге с помощью

детекции лейкемических стволовых клеток (ЛСК) с иммунофенотипом CD34+CD38-. Это клетки, которые, по данным некоторых работ, способны инициировать рецидив ОМЛ и являются резистентными к химиотерапии. Несколькими группами исследователей было показано, что количество лейкемических стволовых клеток уже при диагностике коррелирует с выживаемостью пациентов с ОМЛ [78-80,105,106,118,175], а повышенные уровни ЛСК на фоне клинико-гематологической ремиссии ассоциируются с ухудшением выживаемости. Были представлены широкие панели антител, созданные на основе CD34+CD38- сочетания для оценки различных субпопуляций ЛСК; также ввиду крайне малого количества ЛСК в костном мозге для их подсчёта применяются особые протоколы анализа с оценкой большого количества событий. Такой подход к оценке эффекта лечения неприменим в случае CD34-негативного иммунофенотипа ОМЛ; кроме того, иммунофенотип ЛСК может изменяться в процессе лечения [175].

В заключение можно сделать вывод о том, что для полноценного внедрения в практику определения МОБ при ОМЛ методом проточной цитометрии необходимо формирование протоколов выполнения исследования, учитывающих минимальную популяцию aberrantных клеток, минимальное общее количество событий, необходимого для определения МОБ-статуса, и максимально подробную и стандартизованную характеристику иммунофенотипа опухоли при первичной диагностике для обеспечения возможности использования этих данных для последующего определения МОБ, в том числе и в других лабораториях.

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе проанализированы данные 137 детей, больных острым миелоидным лейкозом (60 девочек и 77 мальчиков) в возрасте от 3 месяцев до 17 лет (медиана возраста – 7,0 лет), и ребёнок 16 лет, у которого была диагностирована опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток. Диагноз устанавливали на основании клинико-гематологических показателей, морфологического, цитохимического и иммунофенотипического исследований костного мозга, большинству больных (74,1%) выполнялись цитогенетическое и молекулярное исследования. Иммунофенотипирование всех пациентов при установлении диагноза проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза отдела клинико-лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Пациенты получали лечение в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по протоколам и в ГБУЗ «Морозовской детской клинической больнице Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 1991 г. по 2021 г. Пациенты с промиелоцитарным лейкозом в настоящее исследование не были включены.

Морфологическое и цитохимическое исследования аспиратов костного мозга больных отделения химиотерапии гемобластозов НИИ ДОГ проводилось в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Препараты костного мозга окрашивались по методике Романовского-Гимза. Сухие мазки фиксировались в растворе фиксатора Май-Грюнвальда, промывались дистиллированной водой, затем погружались в рабочий раствор готового красителя Романовского-Гимза. Далее препараты снова промывались дистиллированной водой и высушивались. Подсчёт миелограммы производился двумя врачами, по 250 клеток каждым (в каждом случае подсчитывалось от 200 до 500 миелокариоцитов). Количественные показатели миелограммы оценивались в соответствии с нормативными [149]. Цитохимические исследования, выполнявшиеся каждому пациенту при

диагностике, включали определение в опухолевых клетках миелопероксидазы, липидов, PAS-положительного вещества и альфа-нафтилацетатэстеразы (а-НАЭ) с ингибированием фторидом натрия.

Распределение ФАБ-вариантов ОМЛ в анализируемой группе отражено в таблице 5, из которой видно, что наиболее частыми были варианты М1, М2, М4.

Таблица 5 – Распределение ФАБ-вариантов ОМЛ в анализируемой группе больных

| ФАБ-вариант ОМЛ | Число больных | % |
|------------------------|----------------------|----------|
| М0 | 10 | 7,2 |
| М1 | 26 | 18,9 |
| М2 | 44 | 32,1 |
| М4 | 22 | 16,0 |
| М5 | 15 | 10,9 |
| М6 | 2 | 1,4 |
| М7 | 18 | 13,1 |
| Итого | 137 | 100 |

Иммунофенотипирование клеток костного мозга выполнялось методом 3-8 цветной проточной цитометрии на приборах BD FACS CANTO II и FACScan (Becton Dickinson). В последние годы диагностические подходы базировались на 8-цветной концепции Еврофлоу, которая включает в себя определение принадлежности лейкоза к той или иной линии гемопоэза с помощью ориентационной пробы ALOT (Таблица 2) и анализ бластных клеток согласно их линейной принадлежности (Таблица 3).

Клетки костного мозга инкубировали с мечеными флуорохромами антителами (Таблица 6), затем отмывали фосфатно-солевым буфером. Результаты реакции оценивались при помощи программы FCS Express V3.

Таблица 6 – Моноклональные антитела, применявшиеся при диагностике ОМЛ

| Флуорохром | Моноклональные антитела |
|-----------------------|---|
| FITC | cyMPO, HLADR, CD35, CD36, nuTdT, CD15, CD42a+CD61, CD41, CD117, CD22, CD7, CD16, CD22, CD61, CD3, CD5, CD38 |
| PE | cyCD79 α , CD7, CD13, CD64, CD105, CD56, CD33, CD117, CD25, NG2, CD34, CD19, CD10, CD3, CD203c, GlyA |
| PE-Cy5 | CD34, CD45, CD38 |
| PE-Cy7 | CD19, CD117, CD56 |
| APC | CD3, CD11b, CD300, CD33, CD7, CD123, CD42b, CD22, CD10 |
| APCH7 | CD19, CD10, CD14, CD71, CD38, CD9, CD4, CD3 |
| Pacific Blue (V450) | cyCD3, CD16, HLADR, CD9, CD20 |
| Pacific Orange (V500) | CD45, CD38 |

При проведении диагностического иммунофенотипирования гейт бластных клеток формировался на основании сочетания параметров бокового светорассеяния и низкой/промежуточной экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45. Далее производилась оценка экспрессии мембранных и цитоплазматических антигенов на бластных клетках: популяцию считали позитивной по тому или иному антигену, если 20% и более клеток экспрессировали исследуемый антиген.

Лечение осуществлялось по протоколам AML BFM 87, AML BFM 2004, НИИ ДОГ ОМЛ 2002, НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012.

Минимальная остаточная болезнь проанализирована у 28 пациентов – 12 мальчиков и 16 девочек в возрасте 5 месяцев – 17 лет (медиана возраста – 5,0 лет).

Все дети получали лечение в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и в «Морозовской ДГКБ по поводу впервые выявленного острого миелоидного лейкоза по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012.

У 2 пациентов был синдром Дауна. У 2 пациенток острый миелоидный лейкоз был связан с предшествующей химиотерапией по поводу других злокачественных новообразований: первый диагноз пациентки 10 лет – нефробластома T2N0M0, первый диагноз пациентки 6 лет – мелкокруглоклеточная саркома с поражением задних отростков X, XI ребер и плевры справа, задних отделов левой орбиты. 6 детей анализируемой группы перенесли аллогенную трансплантацию. У всех пациентов группы на момент определения минимальной остаточной болезни была достигнута костномозговая ремиссия (бластные клетки менее 5% при подсчёте не менее 200 миелокариоцитов); в то же время у части больных наблюдалось неполное восстановление показателей крови (нейтропения $<1 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитопения $<100 \times 10^9/\text{л}$). Большинству пациентов группы уровень МОБ оценивался перед началом 2 курса химиотерапии с эпигенетическими препаратами, у 5 пациентов МОБ оценивалась в более поздние сроки.

При определении минимальной остаточной болезни панель антител составлялась индивидуально для каждого случая согласно первичному иммунофенотипу бластных клеток пациента. Анализировались 2 миллиона событий. Путем последовательного гейтирования выделялась малая популяция клеток с иммунологической аберрантностью, соответствующей таковой при первичном исследовании. Оценка МОБ-статуса в работе производилась относительно величины 0,1% от миелокариоцитов (при количестве аберрантных миелоидных клеток более 0,1% от миелокариоцитов – МОБ-позитивный статус), что соответствует стратегии большинства исследовательских групп [101,107,111,150,175].

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки результатов применяли программу «IBM

SPSS Statistics 21». Оценка функции выживаемости пациентов проводилась с помощью метода Каплана-Мейера. Статистическая значимость различий кривых выживаемости проводилось методами лог-ранк, бреслоу, тарон-уоре. Сравнение данных двух независимых групп проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона. Разница считалась значимой при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Острые миелоидные лейкозы, как мы уже отмечали, это чрезвычайно гетерогенная группа заболеваний. Даже в соответствии с морфо-цитохимической классификацией ФАБ выделяется 8 вариантов ОМЛ. Дальнейшую гетерогенность документируют по наличию иммунофенотипических особенностей и хромосомных aberrаций.

Минимальная остаточная болезнь проанализирована у 28 пациентов – 12 мальчиков и 16 девочек в возрасте 5 месяцев – 17 лет (медиана возраста – 5,0 лет). Все дети получали лечение по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012. Аллогенная трансплантация была выполнена 6 детям анализируемой группы. Распределение ФАБ-вариантов ОМЛ отражено в таблице 7.

Таблица 7 – Варианты ОМЛ по ФАБ-классификации в группе определения МОБ

| ФАБ-вариант ОМЛ | Число больных | % |
|------------------------|--------------------------|----------|
| М0 | 5 | 17,9 |
| М1 | 5 | 17,9 |
| М2 | 6 | 21,4 |
| М4 | 4 | 14,3 |
| М5 | 0 | 0 |
| М6 | 1 | 3,6 |
| М7 | 7 | 25,0 |
| Итого | 28 | 100 |

В таблице 8 представлены особенности иммунофенотипа, в том числе признаки aberrантности, на которых в дальнейшем базировалось определение МОБ.

Таблица 8 – Выявленные aberrантности иммунофенотипа

| № | Пациент | Аберрантность опухолевых клеток |
|----|----------------------|---|
| 1 | Ю.А.С. | Коэкспрессия CD7, CD64, отсутствие CD34, CD117 |
| 2 | А.Н. | Коэкспрессия CD56 почти на всех бластах |
| 3 | Б.Н.А. синдром Дауна | Сниженная экспрессия CD13, отсутствие CD34 |
| 4 | Б. | Коэкспрессия CD71, CD15 |
| 5 | Б.К. | Коэкспрессия CD19 |
| 6 | Д.Д.А | Коэкспрессия CD7, CD64, отсутствие CD34 |
| 7 | Д.Е. | Коэкспрессия CD79 α , отсутствие CD13 |
| 8 | Д.Я. | Коэкспрессия CD71, CD15, CD123, отсутствие CD33 |
| 9 | Е.В. | Коэкспрессия CD64 |
| 10 | И.Т.А. синдром Дауна | Коэкспрессия CD7, CD35, CD71 |
| 11 | И.Д. | Коэкспрессия CD7, отсутствие CD13 и CD34 |
| 12 | К.С.П. | отсутствие CD13 и CD34 |
| 13 | К.И. | Коэкспрессия CD11b, CD64, отсутствие CD117 |
| 14 | К.Г.А. | Коэкспрессия CD7, отсутствие CD117, CD34 |
| 15 | К. | Отсутствие HLA-DR |
| 16 | К.А.Г. | Коэкспрессия CD7, CD300, CD11b, CD123, отсутствие CD13 и CD33 |
| 17 | К.В. вторичный ОМЛ | Отсутствие CD33 |
| 18 | Л.Д. | Коэкспрессия CD123, отсутствие CD34 |
| 19 | М.Т.Е. вторичный ОМЛ | Коэкспрессия CD7 |
| 20 | М.Т.Т. | Коэкспрессия CD7, отсутствие CD13 |
| 21 | О.А.А. | Коэкспрессия CD64 |
| 22 | С.В. | Коэкспрессия CD79 α , CD16, CD64, CD35, CD56, CD15 |
| 23 | С.Д.Я. | Коэкспрессия CD7, отсутствие CD117, CD34 |
| 24 | С. Н. | Коэкспрессия CD7 |
| 25 | Ф.А. | Коэкспрессия CD64, слабая экспрессия CD34 |
| 26 | Ф.Д.А. | Коэкспрессия CD71 |
| 27 | Ш.Ю. | Отсутствие HLA-DR, CD34, CD13 |
| 28 | Э. | Отсутствие CD34 |

Таким образом, в каждом случае отмечалась aberrантность иммунофенотипа, позволившая разграничить нормальные миелоидные предшественники от опухолевых. Ещё раз отметим разнообразие иммунофенотипов, которое не позволяет выработать единый подход к диагностике МОБ.

3.1 Диагностика МОБ при коэкспрессии CD7, CD56, CD64

Больная С.Н. (№24, Таблица 8), 15 лет. Морфологически бластные клетки составили 62,6%, они представлены крупными клетками с умеренным ядерно-цитоплазматическим соотношением, округлыми ядрами, выраженной базофилией цитоплазмы, в единичных бластах содержалась вакуолизация; часть из них имела отростчатую цитоплазму в виде «ушек». Единичные бластные клетки содержали зернистость и палочки Ауэра. Эритроидный росток составлял 32,8% (много молодых форм). Цитохимическое исследование: миелопероксидаза содержалась в 62,0% бластных клеток; липиды - в 43,0% бластных клеток; гликоген в большинстве бластов в диффузном и диффузно-гранулярном виде; неспецифическая эстераза - в части бластных клеток на (+), не гасится NaF. По морфоцитохимическим данным картина костного мозга более всего соответствовала острому нелимфобластному лейкозу, в первую очередь - острому эритромиелозу (ОМЛ М6а вариант).

При диагностике лейкоза использовали следующую панель моноклональных антител (Таблица 9).

Первая проба, которая практически соответствовала ориентационной по терминологии Еврофлоу, указывала на наличие у пациентки острого миелоидного лейкоза - отсутствовали лимфоидные антигены (CD19, су-CD3, CD10), имела место положительная реакция на миелопероксидазу, антигены CD34 и CD117.

Дальнейший анализ подтвердил наличие у больной ОМЛ. Установлена экспрессия общемиелоидных маркеров CD13, CD33.

На бластных клетках отсутствовала экспрессия FcγR3-рецептора (CD16). Отсутствовали признаки мегакариоцитарной направленности дифференцировки – CD61, CD41, CD42b. У больной был исключен лейкоз из предшественников

плазмоцитоидных дендритных клеток на основании отсутствия CD123 и CD56.

Таблица 9 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике варианта ОМЛ у больной С.Н.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
| 1 | HLA-DR 57,9 | CD45 слабо | MPO 34,5 | CD19 0,3 | CD34 58,1 | cy-CD3 0,1 | CD117 88,6 | CD10 0,1 |
| 2 | CD45 | н.о.* | CD61 0,0 | CD13 37,8 | CD34 | н.о. | CD123 0,0 | CD71 0,0 |
| 3 | CD45 | н.о. | CD41 0,1 | CD33 91,0 | CD34 | н.о. | CD42b 0,3 | CD9 91,0 |
| 4 | CD45 | н.о. | CD16 0,4 | CD7 84,9 | н.о. | CD56 0,0 | н.о. | н.о. |
| 5 | CD45 | н.о. | CD36 51,2 | CD105 35,0 | н.о. | н.о. | н.о. | н.о. |

*н.о. – не определяли

Особенностью панели антител для диагностики острых эритробластных лейкозов, предложенной консорциумом Еврофлоу, является отсутствие в ней гликофорина А (это сделано для исключения реакции с эритроцитами, которые могут контаминировать пробу). В соответствии с критериями Еврофлоу у больной можно было заподозрить эритробластный вариант (М6 ОМЛ) – экспрессия CD36 и CD105. Единственное, что противоречило (но не исключало на 100%) вариант М6, было отсутствие экспрессии трансферринового рецептора CD71. На бластных

клетках присутствовала выраженная экспрессия Т-линейного антигена CD7 (84,9%) в сочетании с нелинейным антигеном CD9.

В диагностической панели моноклональных антител не были использованы таковые к моноцитарным антигенам. Вместе с тем, принадлежность клеток к монобластам или миеломонобластам была исключена на основании отрицательной цитохимической реакции с неспецифической эстеразой.

Таким образом, на основании данных цитохимии и иммунофенотипирования установлен эритроидный вариант ОМЛ – эритроидный лейкоз. Особенностью случая явилась экспрессия лимфоидно-ассоциированного антигена CD7.

На рисунке 1 представлена экспрессия CD7 на бластных клетках, которая по уровню интенсивности соответствует таковой на лимфоцитах.

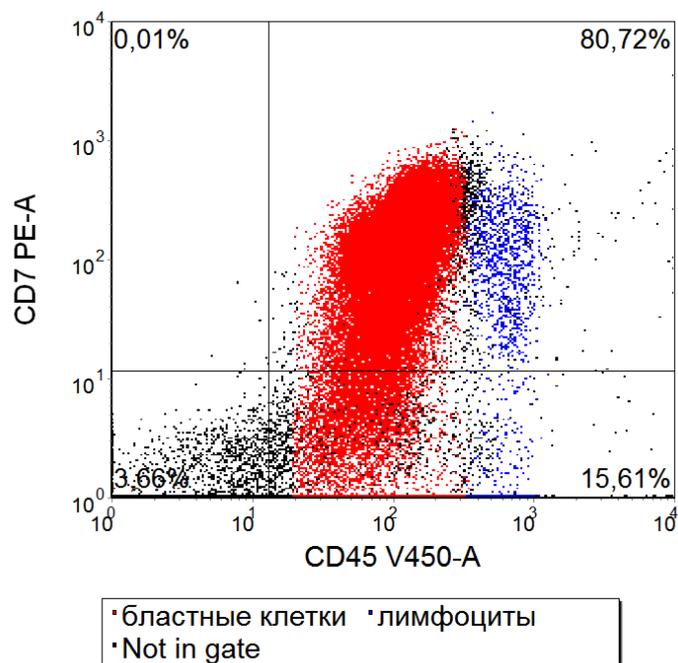


Рисунок 1 – Экспрессия антигена CD7 на бластных клетках больной С.Н. (бласты – красный цвет – выделены на основании CD45^{low} /SSC; лимфоциты – синий цвет – выделены на основании CD45^{high} /SSC)

Несмотря на высокий уровень экспрессии CD7, специфический Т-клеточный антиген суCD3 отсутствовал на бластных клетках (Рисунок 2).

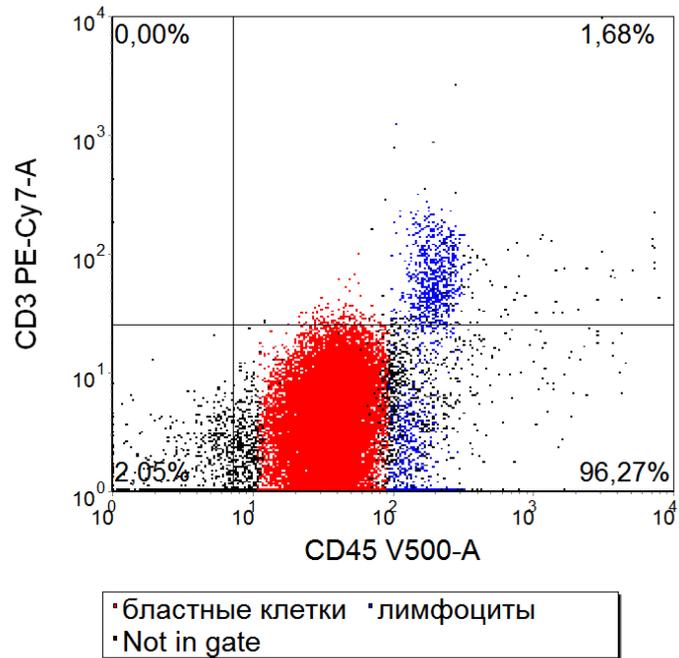


Рисунок 2 – Экспрессия цитоплазматического CD3 присутствует на лимфоцитах (выделены синим на основании $CD45^{high}$ /SSC) и отсутствует на бластных клетках (выделены красным)

Интересной особенностью данного случая явилась экспрессия условно эритроидных антигенов CD36, CD105 на бластных клетках (Рисунок 3).

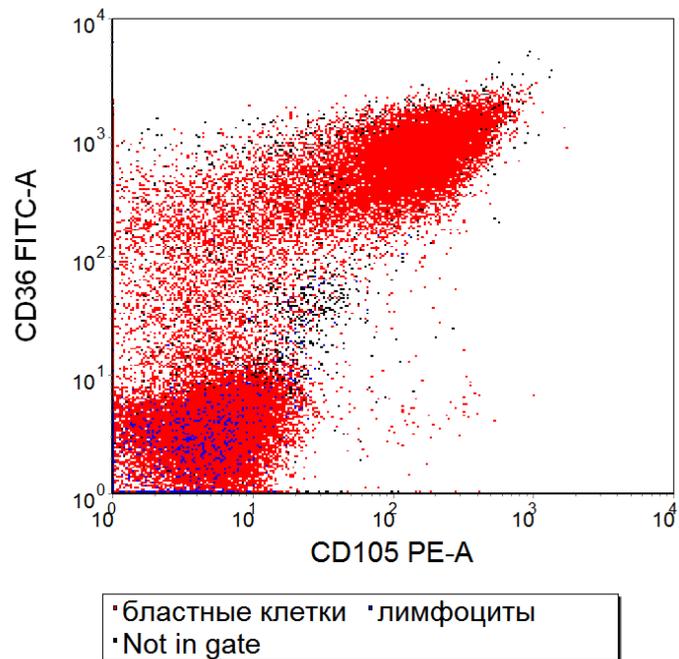


Рисунок 3 – Экспрессия CD36 и CD105 на бластных клетках (выделены красным) и отсутствие на лимфоцитах (выделены синим)

Обратимся к диагностике минимальной остаточной болезни у данной больной. Этот анализ был проведен многократно, первый раз – на 46-й день от начала блока НАМ с дакогеном. По данным морфологического исследования пунктат костного мозга был гипоклеточным (возможно, несколько разбавленным периферической кровью), бластные клетки не определялись (0%), лимфоциты - 31,2%, гранулоцитарный росток снижен (45,2%), представлен, в основном, зрелыми формами (44,8%), умеренно выражена моноцитарная реакция (14,4%), эритроидный росток снижен (9,2%), мегакарициты единичные.

Данные иммунологической оценки МОБ суммированы на рисунке 4.

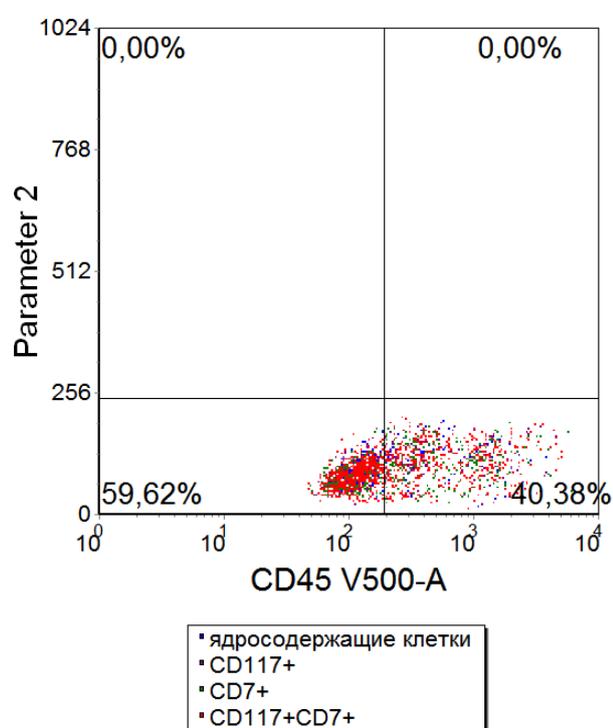


Рисунок 4 – представлены миелоидные CD117+ клетки с коэкспрессией CD7 (красный цвет); они составили 0,63% среди миелокариоцитов, большинство их слабо экспрессируют CD45

Больная Ю.А.С. (№1, Таблица 8), 15 лет. В миелограмме при диагностик бластные клетки составили 95,9%. Они были представлены клетками крупного и среднего размера с умеренным ядерно-цитоплазматическим соотношением, ядрами округлой и, в части бластов – неправильной формы; умеренной базофилией цитоплазмы. Единичные бластные клетки содержали зернистость.

Цитохимические реакции: миелопероксидаза содержалась в части бластных клеток; липиды - в большинстве бластных клеток; PAS реакция в части бластных клеток - в диффузном виде; неспецифическая эстераза - в единичных бластных клетках на (+). По морфоцитохимическим данным картина костного мозга соответствовала острому миелобластному лейкозу без созревания - ОМЛ М1 варианту по FAB-классификации.

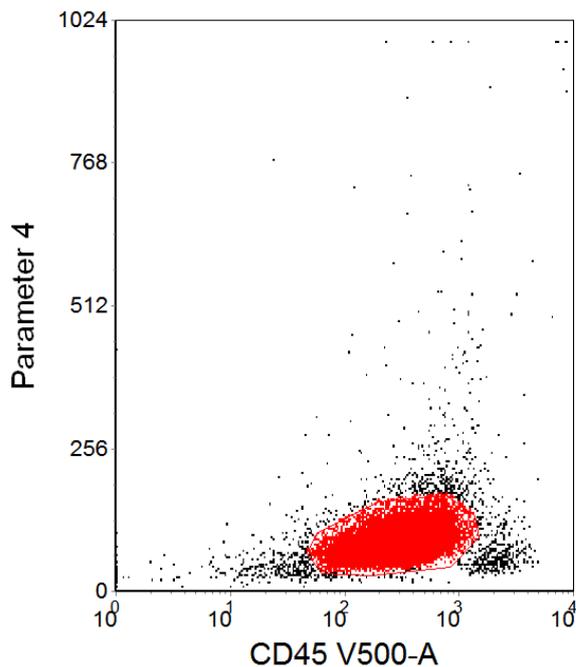
При иммунофенотипировании использовали следующую панель моноклональных антител (Таблица 10).

Таблица 10 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике ОМЛ у больной Ю.А.С.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | |
|---------|-------------------------------|------|------------------|--------------|----------------|---------------|--------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-cy5 | APC | APC-H7 |
| 1 | н.о. | CD45 | CD117 66,0 | CD13 22,1 | CD34 0,4 | CD10 0,5 | CD3 |
| 2 | CD9 39,6 | CD45 | н.о. | CD64 87,2 | н.о. | CD300 16,3 | н.о. |
| 3 | н.о. | CD45 | CD36 24,4 | CD33 97,7 | HLA-DR 35,5 | CD14 1,4 | н.о. |
| 4 | н.о. | CD45 | CD42+CD61 1,8 | CD38 48,1 | CD34 | CD123 55,1 | н.о. |
| 5 | н.о. | CD45 | CD7 82,7 | CD19 0,1 | н.о. | н.о. | н.о. |
| 6 | cyCD3 1,1 | CD45 | TdT 0,1 | sCD3 0,3 | н.о. | н.о. | н.о. |

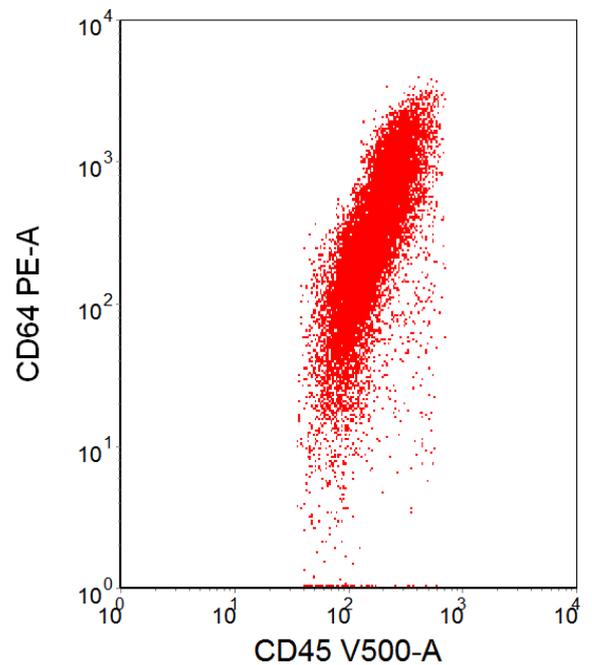
Использованное сочетание антител позволило установить миелоидную направленность лейкоза (экспрессия CD117, CD33 и CD13, в отсутствие CD3 и CD19). Данные цитохимических реакций (наличие миелопероксидазы и липидов в большинстве бластов, диффузная форма распределения PAS-положительного вещества), а также отсутствие антигенов CD42a и CD61 позволило исключить

мегакариоцитарную и эритроидную направленности дифференцировки, а отсутствие в бластных клетках неспецифической эстеразы позволило исключить миеломоноцитарный лейкоз. Особенностью случая является отсутствие экспрессии стволовклеточного антигена CD34, экспрессия HLA-DR лишь на часть бластов, коэкспрессия на бластных клетках (CD45^{low}SSC^{low}) моноцитарного антигена CD64 и Т-линейного антигена CD7 (Рисунок 5).



• бластные клетки • Not in gate

А



• бластные клетки

Б

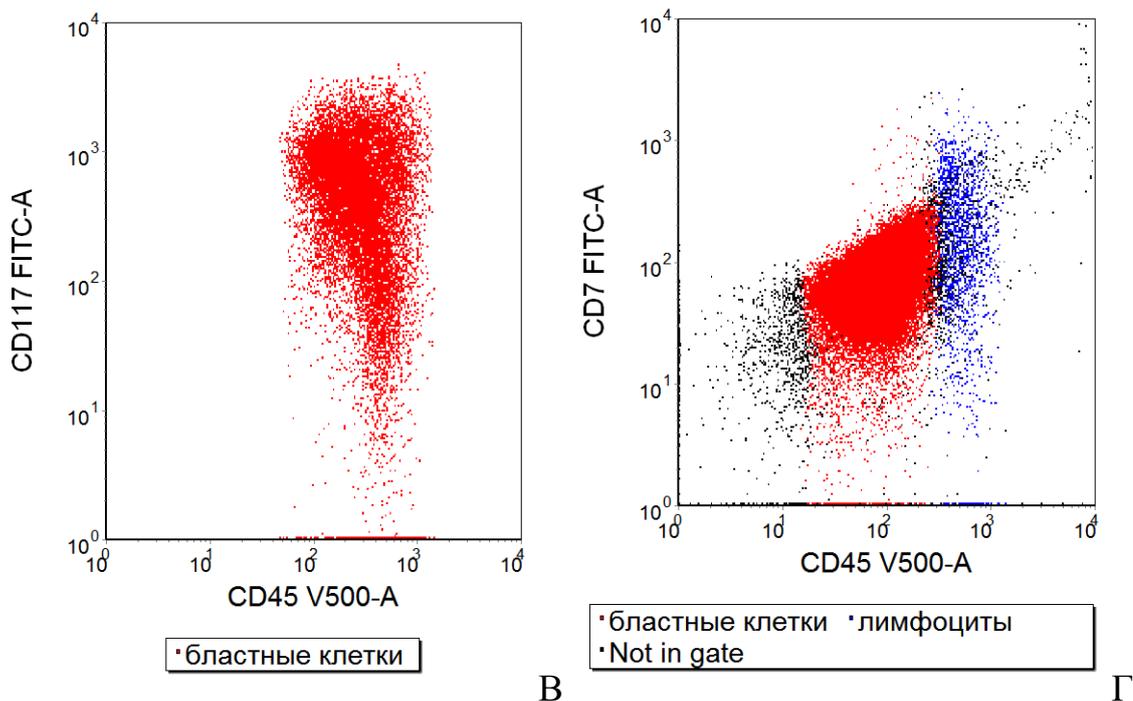
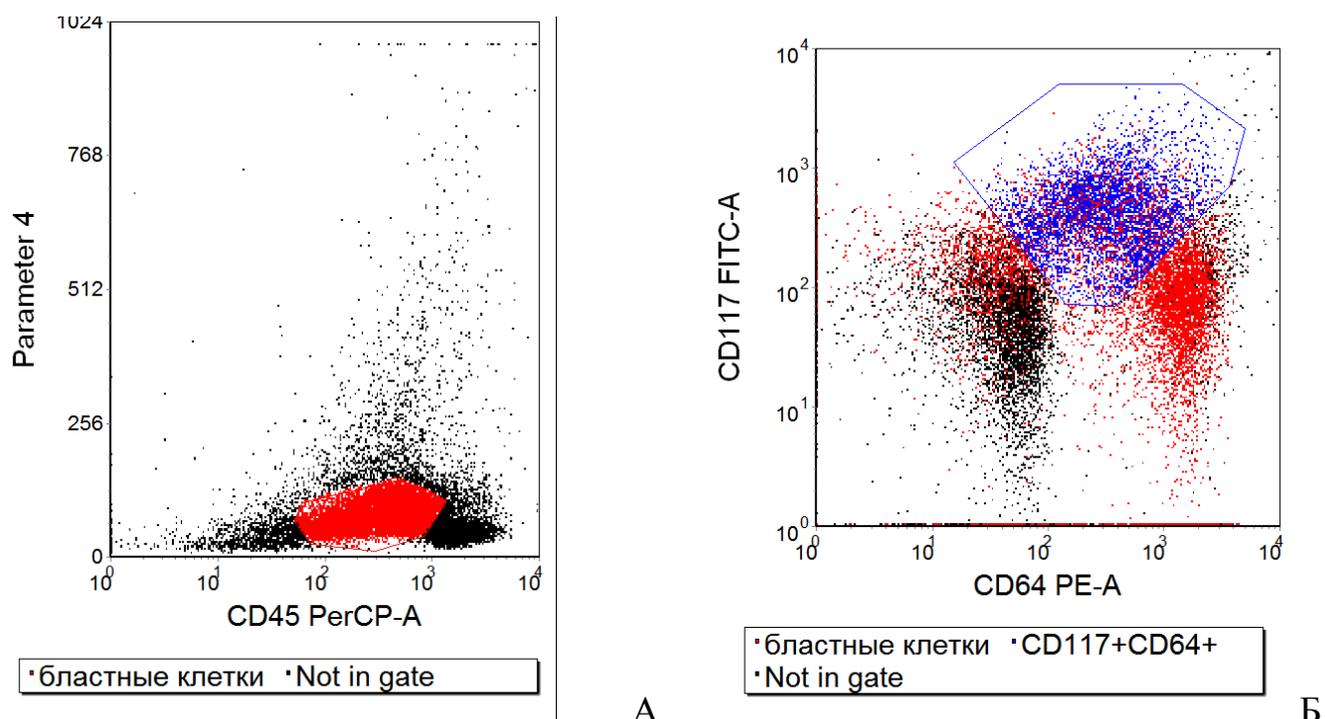


Рисунок 5 – Гейт бластных клеток (выделен красным цветом, А) и экспрессия на них CD64 (Б), CD117 (В) и CD7 (Г)

По окончании 1 курса индукции ремиссии в костном мозге оставалось 32% бластов, таким образом, ремиссия не была достигнута. Данные проточной цитометрии подтверждали наличие бластов с aberrantными сочетаниями антигенов (Рисунок 6).



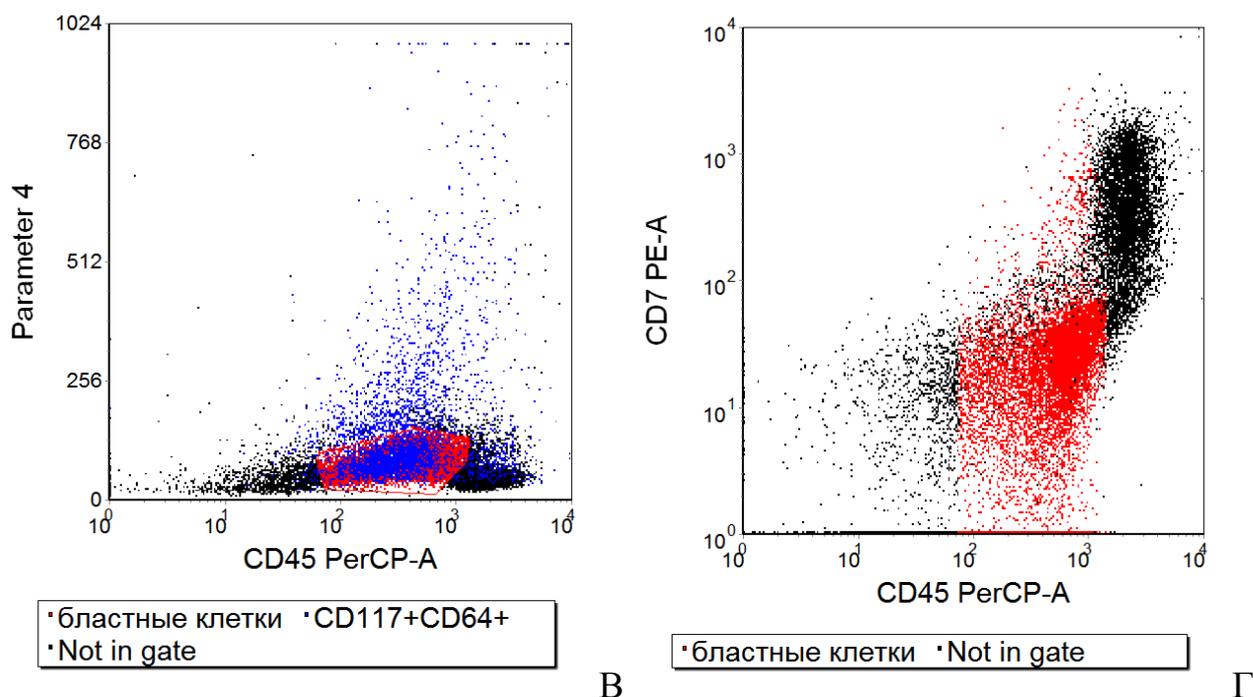


Рисунок 6 – На первом этапе анализа показана экспрессия CD45 (А), затем выделены клетки с коэкспрессией CD64 и CD117 (синий цвет), которые составили около 24%; в то же время коэкспрессия CD7 на CD45^{low} клетках практически отсутствует (Г)

После 2 курса индукции была оценена минимальная остаточная болезнь. В день исследования МОБ по данным общего анализа крови лейкоциты составили $4,94 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы $3,04 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобин 8,6 г/дл, тромбоциты $131 \times 10^9/\text{л}$. Пунктат костного мозга характеризовался гипоклеточностью. Бластные клетки составили 1,6%, снижено количество лимфоцитов (5,4%). Гранулоцитарный росток увеличен (70,0%), преобладают зрелые формы (51,4%). Умеренно выражена моноцитарная реакция (9,4%). Эритроидный росток сужен (13,4%). Мегакариоциты в достаточном количестве, в основном зрелые и малоактивные.

Таким образом, достигнута клиничко-гематологическая ремиссия. Иммунологически оценены антигены, которые были экспрессированы при первичной диагностике (Рисунок 7).

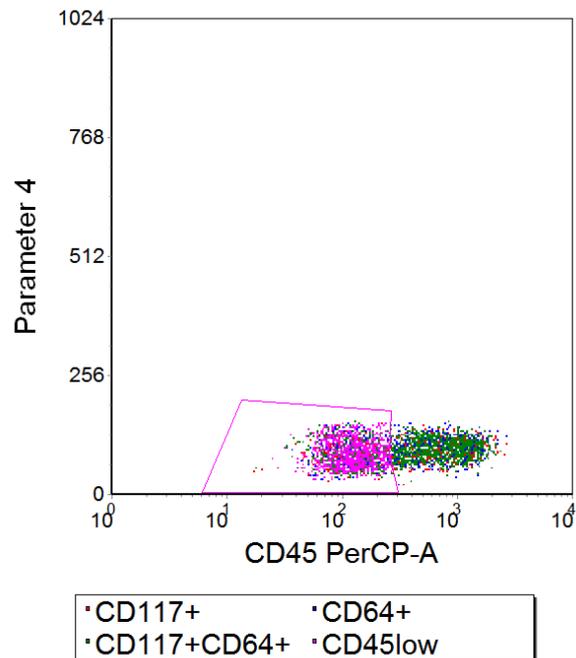


Рисунок 7 – Бластные клетки с экспрессией CD117, CD64 и слабой экспрессией CD45 (выделены розовым цветом)

Миелоидные клетки CD117+ с коэкспрессией моноцитарного антигена CD64, слабо экспрессирующие CD45, составили 0,64% от миелокариоцитов. Данный процент соответствует МОБ-положительному статусу. В дальнейшем пациентке была выполнена аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Пациент М.Т.Т. (№20, Таблица 8), 9 лет. При диагностике пунктат костного мозга средноклеточный. Бластные клетки составили 56,6%, они были представлены клетками крупного и среднего размеров, имели высокое и умеренное ядерно-цитоплазматическое соотношение, ядра округлой формы с выраженными нуклеолами, цитоплазма слабо-базофильная, в части бластов она содержала зернистость, в единичных – палочки Ауэра. Гранулоцитарный росток составляет 21,8%. Цитохимические реакции: пероксидаза и липиды содержались в большинстве бластных клеток; гликоген в части бластных клеток - в диффузном виде; неспецифическая эстераза – реакция отрицательна. По морфоцитохимическим данным картина костного мозга соответствует острому миелобластному лейкозу с созреванием – варианту ОМЛ М2. Иммунофенотипирование при диагностике проведено с использованием панели

моноклональных антител, рекомендованной консорциумом Еврофлоу (Таблица 11).

Таблица 11 – 8-цветные панели моноклональных антител, использованные при диагностике варианта острого лейкоза у больного М.Т.Т.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|------|-----------------------|------------------------|--------------|----------------|---------------|--------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-cy5 | PE-cy7 | APC | APCH7 |
| 1 | cyCD3 0,5 | CD45 | cyMPO 96,2 | cyCD79 α 0,2 | CD34 70,2 | н.о. | CD7 57,8 | sCD3 0,8 |
| 2 | CD16 0,0 | CD45 | CD117 98,5 | CD13 0,4 | CD34 | HLA-DR 68,3 | CD11b 13,3 | CD10 0,4 |
| 3 | н.о. | CD45 | CD35 1,1 | CD64 5,1 | CD34 | HLA- DR | CD300e 0,7 | CD14 0,1 |
| 4 | н.о. | CD45 | CD36 4,5 | CD105 2,9 | CD34 | HLA-DR | CD33 97,4 | CD71 12,9 |
| 5 | н.о. | CD45 | н.о. | CD56 18,9 | CD34 | HLA-DR | CD7 64,9 | CD19 0,1 |
| 6 | н.о. | CD45 | CD15 1,7 | NG2 0,4 | CD34 | HLA-DR | н.о. | CD38 98,4 |
| 7 | н.о. | CD45 | CD42a+ CD61 0,1 | CD203c 0,2 | CD34 | HLA-DR | CD123 30,3 | CD4 0,5 |
| 8 | н.о. | CD45 | CD41 0,0 | CD25 0,1 | CD34 | HLA-DR | CD42b 3,3 | CD9 12,7 |

Оценка МОБ производилась многократно; впервые – перед началом 2 курса химиотерапии, на 42-й день от установления диагноза. Морфологическое исследование костного мозга на эту дату: пунктат костного мозга крайне бедный,

подсчитано 100 клеток. Бластные клетки составляли - 2,0%, лимфоциты - 77,0%. Гранулоцитарный росток редуцирован (10,0%). Эритроидный росток значительно уменьшен - 7,0%. Количество мегакариоцитов снижено, встречаются скопления тромбоцитов. В общем анализе крови лейкоциты составляли $0,55 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобин 9,8 г/дл, тромбоциты $253 \times 10^9/\text{л}$.

Оценка МОБ включала две пробирки (Таблица 12).

Таблица 12 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике МОБ у пациента М.Т.Т.

| № пробы | Флуорохромы, антитела | | | | | |
|---------|-----------------------|------|-------|------|--------|------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-cy5 | APC |
| 1 | Syto41 | CD45 | CD7 | CD13 | CD34 | CD33 |
| 2 | Syto41 | CD45 | CD117 | | | CD7 |

При анализе 1 пробы миелоидные предшественники CD33+CD34+CD45^{low} с коэкспрессией CD7 составили 0,64% от ядросодержащих клеток (Рисунок 8).

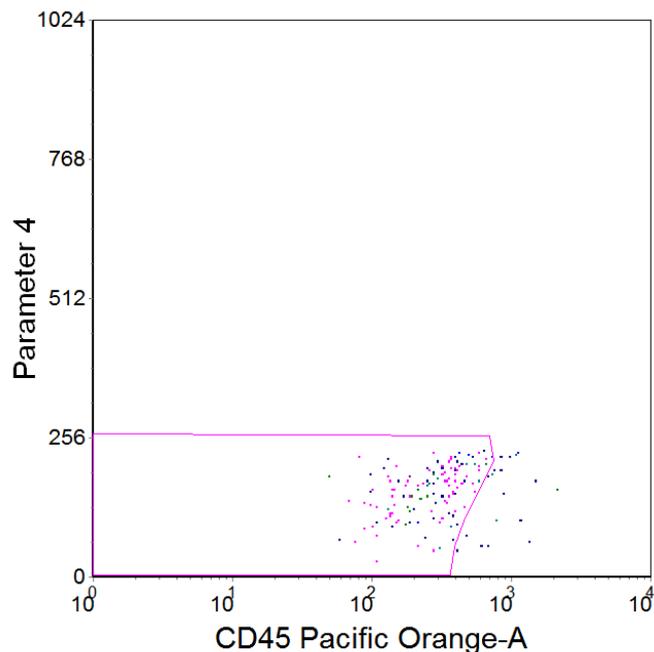


Рисунок 8 – Миелоидные предшественники CD33+CD34+ с коэкспрессией CD7 и слабой экспрессией CD45 (выделены розовым цветом)

При анализе второй пробы миелоидные клетки CD117+, слабо

экспрессирующие CD45 и коэкспрессирующие CD7, составили 0,78% от ядродержащих клеток образца костного мозга (Рисунок 9).

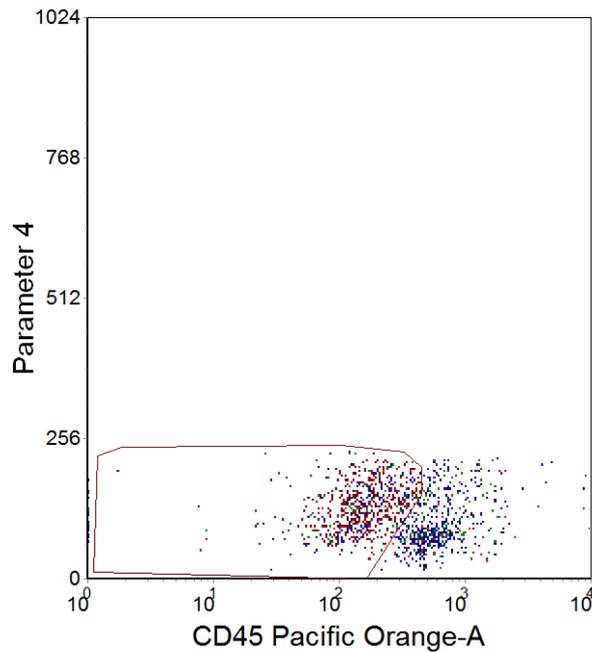


Рисунок 9 – Миелоидные предшественники с коэкспрессией CD7 и слабой экспрессией CD45 (выделены коричневым цветом)

Таким образом, aberrантные миелоидные предшественники составили более 0,1%, что соответствует МОБ-положительному статусу. В дальнейшем пациенту была выполнена аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Пациентка М.Т.Е. (№19, Таблица 8), 6 лет. Диагноз: Мелкокруглоклеточная саркома с поражением задних отрестков X, XI ребер и плевры справа, задних отделов левой орбиты. Состояние после комплексного лечения. Ремиссия I. Вторая опухоль: острый миелобластный лейкоз, M0 вариант с минимальной дифференцировкой. При диагностике костный мозг клеточный; бластные клетки составили 68,8%. Они представлены крупными клетками с умеренным ядерно-цитоплазматическим соотношением, округлыми ядрами, умеренной базофилией цитоплазмы, в единичных бластах содержалась вакуолизация, в части – зернистость. Цитохимические реакции: миелопероксидаза и липиды содержались в единичных бластах; PAS реакция - негативная; НЭ содержалась в гранулярном

виде в 52,0% бластов на (+) и (++), не гасится NaF (48,0%). Бласты не имели морфологических признаков дифференцировки. По морфоцитохимическим данным картина костного мозга более всего соответствовала острому миелобластному лейкозу с минимальной дифференцировкой (ОМЛ М0 вариант).

При диагностическом иммунофенотипировании подтверждена миелоидная природа острого лейкоза с коэкспрессией CD7 (Таблица 13).

Таблица 13 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике варианта ОМЛ у больной М.Т.Е.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | |
|---------|-------------------------------|------|-----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-cy5 | APC | APCH7 |
| ALOT | cyCD3 3,1 | CD45 | MPO 0,8 | CD7 62,3 | CD34 94,7 | CD3 7,4 | CD19 4,0 |
| 1 | CD16 1,1 | CD45 | HLA-DR 60,2 | CD13 94,7 | CD34 | CD11b 9,5 | CD10 0,6 |
| 2 | н.о. | CD45 | CD35 4,1 | CD64 1,9 | CD34 | CD300 0,1 | CD14 6,8 |
| 3 | н.о. | CD45 | CD36 1,9 | CD105 6,9 | CD34 | н.о. | CD71 9,7 |
| 4 | н.о. | CD45 | TdT 0,1 | CD56 0,6 | CD34 | н.о. | CD19 2,4 |
| 5 | н.о. | CD45 | CD15 4,1 | CD33 86,5 | CD34 | н.о. | CD38 27,3 |
| 6 | н.о. | CD45 | CD42a+61 0,5 | CD117 90,7 | CD34 | CD123 18,0 | н.о. |
| 7 | н.о. | CD45 | CD41 0,5 | CD25 0,1 | CD34 | CD42b 0,1 | CD9 0,8 |

При оценке минимальной остаточной болезни по окончании 1 курса лечения при морфологическом исследовании костного мозга: пунктат костного

мозга клеточный. Бластные клетки 0,8%, количество лимфоцитов снижено - 5,8%. Гранулоцитарный росток расширен (75,4%), преобладали зрелые формы (60,2%). Эритроидный росток сужен (14,2%). МГКЦ в сниженном количестве.

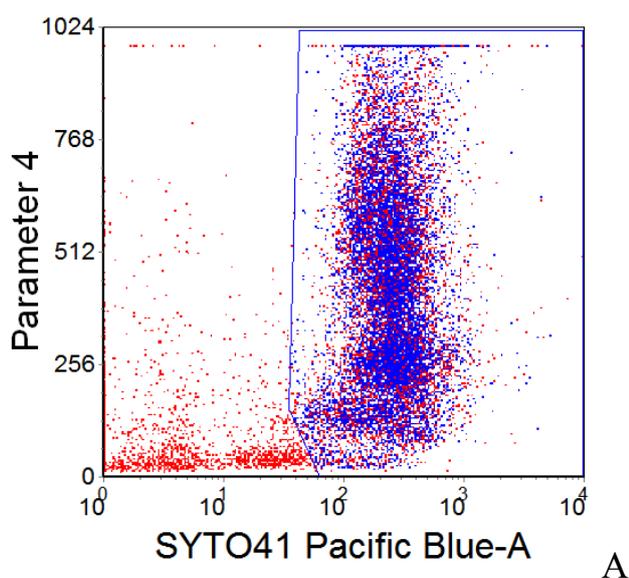
Для оценки минимальной остаточной болезни была использована следующая панель антител (Таблица 14).

Таблица 14 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике МОБ у больной М.Т.Е.

| Флуорохромы | V450 | V500 | FITC | PE | PE - Cy7 | APC |
|-------------|--------|------|------|-------|----------|------|
| Антитела | Syto41 | CD45 | CD7 | CD117 | CD13 | CD34 |

Синим цветом (Рисунок 10, А) выделены ядродержащие клетки (Сайто 41) среди синглетных событий (красный цвет). Гейт CD117-позитивных клеток выделен зеленым (Рисунок 10, Б).

Далее в объединенном гейте, включающем синглетные ядродержащие CD117 позитивные клетки, отчетливо видна пропорция CD7+CD34+ клеток (розовый цвет, Рисунок 10, В). Дополнительно продемонстрировано, что на 76% клеток этого гейта экспрессируется CD13 и слабо экспрессирован CD45 (Рисунок 10, Г). Итоговое значение МОБ в этом случае составило 0,17% от миелокариоцитов, что соответствовало МОБ-позитивному статусу.



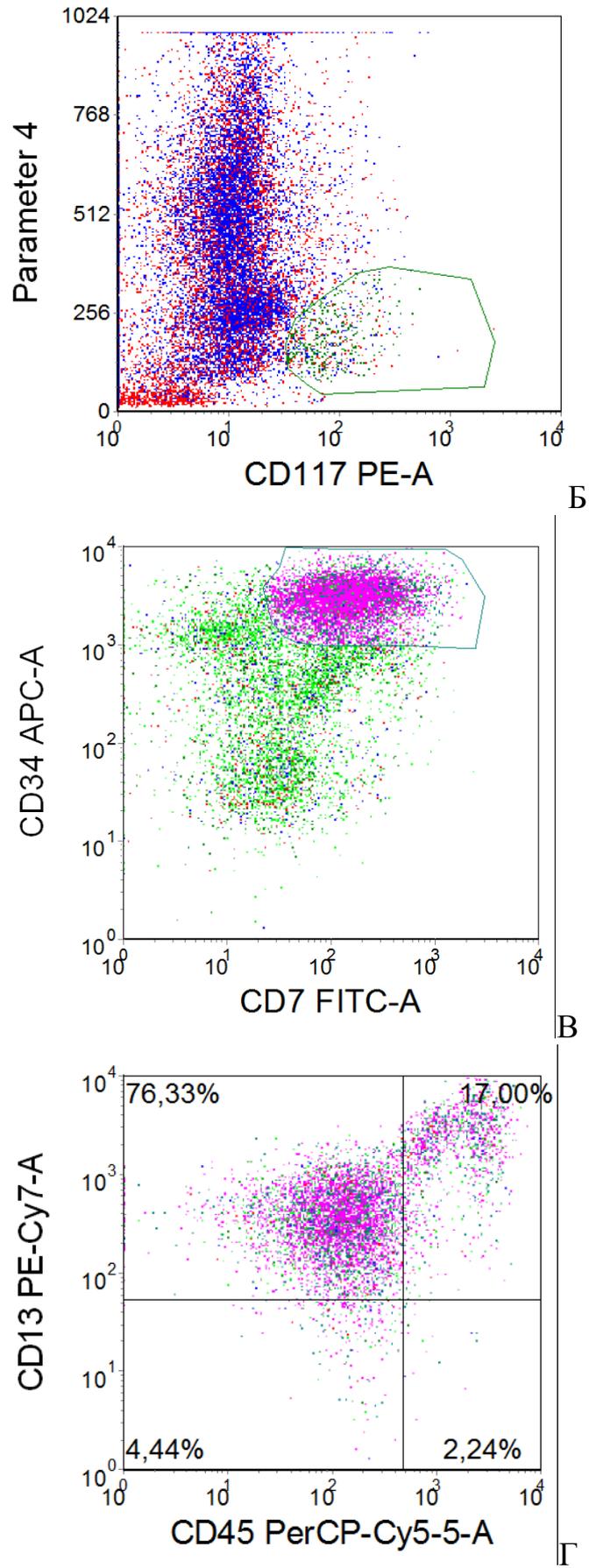


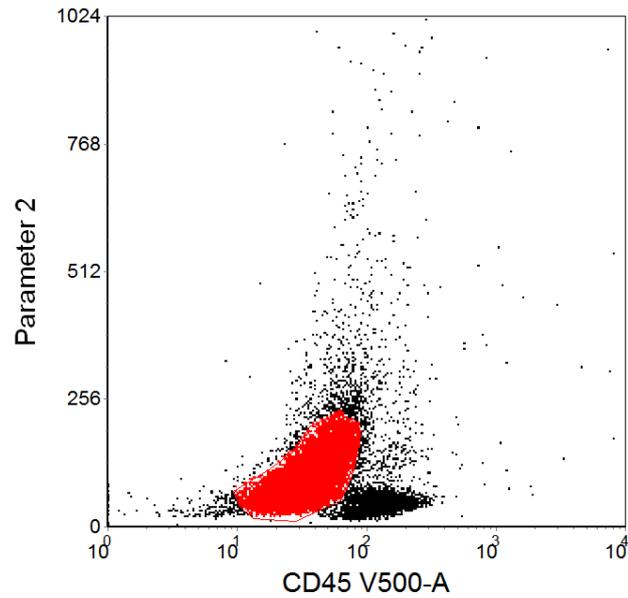
Рисунок 10 – Алгоритм оценки уровня МОБ пациентки М.Т.Е.

Больная С.В. (№22, Таблица 8), 5 лет. Пунктат костного мозга клеточный, бластные клетки составляют 82,4%, представлены крупными клетками с высоким и умеренным ядерно-цитоплазматическим соотношением, округлыми и неправильной формы ядрами, цитоплазма выражено базофильная; в единичных бластных клетках определяется зернистость и вакуолизация.

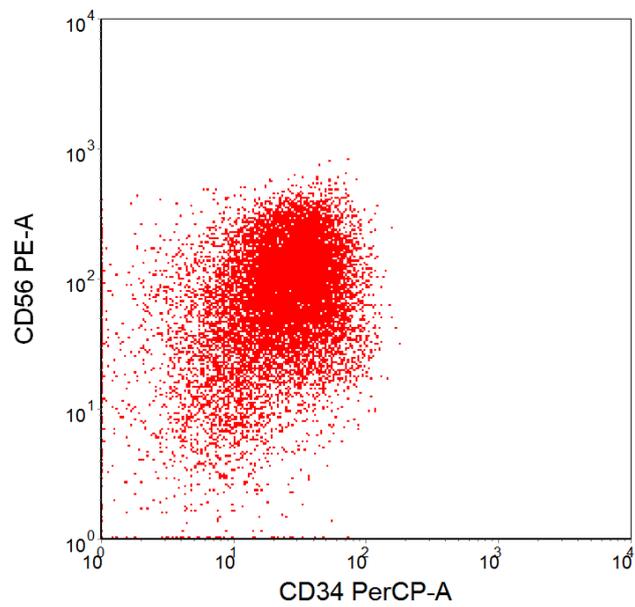
Цитохимическое исследование: миелопероксидаза и липиды содержатся в большинстве бластных клеток; реакция на гликоген в основном негативная, в 15,0% - диффузная и диффузно-гранулярная; неспецифическая эстераза содержится в 86,0% бластных клеток на (+), не гасится NaF. По морфоцитохимическим данным картина костного мозга более всего соответствует острому миелобластному лейкозу без созревания (ОМЛ М1 вариант). При диагностическом иммунофенотипировании получены следующие данные (Таблица 15), (Рисунок 11).

Таблица 15 – 8-цветные панели моноклональных антител, использованные при диагностике варианта острого лейкоза у пациентки С.В.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
| ALOT | cyCD3 0,1 | CD45 | MPO 97,4 | CD79b 23,5 | CD34 | CD19 0,1 | CD7 0,3 | CD3 0,1 |
| 1 | HLA-DR 89,7 | CD45 | CD16 0,3 | CD13 91,9 | CD34 90,8 | CD117 58,2 | CD11b 0,8 | CD10 0,1 |
| 2 | HLA-DR | CD45 | CD35 5,0 | CD64 43,5 | CD34 | CD117 | CD300 0,2 | CD14 0,2 |
| 3 | HLA-DR | CD45 | CD36 0,5 | CD105 0,1 | CD34 | CD117 | CD33 98,1 | CD71 64,7 |
| 4 | HLA-DR | CD45 | TdT 35,3 | CD56 91,4 | CD34 | CD117 | CD22 0,1 | CD19 0,1 |
| 5 | HLA-DR | CD45 | CD15 44,5 | NG2 0,1 | CD34 | CD117 | CD7 0,6 | CD38 52,4 |



А



Б

Рисунок 11 – Гейт бластных клеток (А - выделение гейта бластов в осях CD45/SSC, красный цвет) и экспрессия на них CD56 (Б)

Оценка МОБ выполнялась по окончании лечения, через 6 месяцев от установления диагноза (Таблица 16).

Таблица 16 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике МОБ у пациентки С.В.

| Флуорохромы | V450 | V500 | FITC | PE | PE-cy5 | PE-cy7 | APC | APCH7 |
|-------------|--------|------|------|------|--------|--------|------|-------|
| Антитела | HLA-DR | CD45 | TdT | CD56 | CD34 | CD117 | CD33 | CD14 |

При анализе пробы миелоидные предшественники CD117+CD34+CD45low с коэкспрессией CD56 составили 0,03% от ядродержащих клеток (Рисунок 12).

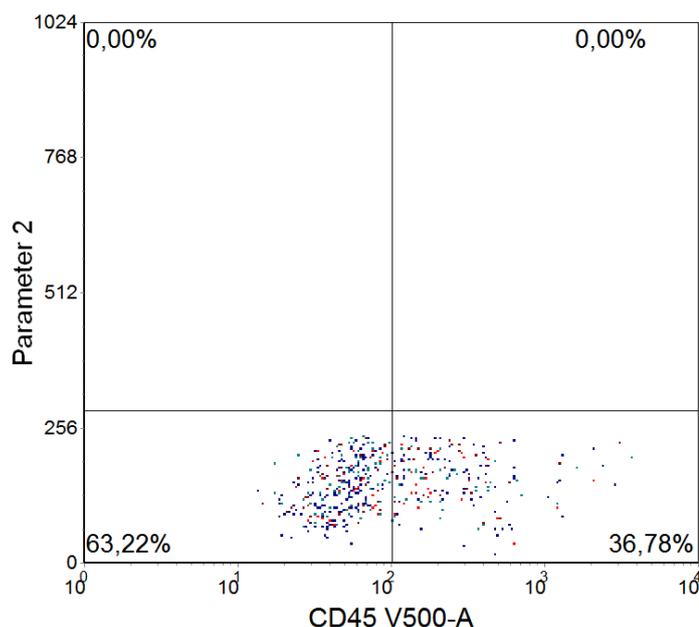


Рисунок 12 – 63,22% популяции миелоидных клеток с aberrантным иммунофенотипом CD117+CD34+CD56+ слабо экспрессирует CD45

3.2. Диагностика МОБ при коэкспрессии В-линейных антигенов

Приведем пример определения МОБ в случае с коэкспрессией суCD79a на бластных клетках.

Больная Д.Е. (№7, Таблица 8). Пунктат костного мозга средноклеточный; бластные клетки составили 76,8%, они представлены крупными и среднего размера клетками с округлыми ядрами, умеренной краевой базофилией цитоплазмы, в части клеток определялась зернистость и вакуолизация. Цитохимическое исследование: миелопероксидаза – отрицательна; липиды содержались в единичных бластных клетках; гликоген в части бластных клеток в диффузно-гранулярном и диффузном виде, в части – в гранулярном виде; неспецифическая эстераза в малом количестве в гранулярном виде на (+) в 18,0% бластных клеток, не ингибировалась NaF. По морфоцитохимическим данным картина костного мозга неоднозначная, могла соответствовать как ОМЛ с минимальной миелоидной дифференцировкой бластов (ОМЛ M0), так и ОЛЛ.

При диагностике использована панель антител в соответствии с Еврофлоу (Таблица 17).

Таблица 17 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике варианта ОМЛ у больной Д.Е.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|------|------------------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
| ALOT | cyCD3 0,8 | CD45 | MPO 38,0 | cyCD79a 55,2 | CD34 66,0 | CD117 72,3 | н.о. | sCD3 0,8 |
| 1 | HLA-DR 98,23 | CD45 | CD16 2,4 | CD13 18,73 | CD34 | CD117 | CD11b 3,5 | CD10 0,7 |
| 2 | н.о. | CD45 | CD35 0,7 | н.о. | CD34 | CD117 | CD300 1,9 | CD14 0,0 |
| 3 | н.о. | CD45 | CD36 8,3 | CD105 13,9 | CD34 | CD117 | CD33 38,1 | н.о. |
| 4 | н.о. | CD45 | TdT 85,1 | CD56 1,1 | CD34 | CD117 | н.о. | CD19 38,7 |
| 5 | н.о. | CD45 | CD15 2,3 | NG2 2,03 | CD34 | CD117 | н.о. | CD38 8,2 |
| 6 | н.о. | CD45 | CD42a+ CD61 1,21 | CD203 7,96 | CD34 | CD117 | CD123 31,3 | CD4 1,38 |
| 7 | н.о. | CD45 | CD41 1,19 | CD25 8,3 | CD22 0,1 | CD117 | CD42b 1,1 | CD9 82,6 |

Таким образом, клетки экспрессировали как миелоидные, так и лимфоидные антигены. Цитохимически вариант лейкоза расценен как сложный для дифференциальной диагностики между ОМЛ-М0 и ОЛЛ. Иммунологически выявлена миелопероксидаза в цитоплазме 38% бластных клеток. К дополнительным маркерам миелоидной дифференцировки отнесены CD33,

CD117. В-линейные маркеры cyCD79a , CD19 (слабая экспрессия) также присутствовали. Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (маркер, который может иметь место при ОМЛ, но в целом лимфоидный, также обнаружен).

Интересно отметить, что TdT была экспрессирована в CD19+ клетках. Именно этот факт (коэкспрессия CD117, CD19, TdT, cyCD79a) послужил основой для мониторинга МОБ у больной (Таблица 18, Рисунок 13).

МОБ оценена через 35 дней от диагностики. Пунктат костного мозга беден клеточными элементами. Бластные клетки составили 0,4%, увеличено количество лимфоцитов - 81,2%. Гранулоцитарный ряд редуцирован (0,4%). В эритроидном ряду отмечаются явления дизэритропоэза. Мегакариоциты не найдены.

Таблица 18 – Панель моноклональных антител, использованная при диагностике МОБ у больной Д.Е.

| Флуорохромы | V450 | FITC | PE | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
|-------------|------|------|------------------|--------|--------|-------|--------|
| Антитела | CD45 | TdT | cyCD79a | CD34 | CD13 | CD117 | CD19 |

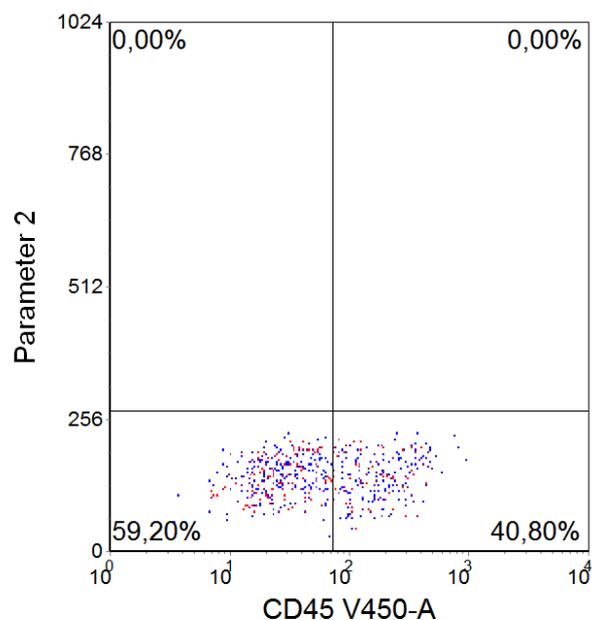


Рисунок 13 – Распределение CD117+CD19+TdT+CD79a+ клеток (выделены синим) в осях CD45/SSC, CD45-негативные клетки составили 59,2%

Содержание CD117+ клеток составило 0,94%. На 2,65% их них были коэкспрессированы CD79a, CD19 и TdT. 59,2% клеток этих клеток слабо экспрессировали CD45 (Рисунок 13), итоговое значение МОБ составило 0,0177, что соответствовало МОБ-негативному статусу.

3.3. Диагностика МОБ при мегакариобластном варианте ОМЛ

В группе пациентов, у которых оценивалась минимальная остаточная болезнь, присутствовало 7 пациентов с мегакариобластным вариантом ОМЛ (ОмегаЛ).

При данном варианте лейкоза на бластных клетках определяются мегакариоцитарные маркеры CD41, CD42a, CD42b, CD61. На клетках могут определяться различные признаки аберрантности: коэкспрессия CD7 или других лимфоидных маркеров, отсутствие пан-миелоидных антигенов и некоторых из мегакариоцитарных антигенов [169].

Длительное время считалось, что мегакариоциты происходят из общего бипотентного мегакариоцитарно-эритроидного предшественника (биМЭП). Однако существовала также гипотеза о том, что мегакариоцитопоэз протекает в обход биМЭП. Она получила подтверждение в крупных экспериментальных работах по трансплантации единственной клетки: было показано существование особой популяции гемопоэтических стволовых клеток – предшественниц мегакариоцитов (унипотентных предшественников мегакариоцитов), которые способны дать начало популяции мегакариоцитов [154, 155]. Однако промежуточные стадии мегакариоцитопоэза от такого раннего предшественника до тромбоцитов еще недостаточно изучены. Ранее для выделения из компартмента полипотентных стволовых клеток – унипотентных мегакариоцитарных предшественников использовались CD9, CD41, CD150 в различных комбинациях. Однако единый линейно-специфичный антиген мегакариоцитарной линии гемопоэза выделен не был [155, 156, 157].

В исследовании Nishikii, H. et al [155] показано, что CD42b (гликопротеин GPIIb) экспрессируется унипотентным мегакариоцитарным предшественником (уМКП) уже внутри компартмента общих предшественников миелопоэза. Прежде

CD42b считался специфичным антигеном только для зрелых мегакариоцитов и тромбоцитов. В то же время CD42b отсутствует на гранулоцитарно-моноцитарных предшественниках и биМЭП. уМКП также экспрессировали на мембране антигены CD150, CD41 (ярко) и CD9 (ярко), CD42c, CD42d и CD42a. При световой микроскопии (окраска по Романовскому-Гимза) такие уМКП представляли собой одноядерные бластные клетки с базофильной цитоплазмой; они не имели специфических морфологических признаков мегакариоцитарной дифференцировки. Было показано, что культивирование уМКП в присутствии стволовых факторов роста и тромбопоэтина приводит к образованию однородной колонии мегакариоцитов. При трансплантации уМКП клеток мышам, получившим сублетальную дозу облучения, спустя 4 дня в их периферической крови появлялись тромбоциты. Таким образом, антиген CD42b является самым ранним маркером мегакариоцитарно-коммитированным антигеном, и сочетание CD34, CD117 и CD42b в отсутствие линейно-специфичных антигенов позволяет выявить ранние предшественники мегакариоцитов.

Однако зачастую при установлении диагноза ОмегаЛ мегакариобластные предшественники имеют aberrantный иммунофенотип [169]: важно учитывать это при определении МОБ.

Таким образом, поиск остаточных лейкозных клеток в ремиссии ОмегаЛ принципиально отличается от оценки МОБ при других вариантах ОМЛ благодаря их специфичному иммунофенотипу, а также низкому содержанию мегакариобластов в здоровом костном мозге.

Ниже мы рассмотрим особенности диагностики и оценки МОБ при этом варианте заболевания [169].

В таблице 19 представлены данные по иммунофенотипам пациентов с мегакариобластным вариантом ОМЛ.

Диагноз острого мегакариобластного лейкоза во всех случаях подтверждался при помощи морфоцитохимического и иммунофенотипического исследований.

Таблица 19 – Иммунофенотипы пациентов с мегакариобластным вариантом ОМЛ

| Маркер | И.Т.А. | С.Д.Я. | К.А.Г. | Э. | И.Д. | К.Г.А. | К. | Сводное количество (+/всего) |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|-----------|-------------|---------------|-----------|-------------------------------------|
| МРО | | | - | | - | - | - | 0/4 |
| CD34 | + | - | + | - | - | - | - | 2/7 |
| CD117 | + | - | + | - | - | - | - | 2/7 |
| CD13 | + | - | - | + | - | - | - | 2/7 |
| CD33 | + | - | - | + | + | + | + | 5/7 |
| CD64 | - | | - | | - | - | - | 0/5 |
| CD4 | | | - | | - | - | | 0/3 |
| CD7 | + | - | + | | + | + | - | 4/6 |
| HLA-DR | - | - | - | - | - | - | | 0/6 |
| CD9 | - | + | + | + | + | + | | 5/6 |
| CD56 | + | - | - | | - | - | | 1/5 |
| CD38 | + | | - | - | - | - | | 1/5 |
| GPA | | | | | | | - | 0/1 |
| CD36 | + | | - | | - | + | | 2/4 |
| CD105 | | | - | | - | - | | 0/3 |
| CD(61+42a)/CD61 | + | + | + | + | + | + | + | 7/7 |
| CD41 | | + | + | | + | + | | 4/4 |
| CD42b | + | + | + | | - | + | | 4/5 |
| CD71 | + | | | | + | - | | 2/3 |
| CD22 | - | - | | | | - | | 0/3 |
| TdT | - | | - | - | - | - | | 0/5 |
| CD11b | | | + | | - | - | | 1/3 |
| CD123 | | - | + | - | - | - | | 1/5 |

При морфоцитохимическом и иммунофенотипическом исследованиях устанавливалась экспрессия бластными клетками мегакариоцитарных антигенов CD41, CD42a, CD42b, CD61. Необходимо отметить, что реакция с антителами к CD42b была отрицательной лишь в одном из 7 случаев, что можно рассматривать как признак aberrантности; в этом случае положительная реакция отмечена с антителами к CD(61+42a) и CD41.

Образцы костного мозга при диагностике чаще характеризовались средней или низкой клеточностью. По данным морфоцитохимии выявлялось более 20% бластных клеток; в большинстве случаев они были представлены клетками неправильной формы с базофильной, отростчатой цитоплазмой, умеренным и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, округлыми ядрами; зернистость и иные включения в цитоплазме отсутствовали. Однако в ряде случаев бластные клетки не имели специфических признаков дифференцировки при морфологическом исследовании, напоминая лимфобласты.

Некоторые иммунофенотипы с признаками aberrантности, позволяющими мониторировать МОБ у больных ОмегаЛ, представлены на рисунках 14, 15.

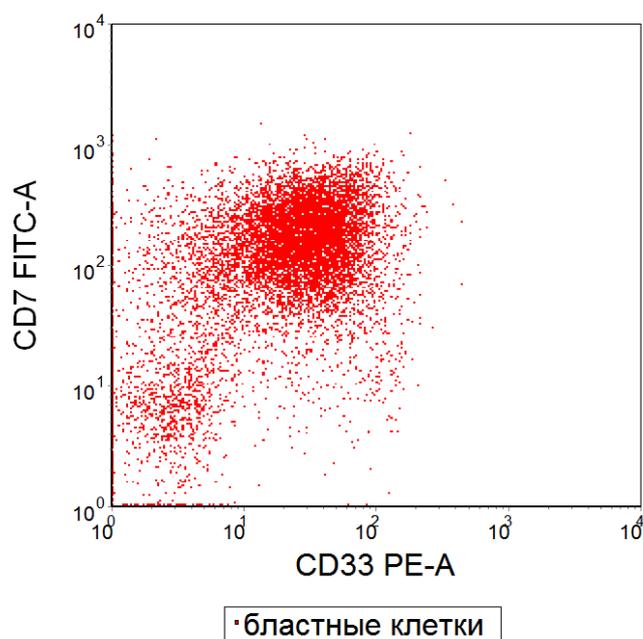


Рисунок 14 – Коэкспрессия CD7 на бластной популяции при ОмегаЛ

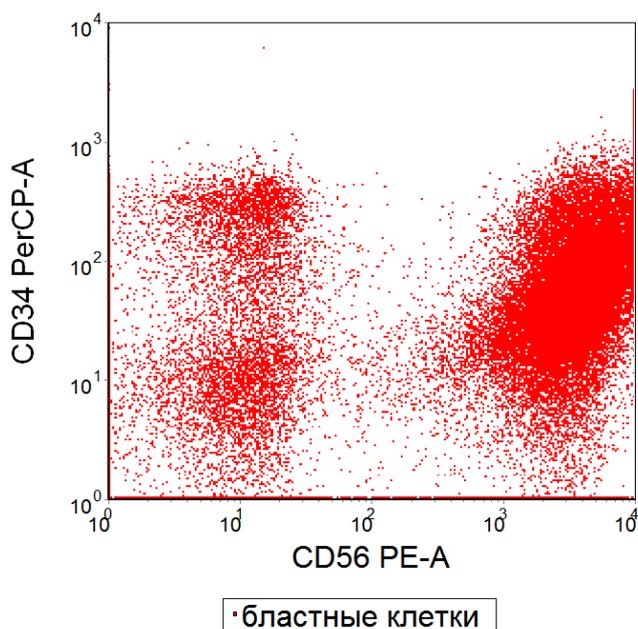


Рисунок 15 – Коэкспрессия CD56 на бластной популяции при ОмегаЛ

В группе пациентов младше 1 года в части случаев определялись две популяции CD45^{low} клеток: опухолевые мегакариобласты и В-линейные предшественники. Эти В-линейные предшественники характеризовались нормальным иммунофенотипом, их наличие было связано с возрастными особенностями гемопоэза детей младшего возраста [169].

Ниже рассмотрим примеры оценки МОБ у детей с ОмегаЛ.

Пример определения МОБ у ребенка К.А.Г. 1 года и 8 месяцев (№16, Таблица 8) на 30 день от диагностики ОмегаЛ. При морфологическом исследовании пунктат костного мозга средноклеточный, бласты составили 2,4%. Лимфоциты составили 22,4%. Гранулоцитарный росток – в пределах нормы, эритроидный росток сужен. Мегакариоциты в препаратах в сниженном количестве.

При определении МОБ использованы следующие маркеры (Таблица 20). Первым этапом объединены клетки, на которых одновременно экспрессировались антигены CD61+CD42a, CD117, CD34. Из полученной популяции в соответствии с первичным иммунофенотипом исключены CD13- и CD33-позитивные клетки. Итоговое содержание клеток с иммунофенотипом, соответствующим таковому при диагностике, составило 0,01% (Рисунок 16).

Таблица 20 – Маркеры диагностики МОБ у пациента К.А.Г.

| Флуорохромы | V500 | V450 | FITC | PE | PE-Cy-5 | PE-Cy-7 | APC |
|-------------|------|------|------------|------|---------|---------|-------|
| Антитела | CD45 | CD9 | CD(61+42a) | CD33 | CD34 | CD13 | CD117 |

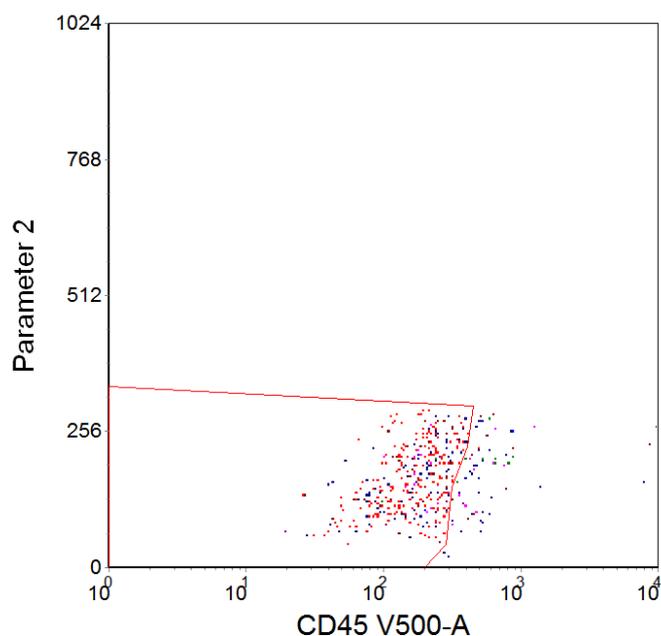


Рисунок 16 – Клетки с иммунофенотипом $CD(61+42a)^+CD117^+CD34^+CD33^-CD13^-CD45^{low}$ (выделены красным) составляют 0,01% от всех зарегистрированных событий

Пример определения МОБ у ребенка Э. 5 мес. (№28, Таблица 8) – проведено через 50 дней от диагностики при первой контрольной пункции костного мозга. Пунктат костного мозга гипоклеточный. Бластные клетки составили 2,8%, лимфоциты 24,4%. Гранулоцитарный росток сужен до 32,4%. Увеличено число моноцитов (8,8%) и клеток эритроидного ряда (31,6%), присутствуют признаки дизэритропоэза. Мегакариоциты в достаточном количестве.

При определении МОБ использована следующая панель антител (Таблица 21).

Ядродержащие клетки (SYTO-41+) составили 96%. Популяция клеток с экспрессией мегакариоцитарных антигенов $CD42a+CD61$ не определялась. Таким образом, при анализе образца МОБ не выявлена.

Таблица 21 – Маркеры при диагностике МОБ пациентки Э.

| № пробы | Флуорохромы, антитела | | | | | | |
|---------|-----------------------|---------|------------|------|------|------|--------|
| | V500 | V450 | FITC | PE | Су-5 | APC | APC-H7 |
| 1 | CD45 | SYTO 41 | CD58 | CD19 | CD34 | CD10 | CD38 |
| 2 | CD45 | | CD61+CD42a | CD19 | | CD33 | |

Пациент И.Д. (№11, Таблица 8), 7 лет. Бласты составили 41,2%, единичные из них были представлены двуядерными формами. При цитохимии отсутствовали МПО, липиды; гликоген в единичных бластах располагался в виде крупных капель, а в остальных – в гранулярной форме. Неспецифическая эстераза, позитивная в части клеток, не ингибировалась фторидом натрия. Диагностическое иммунофенотипирование позволило установить мегакариобластный вариант ОМЛ с коэкспрессией CD7 (Таблица 22).

Определение МОБ проведено на 34 день лечения. В миелограмме: пунктат костного мозга гипоклеточный. Бластные клетки не найдены. Гранулоцитарный росток (63,0%) представлен преимущественно зрелыми формами (53,2%). Умеренно выражена моноцитарная реакция (13.8%). Эритроидный росток сужен до 5,2%. Мегакариоциты единичные в препарате.

При диагностике МОБ на первом этапе выделены ядродержащие клетки. В пределах них выделены CD42a-позитивные клетки, они составили 0,67%. Четкой популяции CD42a+CD7+ событий не наблюдалось; в целом CD42a-позитивные клетки с коэкспрессией CD7 и CD33 составили 7,74%, таким образом, клетки CD42a+CD33+CD7+ равнялось 0,015%, что более соответствует МОБ-негативному статусу (Рисунок 17).

Таблица 22 – Иммунофенотип бластных клеток ОмегаЛ у пациента И.Д.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|------|------------------|--------------|-------------|---------------|--------------|--------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE- cy5 | PE-cy7 | APC | APCH7 |
| ALOT | cyCD3 0,1 | CD45 | MPO 2,5 | CD19 1,6 | CD34 1,0 | н.о. | CD7 70,6 | CD3 0,4 |
| 1 | CD16 1,0 | CD45 | CD117 1,6 | CD13 6,5 | CD34 | HLA-DR 2,6 | CD11b 0,6 | CD10 1,7 |
| 2 | н.о. | CD45 | CD35 0,3 | CD64 0,2 | CD34 | HLA-DR | CD300 0,2 | CD14 1,3 |
| 3 | н.о. | CD45 | CD36 0,7 | CD105 2,0 | CD34 | HLA-DR | CD33 81,3 | CD71 33,1 |
| 4 | н.о. | CD45 | TdT 0,1 | CD56 1,2 | CD34 | HLA-DR | CD7 70,2 | CD19 1,8 |
| 5 | н.о. | CD45 | CD15 0,5 | NG2 0,2 | CD34 | HLA-DR | н.о. | CD38 4,4 |
| 6 | н.о. | CD45 | CD42a+61 94,3 | CD203 0,3 | CD34 | HLA-DR | CD123 0,3 | CD4 0,9 |
| 7 | н.о. | CD45 | CD41 71,8 | CD25 0,6 | CD34 | HLA-DR | CD42b 3,1 | CD9 76,7 |

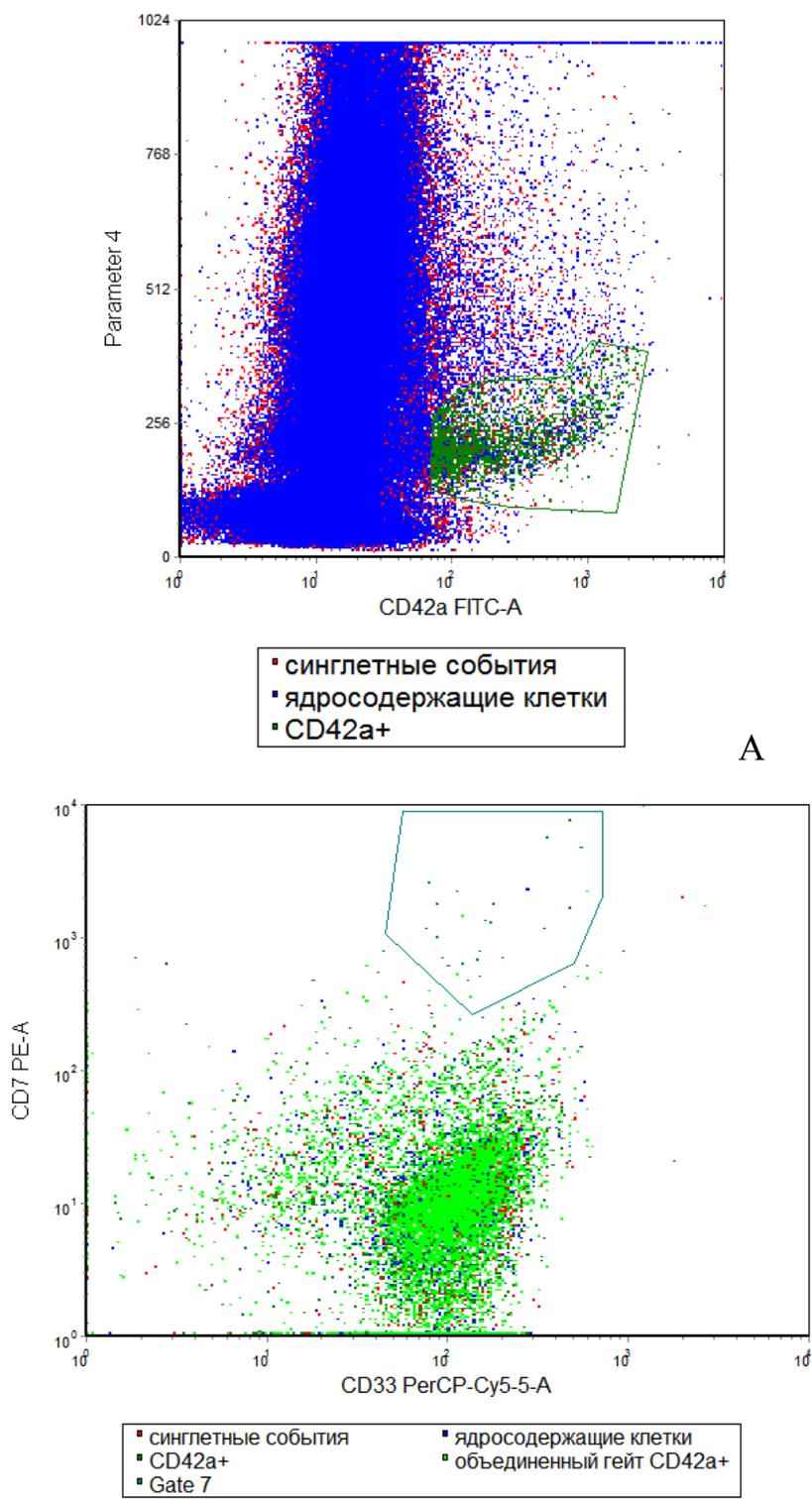


Рисунок 17 – ядродержащие синглетные CD42a-позитивные клетки (выделены зеленым, А), часть из которых коэкспрессирует CD7 и CD33 (выделены бирюзовым, Б)

Еще один пример. Мальчик К.Г.А. 1 г 7 мес (№14, Таблица 8). При диагностике установлен мегакариобластный вариант ОМЛ: особенностью случая

явилось отсутствие CD117, CD13, CD34 на мегакариобластах.

Оценка МОБ включала 2 пробы (Таблица 23).

Таблица 23 – Маркеры оценки МОБ у больного К.Г.А.

| Флуорохромы, антитела | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|---------------|---------------|------------|---------------|
| № пробы | V450 | V500 | FITC | PE | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
| 1 | HLA-DR | CD45 | CD61+CD42a | CD25 | CD34 | CD117 | CD42b | CD9 |
| 2 | | CD45 | SYTO-16 | | CD34 | | CD42b | |

При оценке минимальной остаточной болезни в пределах клеток-предшественников CD45^{low} с низкими уровнями SSC были последовательно выделены клетки с экспрессией мегакариоцитарных антигенов. При оценке экспрессии на этих клетках CD117 и CD34 уровень минимальной остаточной болезни составил 0,006%, что по международным критериям соответствует МОБ-негативному статусу.

В целом были оценены остаточные aberrantные клетки образцов костного мозга у 28 пациентов.

Нами была оценена взаимосвязь клиничко-гематологических, морфоцитохимических и иммунофенотипических факторов с безрецидивной (БРВ) и общей (ОВ) выживаемостью больных ОМЛ.

Общая и безрецидивная выживаемости были оценены у 28 пациентов группы.

Связи пола пациентов с ОВ (лог-ранк $p=0,52$, бреслоу $p=0,5$, тарон-уоре $p=0,5$) и БРВ (лог-ранк $p=0,67$, бреслоу $p=0,59$, тарон-уоре $p=0,62$) не получено.

Возраст пациентов группы находился в диапазоне от 5 месяцев до 17 лет, 2 пациента были младше 1 года. Взаимосвязи возраста менее и более 1 года и менее и более 5 лет с длительностью ОВ и БРВ не обнаружено (для 1 года БРВ: лог-ранк $p=0,43$, бреслоу $p=0,45$, тарон-уоре $p=0,44$; ОВ: лог-ранк $p=0,62$, бреслоу $p=0,59$,

тарон-уоре $p=0,59$ и для 5 лет БРВ: лог-ранк $p=0,51$, бреслоу $p=0,46$, тарон-уоре $p=0,48$, ОВ: лог-ранк $p=0,69$, бреслоу $p=0,51$, тарон-уоре $p=0,6$).

Уровень лейкоцитов при диагностике составлял от $4,0 \times 10^9/\text{л}$ до $133 \times 10^9/\text{л}$ (медиана $19,2 \times 10^9/\text{л}$), уровень лейкоцитов более $10 \times 10^9/\text{л}$ отмечался у 18 из 26 пациентов, гиперлейкоцитоз выше $50 \times 10^9/\text{л}$ отмечался у 4 из 26 пациентов. При анализе взаимосвязи уровня лейкоцитов при диагностике более и менее $10 \times 10^9/\text{л}$ различий в ОВ (лог-ранк $p=0,92$, бреслоу $p=0,93$, тарон-уоре $p=0,99$) не выявлено. Взаимосвязь уровня лейкоцитов с длительностью БРВ была близка к достоверной (лог-ранк $p=0,10$, бреслоу $p=0,11$, тарон-уоре $p=0,11$) (Рисунок 18).

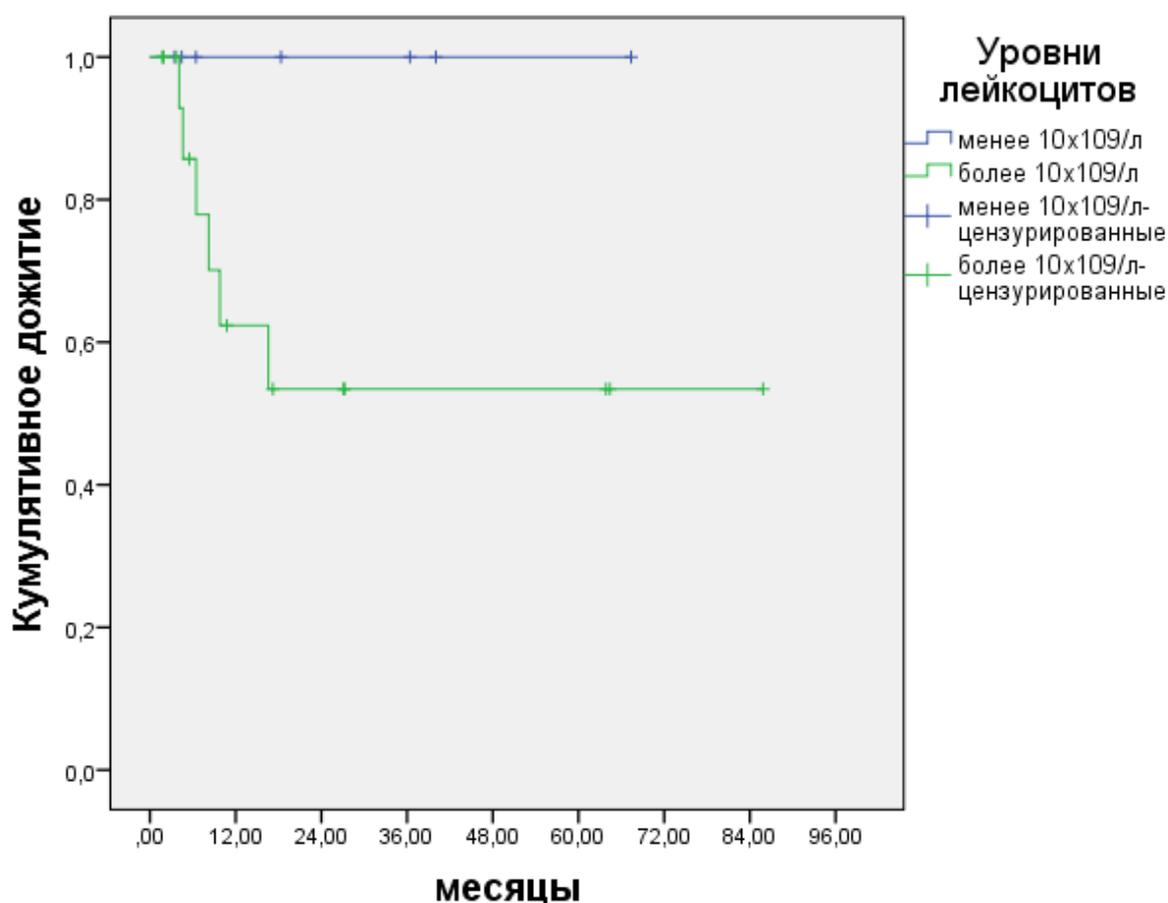


Рисунок 18 – Безрецидивная выживаемость больных в зависимости от уровня лейкоцитов при диагностике: 1 - $<10 \times 10^9/\text{л}$, $n=7$; 2 - $>10 \times 10^9/\text{л}$, $n=18$

При анализе взаимосвязи уровней лейкоцитов при диагностике более и менее $50 \times 10^9/\text{л}$ отмечены близкие к достоверным различия между группами по длительности БРВ (лог-ранк $p=0,1$, бреслоу $p=0,06$, тарон-уоре $p=0,07$) (Рисунок 19).

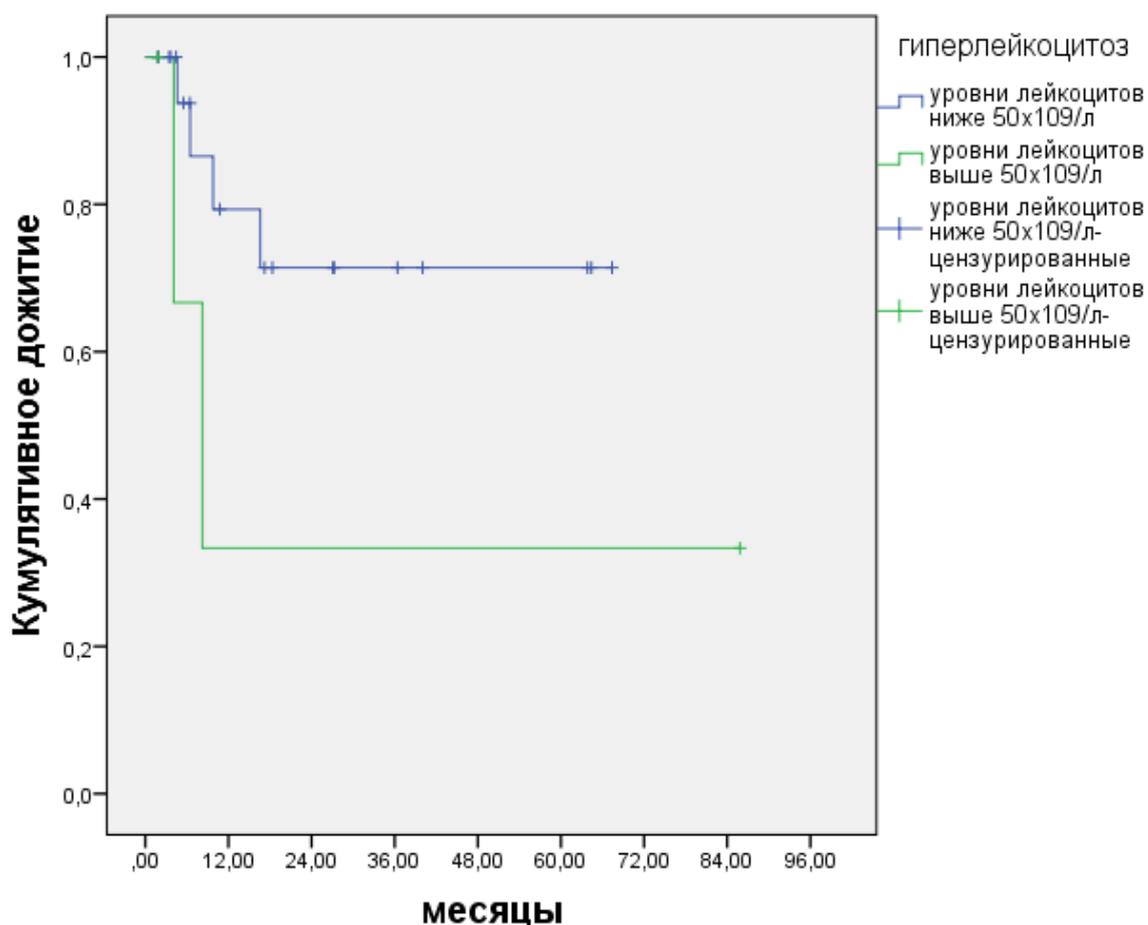


Рисунок 19 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от наличия гиперлейкоцитоза при диагностике: 1 - $<50 \times 10^9/\text{л}$, $n=21$; 2 - $>50 \times 10^9/\text{л}$, $n=4$

При этом достоверного влияния на общую выживаемость гиперлейкоцитоз выше $50 \times 10^9/\text{л}$ не оказывал: лог-ранк $p=0,38$, бреслоу $p=0,38$, тарон-уре $p=0,38$.

Также мы оценили взаимосвязь уровней МОБ больше и меньше $0,1\%$ с БРВ среди тех пациентов, которым определялся уровень минимальной остаточной болезни одновременно с констатацией первой костномозговой ремиссии, $n=23$ (лог-ранк $p=0,157$, бреслоу $p=0,139$, тарон-уре $p=0,146$) (Рисунок 20).

ОВ была практически одинаковой в группах пациентов с уровнями МОБ более и менее $0,1\%$ от миелокариоцитов, лог-ранк $p=0,55$, бреслоу $p=0,50$, тарон-уре $p=0,52$.

Аллогенные ТГСК были проведены 6 пациентам группы в связи с факторами неблагоприятного прогноза; у каждого из этих пациентов уровень МОБ на фоне первой ремиссии составлял более $0,1\%$.

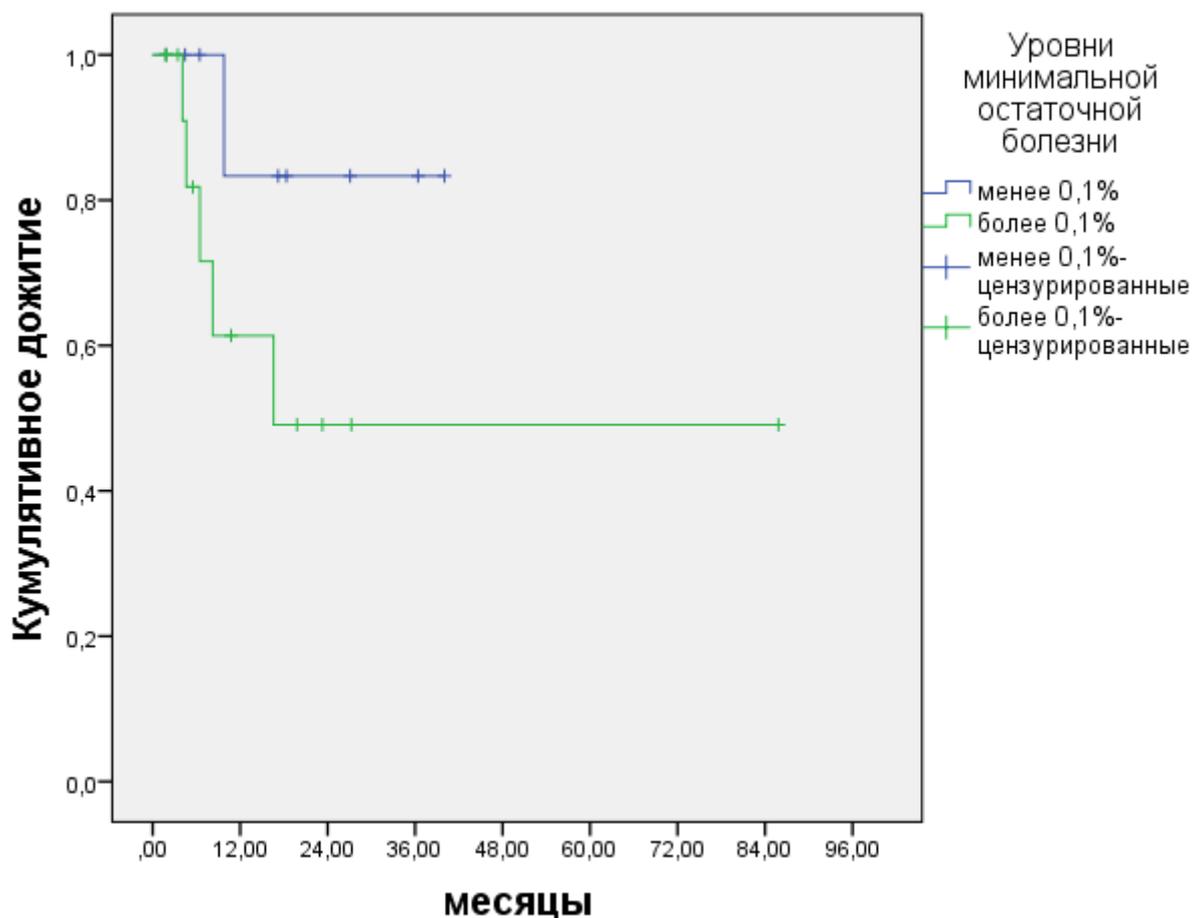


Рисунок 20 – Безрецидивная выживаемость больных в зависимости от уровня МОБ: 1 - $<0,1\%$, $n=9$; 2 - $>0,1\%$, $n=14$

Резюме

Оценка минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе у детей представляет собой достаточно трудную задачу. Это обусловлено сложностью и гетерогенностью иммунофенотипов острого миелоидного лейкоза, который в действительности включает 8 различных морфоцитохимических вариантов лейкоза.

Нами использован наиболее комплексный и стандартизованный подход к иммуноморфологической диагностике ОМЛ, основанный на концепции Еврофлоу, который включает использование иммунологических маркеров диагностики всех вариантов лейкоза (включая мегакариобластные, эритробластные, а также лейкозы из бластных плазмцитоподобных дендритных

клеток, который отсутствует в ФАБ-классификации). Используются маркеры незрелых клеток, общемиелоидные маркеры, маркеры различных линий миелопоэза и антигены, несвойственные миелоидным клеткам, которые могут считаться aberrantными и использоваться в дальнейшем при диагностике МОБ.

Примененный подход можно считать удачным, так как он позволил уже на этапе диагностики ОМЛ определиться с тем, какой набор маркеров может быть использован в каждом конкретном случае для диагностики МОБ.

Следует отметить, что в анализируемой группе больных такие факторы прогноза как пол и возраст пациентов не имели взаимосвязи с результатами лечения (показателями выживаемости). В то же время гиперлейкоцитоз оказался фактором неблагоприятного прогноза, при котором БРВ была значительно ниже, чем у детей с уровнем лейкоцитов ниже $50 \times 10^9/\text{л}$.

Для оценки влияния МОБ-негативного статуса на показатели выживаемости нами применен пороговый уровень в 0,1%. Это наиболее широко применимый пороговый уровень в подобных исследованиях [101,107,111,150]. Пациенты с МОБ-позитивным статусом (более 0,1%), оцененным в первой ремиссии, не отличались по прогнозу (ОВ, БРВ) от МОБ-негативной группы.

Интересно отметить, что на начальных этапах работы нами были оценены 5 пациентов на наличие МОБ в более поздние после начала лечения сроки (8 месяцев, 2, 6, 4, 5 месяцев от достижения ремиссии). Оценка проводилась в период костномозговой ремиссии. У 2 из этих больных был МОБ-позитивный статус. Совершенно очевидно, что и после окончания терапии индукции у этих пациентов статус МОБ был позитивным. Оценка выживаемости по всей группе больных показала интересные результаты. Больные с наличием МОБ имели значительно более низкие показатели безрецидивной выживаемости (лог-ранк $p=0,09$, бреслоу $p=0,09$, тарон-уоре $p=0,09$). Таким образом, персистенция МОБ в сочетании с другими факторами неблагоприятного прогноза может являться критерием рестратификации больных в группу более высокого риска.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОПУХОЛИ ИЗ БЛАСТНЫХ ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (ОБПДК) является крайне редким заболеванием с агрессивным течением. Впервые заболевание было описано в 1994 году под названием «агранулярная CD4-позитивная НК-клеточной лейкемии». В названии были отражены морфологические (бластоидность) и иммунологические (экспрессия CD4, CD56) характеристики опухолевого субстрата. В классификации ВОЗ 2008 года [7] заболевание было отнесено к группе острых миелоидных лейкозов, в классификации 2017г. ОБПДК вынесена отдельной рубрикой [6].

Плазмоцитоидные дендритные клетки (ПДК) являются компонентом врожденного иммунного ответа: они в больших количествах секретируют интерфероны I типа, являясь основными интерферон-продуцирующими клетками крови. Также они имеют функции антигенпрезентации и активации Т-клеток. Количество ПДК может увеличиваться на фоне инфекционных и воспалительных заболеваний. К маркерам плазмоцитоидных дендритных клеток относят молекулы BDCA-2 (CD303), BDCA-4 (CD304) [36,37,147].

В нормальном костном мозге присутствуют несколько фракций плазмоцитоидных дендритных клеток: (CD123+CD4+CD56+) и (CD123+CD4+CD56-) плазмоцитоидные дендритные клетки. [146, 147] Именно фракция CD123+CD4+CD56+ плазмоцитоидных дендритных клеток является неопухолевым аналогом при ОБПДК. CD123+CD4+CD56+клетки составляют около $0,03 \pm 0,01\%$ от мононуклеаров нормальной периферической крови. В нормальном костном мозге соотношение CD56+ плазмоцитоидных дендритных клеток к CD56-отрицательным плазмоцитоидным дендритным клеткам составляет 0.129 ± 0.144 , морфологически они не отличаются друг от друга [128]. Нормальные процентные и абсолютные показатели отдельных субпопуляций дендритных клеток в костном мозге достоверно не установлены.

В настоящее время принято мнение, что нормальные ПДК могут иметь как

миелоидное, так и лимфоидное происхождение. Плазмоцитоидные дендритные клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга и в малых количествах присутствуют в лимфоидных органах и периферической крови. В настоящее время классификация ВОЗ (версия 2017 года) трактует ОБПДК как опухоль «скорее миелоидной, чем лимфоидной» природы: это связано с тем, что профиль экспрессии генов опухолевых клеток при ОПДК более соответствует миелоидному. Также в пользу миелоидного происхождения говорит частая ассоциация ОБПДК с хроническими миелопролиферативными заболеваниями, миелодиспластическим синдромом и ОМЛ. Установление принадлежности ОБПДК к миелоидным неоплазиям обуславливает выбор тактики лечения: в настоящее время чаще используются протоколы для лечения ОМЛ.

Крайне редкая встречаемость и противоречивая биологическая природа ОБПДК обуславливает трудность диагностики, лечения и оценки эффекта терапии в каждом случае заболевания.

Опухолевые клетки имеют ядро неправильной формы с бластоидной структурой хроматина, 1-2 нуклеолами; ядерно/цитоплазматическое соотношение высокое или умеренное. Характерна субмембранная вакуолизация цитоплазмы в большинстве опухолевых клеток. Эритроидный, гранулоцитарный и мегакариоцитарный ростки при ОБПДК часто характеризуются диспластическими изменениями.

9 января 2019 года в НИИ ДОГ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина поступил 16-летний ребёнок, которому была диагностирована ОБПДК с поражением кожи, костного мозга, селезёнки [170]. Диагноз и распространённость были установлены с помощью ИГХ-исследования биоптата кожи, морфологического, проточно-цитометрического, цитогенетического исследований костного мозга, а также КТ грудной клетки и брюшной полости.

Пунктат костного мозга больного был среднеклеточным, полиморфным. Бластные клетки крупного и среднего размера с высоким и умеренным ядерно-цитоплазматическим соотношением (базофилия цитоплазмы слабая, в единичных

– вакуолизация), округлыми и складчатыми ядрами составляли 16%. Лимфоциты – 49%, гранулоцитарный росток – 24,6%, эритроидный – 9,4% (признаки дизэритропоэза), мегакариоциты - в достаточном количестве. При цитохимическом исследовании миелопероксидаза, липиды, неспецифическая эстераза – отрицательны. Гликоген в каплевидной форме, в части клеток – мелкогранулярный.

При проточно-цитометрическом исследовании костного мозга опухолевые клетки экспрессировали CD56, CD4, CD123, CD43. Экспрессия CD45 была слабой. Маркеры клеток-предшественников, В-клеток, миелоидные антигены отсутствовали (Таблица 24, Рисунок 21).

Таблица 24 – Иммунофенотип бластных плазмцитоподобных дендритных клеток пациента Э.

| № пробы | Флуорохромы, антитела (CD, %) | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|---------------|--------------|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | V450 | V500 | FITC | PE | PE-Cy5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
| 1 | CD20 0,4 | CD45 слабо | CD10 0,7 | CD34 1,1 | CD3 0,2 | CD13 0,7 | CD117 0,1 | CD19 0,5 |
| 2 | CD4 70,0 | CD45 | TdT 0,1 | CD7 26,0 | CD3 0,9 | CD38 13,3 | CD1a 0,1 | CD8 5,1 |
| 3 | cyCD3 1,1 | CD45 | MPO 1,5 | cyCD79a 0,8 | cyCD22 0,1 | | | |
| 4 | CD45 | CD61 1,7 | CD56 85,7 | GlyA 2,6 | | CD16 0,8 | CD123 72,7 | |
| 5 | CD45 | CD2 4,3 | CD5 0,3 | CD30 0,6 | | CD45RA 0,4 | CD33 1,3 | CD43 93,8 |

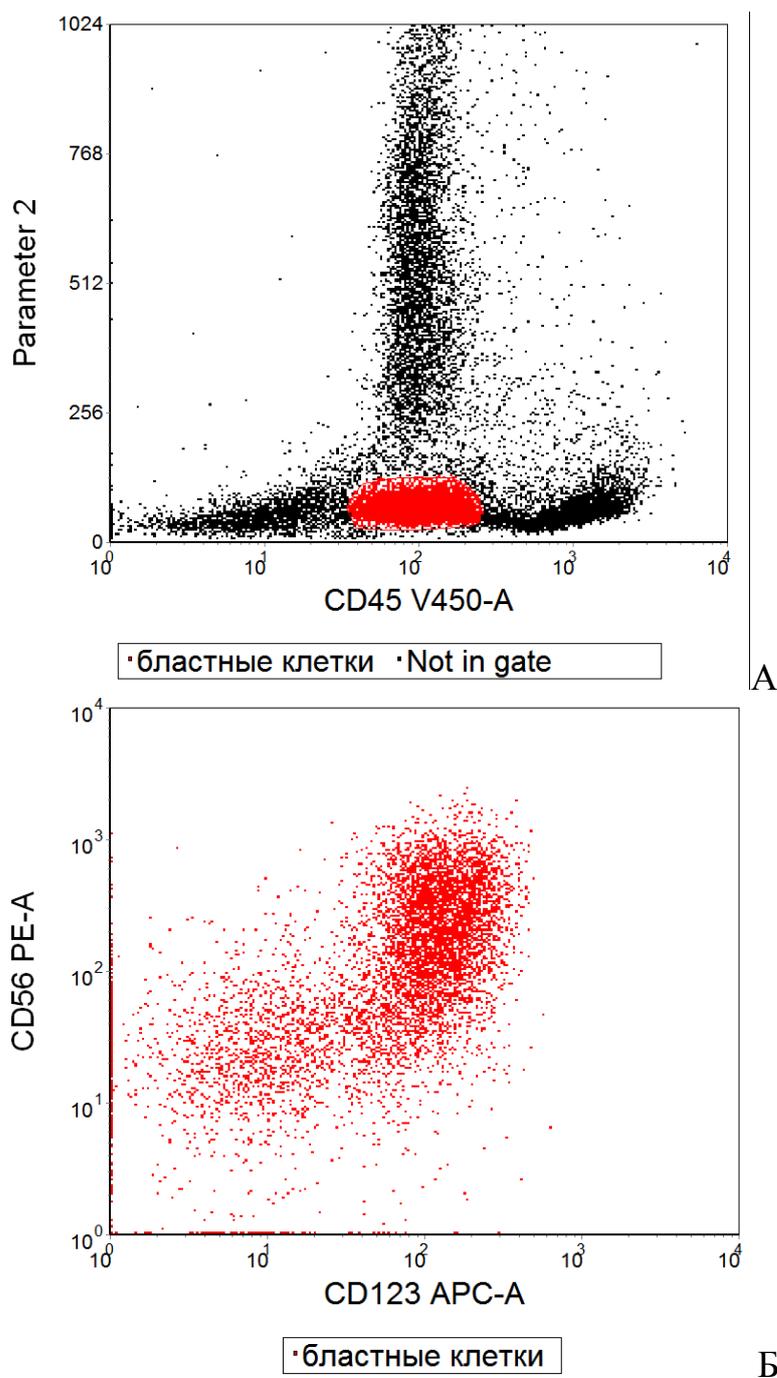


Рисунок 21 – Опухолевые клетки слабо экспрессируют CD45 (А, гейт бластных клеток выделен красным), характеризуются коэкспрессией CD123 и CD56 (Б)

Терапия проводилась по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012 с включением эпигенетических препаратов (депакин, весаноид, дакоген) и таргетных препаратов (венетоклакс) для группы высокого риска.

Первым этапом пациенту проведена полихимиотерапия по схеме АIE (соответственно протоколу AML-BFM-2004), сопроводительное лечение.

При пункции костного мозга на 15ый день лечения, по данным миелограммы пунктат характеризовался бедностью клеточными элементами, подсчет был произведен на 200 клеток. Бластные клетки составили 8,0%; было увеличено количество лимфоцитов (83.5%), клетки гранулоцитарного и эритроидного ростков отсутствовали. Отмечалась умеренно выраженная моноцитарная реакция (6.5%). Мегакариоциты в препаратах также отсутствовали.

Таким образом, в результате проведения первого курса индукционной терапии был достигнут частичный ответ. В связи с жизнеугрожающими осложнениями, вызванными, главным образом, постцитостатической панцитопенией, и, в частности, длительной лейкопенией 4 степени, были выполнены несколько введений гранулоцитарного колониестимулирующего фактора; достигнуто частичное восстановление показателей крови.

В миелограмме перед началом второго курса специфической терапии: пунктат костного мозга клеточный, полиморфный. Есть разрушенные клетки. Бластные клетки составляют 2%, количество лимфоцитов снижено (8,8%). Гранулоцитарный росток уменьшен (46,6%), отмечается ускорение созревания нейтрофилов. Умеренно выражена моноцитарная реакция (8,8%). Эритроидный росток не изменен (35,0%). Лейко/эритрономбластическое соотношение не нарушено. Мегакариоциты – в достаточном количестве. При обзоре препаратов встречаются большие скопления стромальных элементов.

Таким образом, была достигнута костномозговая ремиссия, также отмечен регресс кожных проявлений заболевания.

Далее пациенту продолжена полихимиотерапия - режимы НАМ, АI, НаМ по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012.

По данным миелограммы по окончании блоков ПХТ (30.08.2019): пунктат костного мозга ближе к гипоклеточному, полиморфный. Бластные клетки составляют 2.2%; лимфоциты 11.6%. Гранулоцитарный росток сужен (42.2%). Умеренно выражена моноцитарная реакция (6.0%). Эритроидный росток несколько расширен (38%). мегакариоциты – единичные в препарате.

По данным исследования МОБ-статуса путем проточной цитометрии клеток

костного мозга (30.08.2019) в гейте, соответствующем бластным клеткам (CD45+/-SSClow), определяются CD56+CD123+ клетки, их содержание от общего числа миелокариоцитов - 0.02%.

Лечение продолжено в формате поддерживающей терапии с включением цитостатиков, эпигенетических препаратов и венетоклакса по месту жительства.

Менее чем через 2 месяца на фоне проведения поддерживающей терапии у ребёнка появились интенсивные головные боли, рвота, онемение правой половины лица, вялость, галлюцинации. По данным МРТ головного мозга регистрировался усиленный сигнал от мозговых оболочек. При морфологическом исследовании ликвора был выявлен высокий цитоз, значительная доля клеток представлена была бластами. При последующем иммунологическом исследовании бластов было установлено, что их иммунофенотип соответствовал таковому при первичной диагностике: CD123+CD4+CD56+CD43+. При этом показатели костного мозга соответствовали норме. Таким образом, у пациента был подтвержден изолированный сверххранный рецидив с поражением ЦНС (25.12.2019).

Учитывая крайне неблагоприятный прогноз заболевания, отсутствие стандартных подходов к терапии рецидива данного заболевания принято решение о проведении лечения, включающего высокоинтенсивные блоки полихимиотерапии, применяемые в лечении ОЛЛ высокого риска (начато 3.01.2020). Достигнута санация спинномозговой жидкости; консолидация полученного эффекта включала в себя краниоспинальное облучение и поддерживающую химиотерапию (завершено 6.05.2020). Через месяц после окончания поддерживающей терапии в миелограмме количество бластных клеток составило 5,2%. Таким образом, констатирован костномозговой рецидив заболевания.

Определение минимальной остаточной болезни

По окончании этапов лечения проводилось не только морфологическое, но и иммунологическое исследование костного мозга: на основании первичного

иммунофенотипа опухолевых клеток определялась МОБ. Алгоритм гейтирования представлен на рисунке 22. Выделение опухолевых клеток осуществляли на основании параметров светорассеяния, нуклеотропного красителя SYTO41, общелейкоцитарного антигена CD45, коэкспрессии опухолеассоциированных антигенов CD4, CD56, CD123, CD43.

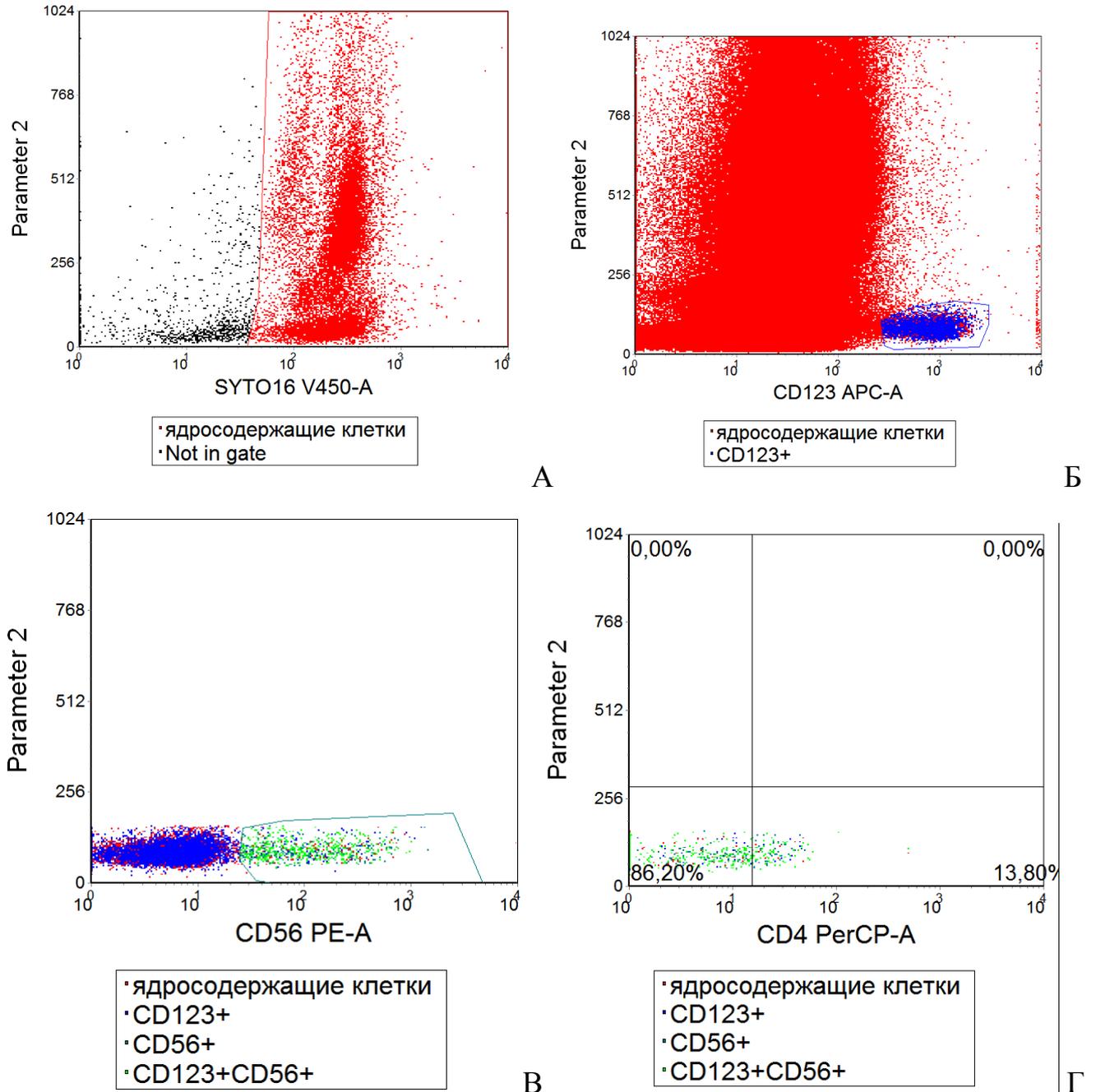


Рисунок 22 – Оценка минимальной остаточной болезни после первого индукционного курса; собрано 2 млн событий

А Выделение ядродержащих клеток костного мозга на основании

нуклеотропного красителя SYTO-41

Б CD123+ клетки (синий цвет) среди ядросодержащих клеток

В Коэкспрессия CD4 (салатовый цвет) клетками SYTO41+CD123+

Г Оценка соотношения искомым CD123+CD4+CD56+ клеток к CD56-негативным плазмоцитоидным дендритным клеткам; соотношение составляет 0,063

В пределах ядросодержащих клеток подсчитывалось количество клеток, ярко экспрессирующих CD123. Бластные CD123+ клетки определялись на основании слабой экспрессии CD45 или ее отсутствия. Затем в пределах бластных элементов выявляли клетки, одновременно экспрессирующие CD123, CD4 и CD56.

В описываемом случае динамика соотношения между CD56-позитивными и CD56-негативными плазмоцитоидными дендритными клетками костного мозга демонстрировала нарастание опухолевого клона в рецидиве заболевания (Рисунки 23, 24).

Изменение этого соотношения стало заметно при анализе гипоклеточного костного мозга в отсутствие повышенного числа бластов при морфологическом исследовании из той же пробирки. Видно, что при анализе костного мозга от 7.05.2020 (Рисунок 24) соотношение CD56+плазмоцитоидных дендритных клеток к CD56-негативным плазмоцитоидным дендритным клеткам возрастает с 0,063 до 8,9, в то время как количество бластов (1,2%) и процент CD56+плазмоцитоидных дендритных клеток от миелокарицитов костного мозга (0,06%) изменяются незначительно.

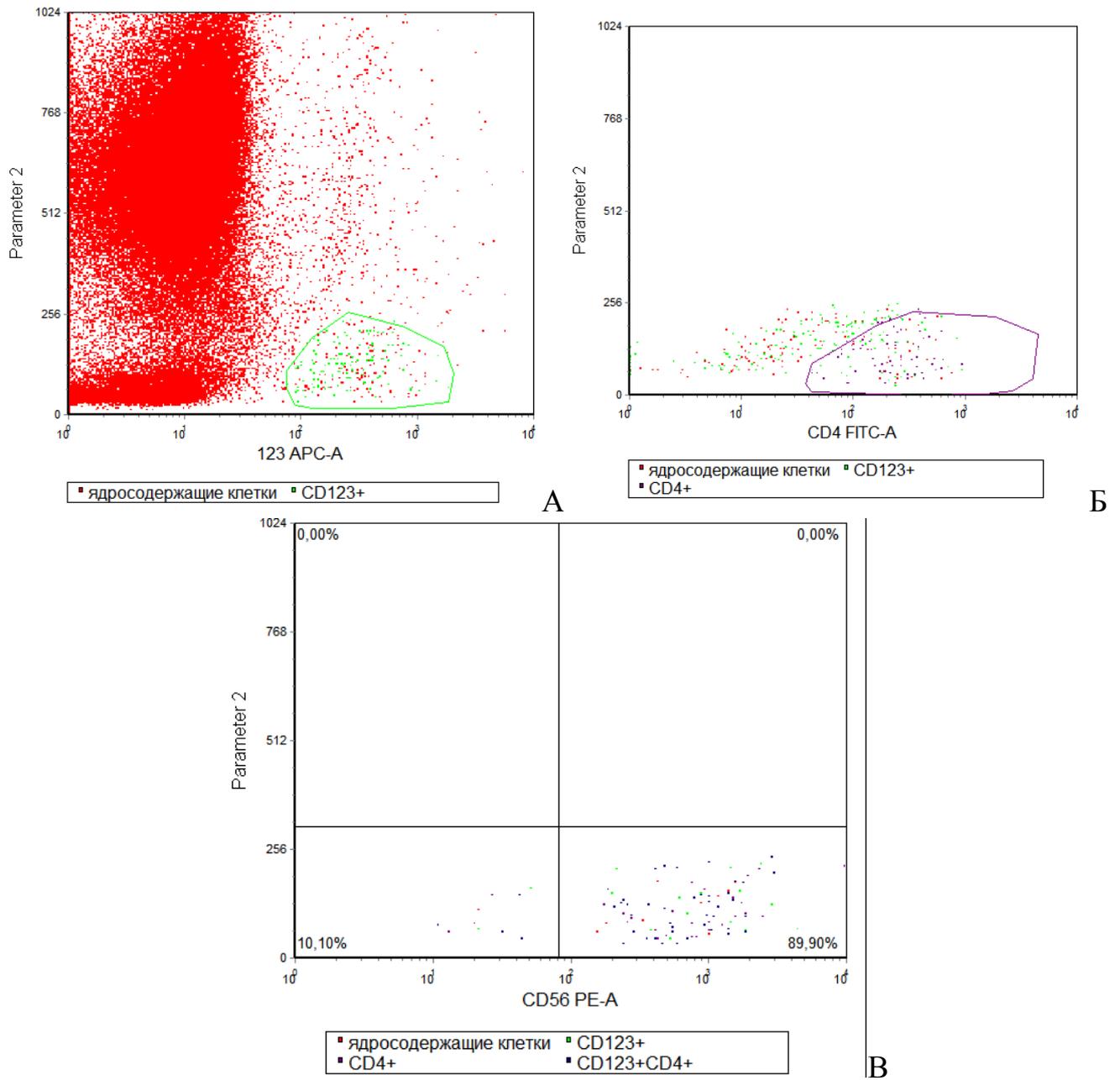


Рисунок 23 – Оценка МОБ по окончании краниоспинального облучения; костный мозг гипоклеточный, оценено 228718 событий

- А Выделение CD123+ клеток в пределах ядросодержащих клеток костного мозга (салатовый цвет)
- Б Выделение CD4+ клеток в пределах ядросодержащих CD123+ клеток, создание объединенного гейта SYTO41+ CD123+ CD4+
- В Оценка соотношения искомых CD56+ к CD56-негативным плазмоцитоидным дендритным клеткам: 89,9% SYTO41+ CD123+ CD4+ клеток являются CD56-позитивными, как при первичной диагностике, соотношение составило 8,9

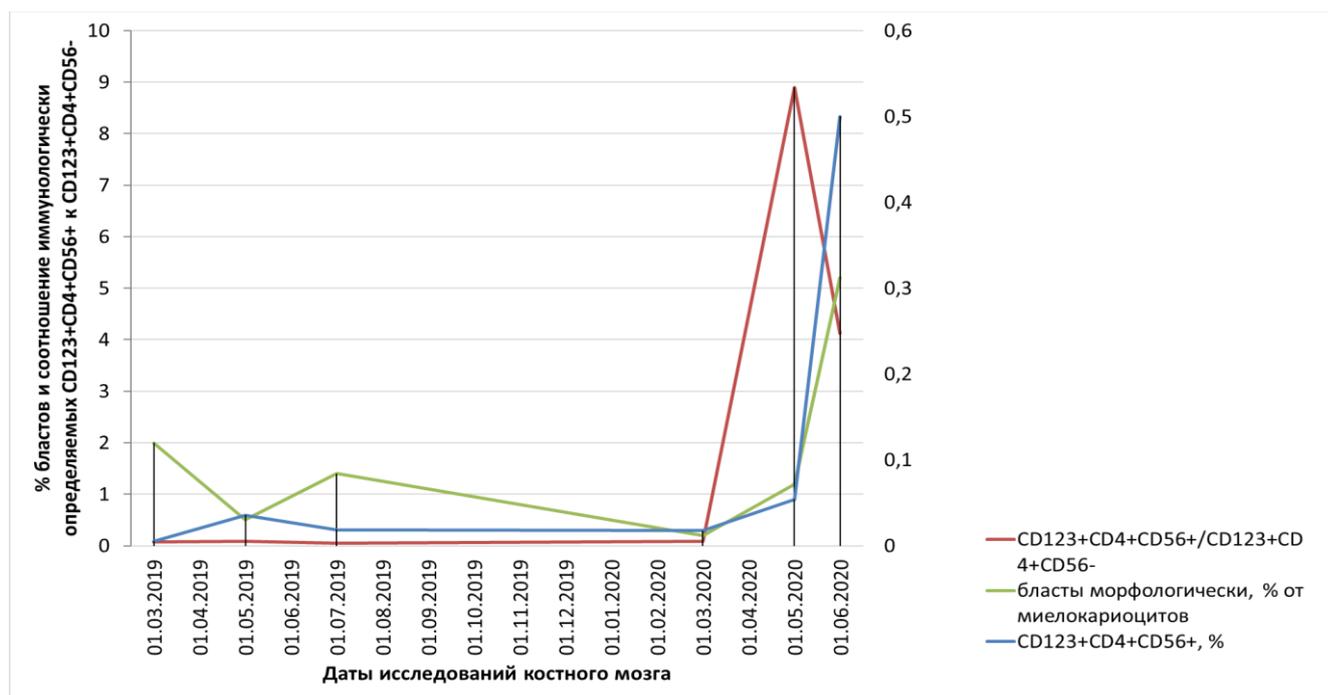


Рисунок 24 – Динамика изучаемых показателей в костном мозге

Результаты исследования костного мозга через 1 месяц представлены на рисунке 25.

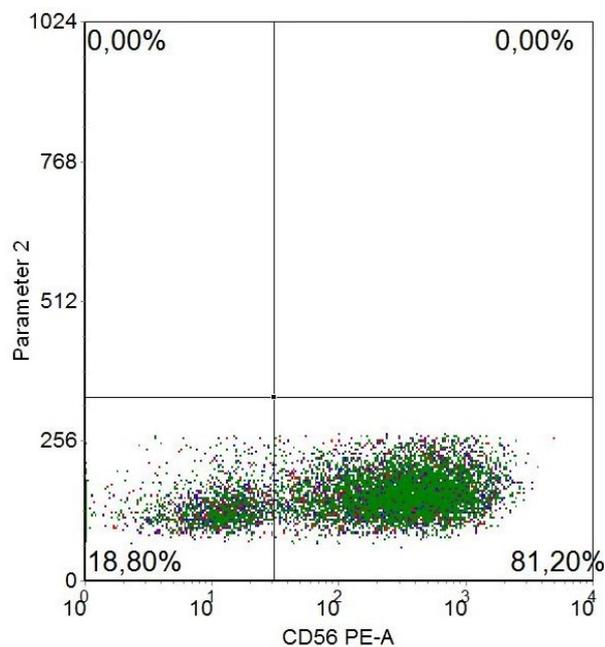


Рисунок 25 – Оценка минимальной остаточной болезни 15 июня 2020г.; собрано 2 млн событий. Отмечается дальнейшее нарастание опухолевого CD123+CD56+CD4+ клона; соотношение CD56+CD123+CD4+ к CD56-

CD123+CD4+ составляет 4,12

При исследовании костного мозга через 1 месяц (15 июня 2020) относительное содержание CD56-позитивных клеток составило 81,2% от плазмоцитоидных дендритных клеток, в то время как при морфологическом исследовании отмечено нарастание количества бластов до 5,2%. 15 июля 2020г. в пунктате костного мозга определялось 85% бластных клеток.

Таким образом, измерение отношения CD56+CD123+CD4+ клеток к CD56-CD123+CD4+ клеткам является эффективной стратегией объективной оценки опухолевой нагрузки и вероятности возникновения костномозгового рецидива опухоли из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток.

ГЛАВА 5. РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ПРОГНОЗЕ ОМЛ У ДЕТЕЙ

Существуют противоречивые данные о значении иммунологических факторов прогноза при ОМЛ. Большинство из них получены в результате анализа ОМЛ взрослых. Представляет интерес оценка взаимосвязи иммунофенотипа бластных клеток и течения болезни.

Проанализированы данные 135 детей, больных ОМЛ. Возраст детей на момент постановки диагноза составлял от 3 мес до 17 лет. Из группы исключены пациенты с синдромом Дауна и пациенты с промиелоцитарным лейкозом. Пациенты, которые погибли во время индукционной терапии, были исключены из анализа частоты достижения ремиссии.

Костномозговая ремиссия (наличие в костном мозге менее 5% бластных клеток) была достигнута у 109 пациентов, у части этих пациентов наблюдалось неполное восстановление показателей крови (нейтропения $<1 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитопения $<100 \times 10^9/\text{л}$). У 16 пациентов заболевание оставалось рефрактерным к проводимому лечению.

Средний возраст пациентов составил 7,6 лет, медиана возраста – 8 лет. Мы проанализировали частоту ремиссий в группах пациентов младше и старше 1 года (Таблица 25), а также младше и старше 5 лет.

Таблица 25 – Взаимосвязь частоты достижения ремиссии с возрастом детей, больных ОМЛ, $p=0,4$, $X^2=0,7$

| | Ремиссия достигнута | Ремиссия не достигнута | Всего |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| Возраст младше 1 года | 15 (93,8%) | 1 (6,2%) | 16 |
| Возраст старше 1 года | 94 (86,2%) | 15 (13,8%) | 109 |

Аналогичным образом, не было связи частоты достижения ремиссии при взятии в качестве порогового возраста 5 лет ($p=0,335$, $X^2=0,929$).

Мы проанализировали частоту ремиссии в зависимости от пола пациентов (Таблица 26).

Таблица 26 – Частота достижения ремиссии в зависимости от пола детей, больных ОМЛ ($p=0,486$, $X^2=0,485$)

| Наличие ремиссии | Ремиссия достигнута | Ремиссия не достигнута | Всего |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| девочки | 51 (89,5%) | 6 (10,5%) | 57 |
| мальчики | 58 (85,3%) | 10 (14,7%) | 68 |

Произведено сопоставление частоты достижения ремиссий с вариантом ОМЛ по Франко-Американо-Британской (ФАБ) классификации. Распределение ФАБ-вариантов в анализируемой группе отражено в таблице 28, из которой видно, что преобладали варианты М1, М2, М4. При сопоставлении получены следующие результаты (Таблица 27).

Таблица 27 – Частота достижения ремиссии в зависимости от ФАБ-варианта ОМЛ ($p=0,842$, $X^2=2,7$)

| ФАБ-вариант ОМЛ | Ремиссия не достигнута, количество больных (%) | Ремиссия достигнута, количество больных (%) |
|------------------------|---|--|
| М0 | 2 (22,2) | 7 (77,8) |
| М1 | 2 (8,0) | 23 (92,0) |
| М2 | 4 (9,80) | 37 (90,2) |
| М4 | 3 (15,0) | 17 (85,0) |
| М5 | 2 (15,4) | 11 (84,6) |
| М6 | 0 | 2 (100) |

При диагностике ОМЛ у детей использована широкая панель иммунологических маркеров, в последние годы в значительной степени соответствующая предложенным ЕвроФлоу панелям 8-цветного окрашивания при проточно-цитометрической диагностике. Частота использования различных маркеров в группе больных, у которых факт достижения или отсутствия ремиссии был подтвержден, приведена в таблице 28.

Таблица 28 – Частота экспрессии антигенов при диагностике ОМЛ

| Маркер | Число случаев ОМЛ с экспрессией маркера/ общее число случаев оценки маркера | % ОМЛ с наличием маркера |
|---------------|--|---------------------------------|
| CD7 | 24/99 | 24,2 |
| CD34 | 72/117 | 61,5 |
| CD117 | 39/49 | 79,6 |
| CD13 | 89/122 | 73,0 |
| CD33 | 104/121 | 86,0 |
| CD19 | 23/108 | 21,3 |
| CD38 | 52/67 | 77,6 |
| HLA-DR | 87/108 | 80,6 |
| CD64 | 28/83 | 33,7 |
| CD14 | 3/27 | 11,1 |
| CD56 | 24/69 | 34,8 |
| CD10 | 2/94 | 2,1 |
| CD9 | 9/15 | 60,0 |
| CD61 | 14/93 | 15,1 |
| CD42b | 6/17 | 35,3 |
| CD36 | 3/12 | 25,0 |
| CD105 | 3/9 | 33,3 |
| CD71 | 5/12 | 41,7 |
| CD11b | 5/13 | 38,5 |
| CD123 | 2/11 | 18,2 |
| CD25 | 0/5 | 0 |
| CD35 | 1/6 | 16,7 |
| CD15 | 3/8 | 37,5 |

Из таблицы 28 видно, что с наибольшей частотой в группе детских ОМЛ определялись общемиелоидные маркеры (CD33, CD13), а также антигены HLA-DR, CD117, CD38. Стволовоклеточный антиген CD34 обнаруживался в 61,5%

случаев. Следует отметить и достаточно высокую частоту экспрессии моноцитарного антигена CD64, антигенов CD7, CD19, а также CD56 в анализируемой группе больных.

Среди проанализированных иммунологических маркеров только CD19 оказывал достоверное влияние на непосредственную эффективность терапии. Приводим данные анализа взаимосвязи экспрессии маркеров с частотой достижения ремиссии.

Частота достижения ремиссии не зависела от экспрессии стволовоклеточного антигена CD34. В группе с отсутствием экспрессии CD34 частота ремиссии составила 93,3%, в группе пациентов с экспрессией CD34 – 83,3%, $p=0,115$.

В группах с наличием и отсутствием раннего миелоидного антигена CD117 достоверных различий в частоте достижения ремиссии не выявлено: при отсутствии экспрессии CD117 частота ремиссии составила 100%, при наличии экспрессии – 89,7%, $p=0,291$.

В группах с наличием и с отсутствием экспрессии общего миелоидного антигена CD13 частота ремиссий составила 87,6% и 84,8%, соответственно, $p=0,685$.

В группах с наличием и с отсутствием экспрессии общего миелоидного антигена CD33 частота ремиссий составила 88,5% и 76,5%, соответственно, $p=0,176$.

Взаимосвязь экспрессии моноцитарного маркера CD64 с наличием ремиссии отсутствовала: $p=0,79$. Аналогичным образом отсутствовала связь частоты ремиссий с экспрессией антигена CD14, $p=0,603$.

Отсутствовала достоверная связь частоты ремиссий с коэкспрессией T-лимфоидного антигена CD7, $p=0,433$.

Антиген CD19 представляет собой мембранный гликопротеин I типа. CD19 – это молекула сигнальной трансдукции, которая в составе В-клеточного рецептора регулирует процесс развития, активации и дифференцировки лимфоцитов; экспрессируется на поверхности всех нормальных В-лимфоцитов,

как предшественников (начиная с про-В-клеток), так и зрелых клеток, а также на нормальных плазматических клетках. Антиген может присутствовать на поверхности фолликулярных дендритических клеток. В части случаев ОМЛ наблюдается коэкспрессия антигена CD19 на бластных клетках ОМЛ.

Связь экспрессии CD19 с частотой достижения ремиссии представлена в таблице 29.

Таблица 29 – Частота достижения ремиссии в зависимости от экспрессии лимфоидно-ассоциированного антигена CD19 ($p=0,024$)

| Наличие ремиссии | Ремиссия не достигнута | Ремиссия достигнута | Всего |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------|
| Случаи ОМЛ без экспрессии CD19 | 16 (18,8%) | 69 (81,2%) | 85 |
| Случаи ОМЛ с коэкспрессией CD19 | 0 | 23 (100%) | 23 |

В группе пациентов, не достигших ремиссии, CD19 не был экспрессирован ни в одном случае, а в группе достигших ремиссии – в 23 случаях (100%), взаимосвязь достоверна, $p=0,024$.

По данным некоторых исследований [151,152,153] существует взаимосвязь экспрессии антигена CD19 с вариантом ОМЛ М2 по ФАБ-классификации. Мы оценили существование этой связи в анализируемой группе 135 больных (Таблица 30).

Таблица 30 – Частота экспрессии CD19 при М2 варианте ОМЛ по ФАБ-классификации и других ФАБ-вариантах ($p=0,003$)

| Вариант по ФАБ | Случаи ОМЛ без экспрессии CD19 | Случаи ОМЛ с коэкспрессией CD19 | Всего |
|----------------------------|---------------------------------------|--|--------------|
| М2-вариант | 24 (63,2%) | 14 (36,8%) | 38 (100%) |
| Остальные ФАБ-варианты ОМЛ | 68 (87,2%) | 10 (12,8%) | 78 (100%) |

Экспрессия антигена CD19 была достоверно ассоциирована с М2 вариантом

ОМЛ (второе чаще, чем при других вариантах) по ФАБ-классификации ($p=0,003$), что соответствует данным литературы.

Аналогичным образом, оценили взаимосвязь экспрессии CD19 с t(8;21) (Таблица 31).

Таблица 31 – Частота экспрессии CD19 при наличии и отсутствии t(8;21) ($p=0,004$)

| | Случаи ОМЛ без экспрессии CD19 | Случаи ОМЛ с экспрессией CD19 | Всего |
|-------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| t(8;21) | 16 (59,3%) | 11 (40,7%) | 27 (100%) |
| Нет t(8;21) | 56 (86,2%) | 9 (13,8%) | 65 (100%) |

Коэкспрессия CD19 на бластных клетках при диагностике была достоверно ассоциирована с наличием t(8;21), $p=0,004$.

Следует отметить, что отсутствовала взаимосвязь коэкспрессии CD19 с общей выживаемостью (проанализировано у 81 пациента, $p=0,67-0,87$).

В группах с наличием и отсутствием ремиссии различий в частоте экспрессии HLADR не получено, $p=0,178$.

Аналогично, не отмечено связи с антигеном CD9, $p=0,398$.

Также не установлено связи экспрессии антигена CD56 с наличием ремиссии у больных ОМЛ, $p=0,288$.

Активационный антиген CD38 не был связан с частотой достижения ремиссии, $p=0,066$.

Аналогичным образом антиген CD36 не был связан с частотой ремиссий, $p=0,371$.

Резюме

Достижение ремиссии после первого курса индукционной химиотерапии является главным фактором благоприятного прогноза при ОМЛ у детей. Отсутствие ремиссии достоверно ухудшает прогноз.

В этой связи очевидной представляется необходимость оценки взаимосвязи экспрессии ряда антигенов бластных клеток с частотой достижения ремиссии. Из

числа этих маркеров особый интерес представляет антиген CD19. Нами установлена его ассоциация с ФАБ-вариантом М2 и t(8;21). Однако, связь с прогнозом - достижением ремиссии имела только экспрессия CD19, а не вариант лейкоза М2 или наличие t(8;21).

При наличии антигена CD19 на бластных клетках частота ремиссий была максимальной по группе ОМЛ и составила 100% (23 пациента). Это означает, что появился наиболее значимый фактор благоприятного иммунологического прогноза при остром миелоидном лейкозе. Вне зависимости от варианта острого миелоидного лейкоза по ФАБ классификации, обнаружение CD19 на бластных клетках свидетельствует о почти 100% вероятности достижения ремиссии. Разумеется, мониторинг МОБ у данной категории больных также необходим, и он может основываться на обнаружении экспрессии лимфоидно-ассоциированного антигена CD19. Мониторинг МОБ позволяет диагностировать возобновление болезни даже при очень малом количестве злокачественных бластных клеток (0,01%), и применение данных технологий позволяет надеяться на эрадикацию ОМЛ в самом начале развития рецидива.

В целом, обобщая данные этой главы, следует отметить, что иммунологические маркеры бластных клеток ОМЛ у детей могут служить важными факторами прогноза, а их мониторинг при МОБ дает основания для разработки новых подходов к эрадикации опухолевых клеток на самых ранних этапах возобновления ОМЛ.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) – это чрезвычайно гетерогенная группа заболеваний. Гетерогенность обусловлена разнообразием морфоцитохимических признаков, имеющих связь с ответом на терапию и прогнозом ОМЛ. Согласно наиболее распространенной среди отечественных онкогематологов франко-американско-британской (ФАБ) классификации выделяют 8 морфоцитохимических вариантов ОМЛ. Частота ОМЛ у детей ниже, чем у взрослых, примерно 15% среди острых лейкозов. Однако гетерогенность такая же как у взрослых. Дальнейшую гетерогенность приносят иммунологические особенности бластных клеток и генетические нарушения, подробно описанные в литературном обзоре.

Учитывая гетерогенность ОМЛ, сложно представить возможность существования некоего унифицированного подхода к диагностике остаточных бластов в процессе лечения, то есть минимальной остаточной болезни (МОБ). Кроме того, при первичной диагностике отнюдь не все маркеры могут быть экспрессированы, а признаки аберрантности могут быть выражены в различной степени.

Наиболее полное представление об иммунологической гетерогенности ОМЛ дает иммунодиагностический подход, разработанный европейским консорциумом Еврофлоу. В нем учтены иммунофенотипические особенности всех вариантов острых миелоидных лейкозов, включая маркеры аберрантности. В качестве каркасных маркеров использованы CD34, CD45, CD117, CD33. Эти маркеры присутствуют в каждой из 8 проб. С учетом аберрантности клеток при диагностике острого лейкоза формировали панели для дальнейшего изучения минимальной остаточной болезни в процессе лечения пациента.

У большинства больных ОМЛ лейкозные миелобласты не обнаруживаются после химиотерапии. Вместе с тем, лейкоз может рецидивировать, что обусловлено персистенцией химиорезистентных клеток, не отличимых морфологически от нормальных гемопоэтических предшественников, то есть из-за сохраняющейся у больного минимальной остаточной болезни. При ОМЛ как у детей, так и у взрослых МОБ является мощным и независимым

прогностическим фактором. Несмотря на важное клиническое значение МОБ, исследование этого показателя не претерпело существенных изменений в последние 10 лет. Обычно МОБ измеряют либо методом ПЦР либо проточной цитометрией. Примерно в 20% случаев ОМЛ у взрослых и в 35% ОМЛ у детей клетки несут химерные гены, такие как *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, или транскрипт *MLL*; мутация *NPM1* встречается в примерно 30% ОМЛ у взрослых и менее 10% ОМЛ у детей. Обнаружение этих аномалий в процессе лечения коррелирует с частотой рецидивов. Проточно-цитометрический мониторинг МОБ также является прогностически важным и в отличие от ПЦР не лимитирован больными со специфическими генетическими аномалиями. Вместе с тем, стандартный проточно-цитометрический мониторинг МОБ по чувствительности обычно не превышает 0,1%. Следует отметить, что возможности современных проточных цитометров определять 8 и более маркеров на каждой клетке могут существенно повысить чувствительность метода в определении МОБ.

Среди генов, имеющих отличия в экспрессии при ОМЛ от нормальных клеток, существуют таковые, характеризующиеся гиперэкспрессией - *WT1* (84.7% случаев), *CD56* (46.5%), *CD7* (38.2%), *CD33* (36.9%), *CD4* (36.3%), *CD14* (30.6%), and *CD19* (28.0%), а *CD34* гипоекспрессирован (36.3%). Гены, описанные ранее как специфичные для лейкозных стволовых клеток, также были включены в скрининг таковых, пригодных для выявления МОБ, проведенный E. Coustain-Smith и соавторами (лаборатория Дарио Кампаны) [161]. Гиперэкспрессия на *CD34+CD38-* клетках ОМЛ отмечена для 18 из 25 генов, описанных Saito, остальные 7 были либо гиперэкспрессированы на менее 25% клеток, либо не изучались. Сходным образом, идентифицированы 16 из 21 гена описанные на стволовых клетках ОМЛ Kikushige et al [166].

При проточно-цитометрическом анализе белков, кодируемых aberrантно экспрессированными генами, в части случаев отмечена различная экспрессия (*CD7*, *CD19*, *CD56*), причем кодируемые белки уже используются в проточно-цитометрическом анализе при изучении МОБ. Для дальнейшего анализа отобрали 24 гена (22 гиперэкспрессированы при ОМЛ, 1 гипоекспрессирован, и 1 в ряде

случаев гиперэкспрессирован, в других гипоекспрессирован. К ним были добавлены CD47, CD123, CD366 (*HAVCR2*, TIM3), и CD371 (*CLEC12A*, CLL-1), которые, как было установлено ранее, были взаимосвязаны со стволовыми клетками ОМЛ. В проведенном генно-экспрессионном анализе CD47 и CD123 были гиперэкспрессированы в менее, чем в трети случаев, что не соответствовало критериям отбора.

После подтверждения специфичности антител с положительными и негативными таргетными клетками протестировали 28 маркеров в 191 случае ОМЛ и 63 образцах костного мозга пациентов, не имевших лейкоза или таковых в ремиссии лейкоза при отсутствии бластных клеток в костном мозге.

Различные группы ученых и клиницистов исследуют возможности диагностики МОБ при ОМЛ. Наиболее авторитетной среди них можно назвать лабораторию D. Campana (США). Эта группа ученых в первой декаде 2000-х годов предложила универсальный подход к диагностике МОБ при ОЛЛ у детей. Принцип основан на том, что на 15-й день терапии индукции ремиссии острого лимфобластного лейкоза в костном мозге не остается нормальных В-линейных предшественников, и все обнаруживаемые В-лимфоидные предшественники являются лейкозными. Данный подход прост и нашел широкое применение в диагностике МОБ при ОЛЛ.

Многое сделано этими авторами и в области МОБ при ОМЛ. Авторы, во-первых, сравнили экспрессию ряда генов на клетках ОМЛ с таковой на нормальных миелобластах. Выявлены 22 маркера, которые были aberrантно экспрессированы - CD9, CD18, CD25, CD32, CD44, CD47, CD52, CD54, CD59, CD64, CD68, CD86, CD93, CD96, CD97, CD99, CD123, CD200, CD300a/c, CD366, CD371, CX3CR1. Кроме того, оценили экспрессию этих маркеров на незрелых CD34+CD38- клетках. Экспрессия данных антигенов была стабильной в процессе лечения. Использование маркеров у 52 больных ОМЛ позволило осуществлять мониторинг МОБ и получить прогностически важные результаты. При этом чувствительность метода составила 1 лейкозная клетка на 100 000 нормальных миелокариоцитов. Интересно отметить, что в примененном нами подходе,

основанном на концепции Еврофлоу ряд этих маркеров используется при первичной иммунофенотипической диагностике ОМЛ – CD9, CD25, CD64, CD123, CD300. Разумеется, экспрессия CD34 и CD38 также учитывается.

Полученные в работе E. Coustain-Smith et al. (2018) [161] результаты свидетельствовали о надежности установленных маркеров для диагностики МОБ. Это положение было проверено на 190 образцах костного мозга и 18 образцах периферической крови от 52 больных ОМЛ (35 детей, 17 взрослых) в ходе лечения (68 в конце первого или второго цикла индукции ремиссии, 140 в более поздние сроки). У всех 52 больных по меньшей мере один маркер был аномально экспрессирован при диагностике. Использовали 8-маркерную панель антител, включая маркеры, установленные в этой работе плюс CD34, CD117, CD45, CD33 (все эти маркеры в нашей работе также использованы). Отмечена очень хорошая корреляция новых выявленных маркеров со стандартными. Установлено, что химиотерапия не ведет к ложноотрицательным результатам при определении МОБ с использованием этих маркеров. Здесь очень важно подчеркнуть, что исследование E. Coustain-Smith et al. (2018) не проводилось при диагностике ОМЛ. Если бы этот факт был учтен, то, возможно, было бы констатировано диагностическое значение маркеров в процессе лечения, речь бы не шла о том, что по крайней мере один из маркеров был положителен.

Важно отметить, что отобранные E. Coustain-Smith et al. (2018) маркеры улучшали разграничение лейкозных и нормальных клеток. Для доказательства этого факта индивидуальные образцы были окрашены либо наиболее отчетливыми стандартными маркерами (CD13, CD133, CD38), либо наиболее четкими дополнительными маркерами (CD9, CD44, CD54). Как стандартные, так и дополнительные маркеры комбинировали с CD34, CD117, CD45, CD33, позволяющими распознавать незрелые миелоидные клетки. Дополнительные маркеры позволяли четко разграничивать клетки ОМЛ от нормальных клеток, однако отмечен перекрест с наилучшими стандартными маркерами. На наш взгляд, данный перекрест указывает на то, что использование дополнительных маркеров было в ряде случаев излишним, так как нужную информацию можно

было получить и с использованием стандартных маркеров. Мы в своей работе из числа перечисленных маркеров использовали CD13, CD38, CD9, CD34, CD117, CD45, CD33. Иными словами, нами не использованы только CD133, CD44, CD54, диагностическая роль МОБ для которых нуждается в дальнейшем подтверждении.

Помимо этого, авторы (E.Coustain-Smith et al., 2018) использовали tSNE (автоматизированный программный подход) для визуализации данных МОБ в образцах костного мозга двух больных ОМЛ в морфологической ремиссии в процессе терапии. Одну аликвоту больного метили 4 доступными стандартными маркерами (CD38, CD133, CD7, и HLA-DR), а другую аликвоту – двумя маркерами, установленными в данной работе (CD52 и CD47), а также CD34, CD117, CD45 и CD33. Отмечен значительный перекрест клеток ОМЛ с нормальными незрелыми миелоидными клетками, несмотря на использование 4 стандартных маркеров МОБ. Напротив, клеточные популяции четко разграничивались с помощью CD52 и CD47. Второй образец показал преимущество использования CD96 в добавление к стандартному маркеру (CD7), что позволило установить 0.04% МОБ. Разумеется, это важные данные, но их значимость необходимо подтвердить при проведении группового анализа, так как использование клеток только одного больного не может служить указанием на необходимость использования соответствующих маркеров при проведении диагностики МОБ у всех больных ОМЛ. Исследование в динамике ответа на лечение, то есть мониторинг МОБ, необходимо для подхода, называемого «прецизионной медициной» в процессе лечения ОМЛ. Единственной опцией мониторинга большинства больных с ОМЛ является проточно-цитометрическая детекция маркеров, абберрантно экспрессированных лейкозными клетками. Успех данного подхода зависит от идентификации клеточных маркерных профилей, которые отличаются от таковых на нормальных клетках. Результаты геномного и проточно-цитометрического анализов в сочетании с данными предшествующих исследований позволили лаборатории D.Campana (Coustain-Smith et al., 2018) обнаружить 22 перспективных маркера для диагностики МОБ в процессе лечения

ОМЛ.

Авторы (E.Coustain-Smith et al., 2018) делают вывод, что использование дополнительных маркеров делает возможной оценку МОБ у больных, не имеющих согласно традиционным методам лейкоз-ассоциированных иммунофенотипов. Доказано, что всего лишь 5 маркеров (Таблицы 32, 33) было достаточно для диагностики МОБ в 94,6% случаев ОМЛ (122 из 129).

Таблица 32 – Стандартная панель маркеров для определения МОБ при ОМЛ

| Флуорохромы, антитела (CD) | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------|------------|-------|-------|----------|--------|----------------|----------------|
| № пробы | FITC | PE | PerCP | APC | (Ctrl) ▾ | APC-H7 | BV421 или v450 | BV510 или v500 |
| | | | | | PE-Cy7 | | | |
| 1 | CD13 | CD133 | CD34 | CD117 | CD33 | CD45 | CD38 | HLA-DR |
| 2 | CD15 | CD56 | CD34 | CD117 | CD33 | CD45 | CD19 | 4 |
| 3 | CD7 | NG2 | CD34 | CD117 | CD33 | CD45 | CD11b | HLA-DR |
| 4 | Mouse IgG2a | Mouse IgG1 | CD34 | CD117 | CD33 | CD45 | CD41a | Mouse IgG1 |

Таблица 33 – Предлагаемая панель антител для определения МОБ при ОМЛ, включающая новые маркеры

| Флуорохромы, антитела (CD) | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|--------|--------|-------------------------------------|-------|
| № пробы | FITC | PE | PerCP | APC | PE-Cy7 | APC-H7 | BV 421 | BV510 |
| | | | | | | | | |
| 2 | CD97 | CD18 | CD34 | CD117 | CD33 | CD45 | CD99 | |
| 3 | Мыш иные IgG1 или IgG2b | Мыш иные IgG1 или IgG2b | CD34 | CD117 | CD33 | CD45 | Мыш иные IgG1 или IgG2b | |

Дополнение этими маркерами стандартной панели позволило существенно улучшить диагностику МОБ при ОМЛ. Чувствительность метода составила 1 клетка ОМЛ среди 10000 нормальных миелокариоцитов. Лейкоз-ассоциированные маркеры, обычно используемые для изучения МОБ при ОМЛ, идентифицированы эмпирически, в основном, путем установления проточно-цитометрических иммунофенотипов при диагностике ОМЛ. Использованный в работе Coustain-Smith E. et al. (2018) анализ с учетом различий в генной экспрессии нормальных и лейкозных клеток позволил установить новые маркеры для определения МОБ при ОМЛ.

У больных ОМЛ улучшение оценки ответа на лечение может помочь в предсказании рецидива и оптимизации терапии. Таким образом, измерение уровней МОБ в ключевых точках химиотерапии может прояснить решения относительно интенсивности последующей химиотерапии и необходимости аллоТГСК. Маркеры, установленные в работе, были стабильны в процессе химиотерапии и были экспрессированы в рецидиве.

Несомненно, применение большей панели маркеров при диагностике и в процессе лечения ОМЛ повышает чувствительность, надежность и дает основания к более широкому внедрению исследования МОБ у детей, что имеет важное значение в улучшении прогноза при данном заболевании.

Интересно остановиться на том, насколько использованные в нашей работе маркеры, моноклональные антитела, соответствуют таковым, применяемым в диагностике МОБ в международных исследованиях.

Во-первых, следует оговориться, что ни в одном из выше перечисленных протоколов нет упоминания о том, что определение МОБ при ОМЛ должно проводиться в пределах ядросодержащих клеток. Это серьезный недочет, так как примесь эритроцитов, тромбоцитов, обломки клеток и т.п. могут серьезно повлиять на результат, поскольку количество событий в знаменателе будет более высоким, и велик риск получения ложноотрицательного результата.

Предложенные в литературе стандартные панели для диагностики МОБ на основе незрелых клеток включают CD117, CD34, CD33, CD45. Эти маркеры

используются как каркасные при диагностике МОБ и могут быть дополнены маркерами, характеризующими особенности иммунофенотипа у конкретного больного или рекомендованными к использованию авторитетными группами ученых, например, лабораторией D.Campana (E. Coustain-Smith et al., 2018). В нашей работе детально изучен иммунофенотип ОМЛ при диагностике, в который входили антитела – CD45, CD34, CD117, CD33. В дальнейшем панель диагностики МОБ при ОМЛ формировалась с учетом, в первую очередь, маркеров линейной принадлежности ОМЛ (особенно это необходимо при монобластных вариантах, а также М6, М7, из предшественников плазмощитоидных дендритных клеток), маркеров несвойственных миелоидным клеткам линий (в первую очередь, Т-клеточных, В-линейных и т.д.). Разумеется, при диагностике были использованы линейно не рестриктированные маркеры – CD38, CD9, HLA-DR и т.д.). Подобный комплексный подход является, пожалуй, наиболее широким и всеобъемлющим в отработке критериев МОБ в зависимости от первичного иммунофенотипа бластных клеток.

Следует отметить, что для оценки МОБ при ОМЛ необходимо широкое использование маркеров при первичной диагностике лейкоза. Этим требованиям в полной мере отвечает панель антител Еврофлоу, включающая ориентационную пробу (8 антител) и 7 пробирок (в каждой 8 маркеров) для верификации варианта ОМЛ. То есть, 64 антитела были использованы при диагностике варианта ОМЛ. В действительности, количество антител было меньше, так как 4 маркера использовались в качестве каркасных, однако, факт того, что в каждой пробе они изучались в комбинации с другими маркерами, делает возможным определение огромного числа сочетаний.

Применение данного подхода оказалось плодотворным. Одним из важнейших выводов проведенной работы явилось то, что применение какого-либо универсального подхода для диагностики МОБ при ОМЛ не является на сегодняшний день обоснованным. Более точным является применение критериев Европейского консорциума Еврофлоу для первичной диагностики ОМЛ и выбор маркеров для последующего мониторинга МОБ. Мы практически не наблюдали

повторения aberrантных иммунофенотипов в исследованной нами группе детей с ОМЛ.

Важно то, что при диагностике МОБ оцениваются остаточные клетки диагностированного ранее лейкоза. По этой причине линейная принадлежность бластных клеток сохраняется. Это важно для мониторинга монобластных, эритробластных, мегакариобластных, бластных из предшественников плазмцитоподобных дендритных клеток лейкозов. Конечно, возможна смена клона или преобладание минорного клона, более резистентного к проводимой терапии, однако, это скорее исключение, чем правило.

Особое значение имеют маркеры несвойственных линий (Т-линейные, В-линейные) в характеристике первичного иммунофенотипа ОМЛ и последующем мониторинге МОБ. В нашей работе сделан вывод о важной роли данных маркеров. Однако в случаях их экспрессии при особых вариантах ОМЛ (эритробластные, мегакариобластные и т.д.) утрата данных антигенов еще не свидетельствует о МОБ-негативном статусе. Бластные клетки, экспрессирующие маркеры соответствующей линии, могут дать большую информацию о МОБ, чем коэкспрессия CD7 или иных маркеров несвойственных линий.

Следует отметить, что диагностика МОБ при ОМЛ – это чрезвычайно трудоемкий процесс, требующий, как хорошей оснащенности лаборатории оборудованием и антителами, так и подготовленного персонала, ориентированного в особенностях aberrантностей иммунофенотипа бластных клеток ОМЛ. Напомним, в этой связи, что даже экспрессия ряда каркасных антигенов может и должна восприниматься в контексте особенностей иммунофенотипа клеток различных линий. Так сочетание маркеров CD34-CD117-HLA-DR+ характерно для моноцитов и предшественников плазмцитоподобных дендритных клеток, а сочетание CD34+CD117+HLA-DR+ - для предшественников нейтрофилов и эритроцитов. Даже этот упрощенный иммунофенотипический пример демонстрирует возможности оценки aberrантности клеток МОБ с учетом линейной принадлежности бластов ОМЛ при диагностике.

А теперь обратимся к разбору различных вариантов aberrантности при

Все варианты иммунофенотипов разобрать почти невозможно, так как в анализируемой группе пациентов представлены практически любые комбинации антигенов. Это является дополнительным подтверждением того, что очень сложно, а на наш взгляд практически невозможно создать универсальную панель антител для диагностики ОМЛ, которая могла быть применима в большинстве случаев заболевания при мониторинге МОБ. Конечно, некоторые антигены встречаются крайне редко. В нашем исследовании к таковым были отнесены TdT, CD16, CD10, CD300, CD4, CD14, которые не встречались в нашем исследовании или имели место лишь у 1 больного. Однако именно это повышает ценность исследования, ведь в случае ориентации на наиболее частые маркеры эти признаки могли быть пропущены, а в их числе – TdT и CD300. Как видно из таблицы, применение подхода, основанного на концепции Еврофлоу, позволяет диагностировать и так называемые лейкозы из стволовых лейкоэмических клеток CD34+CD38-, таковых в нашем исследовании оказалось 3 (№№ 4, 15, 16).

Таким образом, применение подхода, основанного на концепции Еврофлоу, 8-цветной проточной цитометрии с использованием 7 панелей моноклональных антител для первичной диагностики ОМЛ, можно считать оправданным. Это позволяет уже на диагностическом этапе сформировать набор маркеров, которые будут в дальнейшем использованы для оценки эффективности терапии, оценки МОБ у конкретного пациента.

Важно отметить ещё и тот факт, что в работе оценили прогностическое значение используемых иммунологических маркеров. Установлено, что ряд из них (CD19, CD33) достоверно ассоциирован с благоприятным прогнозом, большей частотой достижения ремиссий. Это позволяет при мониторинге МОБ целенаправленно следить за исчезновением тех или иных лейкозных клонов, делая акцент в усилении терапии на более резистентные популяции лейкозных клеток.

Несомненно, важным явилось также установление порогового уровня 0,1% для МОБ-позитивности, как имеющего близкую к достоверной взаимосвязь с прогнозом, длительностью безрецидивного периода. Это позволяет считать

уровень МОБ значимым критерием деления больных на группы риска. В условиях современной интенсивной терапии ОМЛ многие факторы прогноза утратили свое значение, и установление роли МОБ в прогнозе ОМЛ может оказаться чрезвычайно важным в дальнейшем индивидуализированном подходе к лечению этого грозного заболевания у детей.

Завершая обсуждение и подводя итог проделанной работе, следует отметить, что она была комплексной и включала клинический, морфо-цитохимический и иммунофенотипический аспекты. Основной акцент сделан на иммунофенотипировании бластных клеток с использованием наиболее современного на сегодняшний день подхода, предложенного Европейским консорциумом Еврофлоу. На наш взгляд именно развитие данного подхода и углубленное понимание роли различных маркеров аберрантности или иных особенностей иммунофенотипа лейкозных клеток при диагностике ОМЛ позволят наиболее точно следить за процессом на всех этапах лечения, мониторировать остаточную болезнь и эффективно с ней бороться.

ВЫВОДЫ

1. Проточно-цитометрическая оценка эффективности терапии острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) индивидуальна и основывается на особенностях иммунофенотипа опухолевых клеток. Необходима подробная оценка иммунофенотипа бластных клеток пациента при диагностике острого миелоидного лейкоза для достоверного определения количества остаточных опухолевых клеток – минимальной остаточной болезни (МОБ).

2. Наиболее частым признаком aberrантности ОМЛ у детей является экспрессия лимфоидно-ассоциированных антигенов (CD7 – 24,2%, CD19 – 21,3%), а также экспрессия CD56 – 34,8%.

3. Особую группу ОМЛ у детей представляют редкие варианты лейкозов – мегакариобластные и опухоль из бластных предшественников плазмцитоподобных дендритных клеток, мониторинг МОБ при которых может осуществляться на основании линейной принадлежности бластных клеток – мегакариобластной (CD61, CD41, CD42), плазмцитоподобных дендритных клеток (CD123, CD4, CD56 при отсутствии маркеров других клеточных линий) в сочетании с маркерами aberrантности, выявленными при диагностике.

4. Экспрессия лимфоидно-ассоциированного антигена CD7 встречается на широком спектре вариантов ОМЛ у детей – эритробластных (M6), мегакариобластных (M7), миелобластных, миеломонобластных (M4). Персистенция CD7 на бластных клетках больного свидетельствует о наличии МОБ у больного.

5. Диагностическая панель при оценке МОБ при миелоидных вариантах ОМЛ (M0-M2) у детей должна базироваться на экспрессии маркеров CD45 (гейтирование клеток-предшественников), CD117 (миелоидные предшественники), CD34 (стволовые гемопоэтические клетки), CD33 (пан-миелоидный антиген) в пределах ядродержащих клеток костного мозга с учетом aberrантной экспрессии антигенов, установленной при диагностике ОМЛ.

6. Персистенция МОБ в сочетании с другими факторами

неблагоприятного прогноза может являться критерием рестратификации больных в группу более высокого риска.

7. Диагностика минимальной остаточной болезни при опухоли из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток должна основываться не только на признаках аберрантности, но и на соотношении $CD123^+CD4^+CD56^+$ / $CD123^+CD4^+CD56^-$ клеток.

8. Достижение костномозговой ремиссии у больных ОМЛ не взаимосвязано с возрастом, полом больных и морфо-цитохимическим вариантом заболевания. При уровнях МОБ выше 0,1% отмечены более низкие показатели безрецидивной выживаемости (различия близки к достоверным, $p=0,09$).

9. Иммунофенотипические особенности бластных клеток острых миелоидных лейкозов у детей имеют прямую взаимосвязь с эффективностью терапии – достижением ремиссии: экспрессия CD19 на бластных клетках ОМЛ у детей характеризует группу благоприятного прогноза – частота ремиссий 100% (в CD19 - негативной группе – 81,2%), $p=0,024$.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АллоТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- АутоТГСК – аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- БРВ – безрецидивная выживаемость
- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
- Гр – Грей
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ЛАИФ – лейкоз-ассоциированный иммунофенотип
- ЛСК – лейкемические стволовые клетки
- МДС – миелодиспластический синдром
- МОБ – минимальная остаточная болезнь
- МПО – миелопероксидаза
- НИИДОГ – Научно-исследовательский институт детской онкологии и гематологии
- ОБПДК – опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток
- ОВ – общая выживаемость
- ОмегаЛ – острый мегакариобластный лейкоз
- ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
- ПДК – плазмцитоподобные дендритные клетки
- ПР – полная ремиссия
- ПХТ – полихимиотерапия
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТАМ – транзиторный аномальный миелопоэз
- уМКП – унипотентный мегакариоцитарный предшественник
- ФАБ – классификация – Франко-Американо-Британская классификация
- ALOT – acute leukemia orientation tube – ориентационная проба для определения линейности острого лейкоза
- ЕВМТ – European Group for Bone Marrow Transplant – Европейское общество по трансплантации костного мозга

NGS – next generation sequencing – секвенирование нового поколения

TdT – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Масчан, А.А. Клинические рекомендации «Острые миелоидные лейкозы» / А.А. Масчан, М.А. Масчан, Г.А. Новичкова и др. // Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2020, 80 С.
2. Rubnitz, J.E. Current Management of Childhood Acute Myeloid Leukemia / E.J. Rubnitz // *Pediatr Drugs*. – 2017. – Vol. 19(1). – P.1-10. doi: 10.1007/s40272-016-0200-6.
3. Bennett, J.M. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group / J.M. Bennett, D. Catovsky, M.T. Daniel et al. // *Br. J. Haematol.* – 1976. – Vol. 33(4). – P. 451-458. doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
4. Bennett, J. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French – American – British Group // J. Bennett, D. Catovsky, M. Daniel et al. // *Ann. Intern. Med.* – 1985. – Vol. 103. – P. 620-625.
5. Луговская, С.А. Гематологический атлас / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь. – 4-е издание. – Москва-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2016, 434 С.
6. Swerdlow, S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / Eds. S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris et al. – revised 4th ed.: IARC. – Lyon, 2017, 585 P.
7. Swerdlow, S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris et al. – Lyon, France: IARC Press, 2008, 439 P.
8. Огороков, А. Диагностика болезней внутренних органов. Книга 5-1 / А. Огороков. – Москва: Медицинская литература, 2019. –700 С.
9. Von Boros, J. Uber einen fall von akuter megakaryocyblastenleukämie, zugleich einige bemerkungen zum Problem des akuten leukämie / J. Von Boros, A. Korenyi // *Z. Klin. Med.* – 1931. – Vol. 118. –679-718 P.
10. Hahn, A.W. Acute megakaryocytic leukemia: What have we learned / A.W Hahn, B. Li, Ph. Prouet et al. // *Blood Rev.* – 2016. – Vol. 30(1). – P. 49-53. –

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.07.005>.

11. Breton-Gorius, J. Megakaryoblastic acute leukemia: identification by the ultrastructural demonstration of platelet peroxidase / J. Breton-Gorius, F. Reyes, G. Duhamel et al. // *Blood*. – 1978. – Vol. 51. – P. 45-60.

12. Gassmann, W. Acute megakaryoblastic leukemia / W. Gassmann, H. Löffler // *Leuk. Lymphoma*. – 1995. – Vol. 18. – Suppl.1. – P. 69-73. doi: 10.3109/10428199509075307.

13. O'Brien, M.M. Prognostic features in acute megakaryoblastic leukemia in children without Down syndrome: a report from the AML02 multicenter trial and the Children's Oncology Group study POG 9421 / M.M. O'Brien, X. Cao, S. Pounds et al. // *Leukemia*. – 2015. – Vol. 344 (6188). – P. 1173-1178.

14. Lange, B.J. Distinctive Demography, Biology, and Outcome of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome in Children With Down Syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891 / B.J. Lange, N. Koblinsky, D.R. Barnard et al. // *Blood*. – 1998. – Vol. 91. – Iss. 2. – P. 608-615. – URL: <https://doi.org/10.1182/blood.V91.2.608>.

15. Carroll, A. The t(1;22) (p13;q13) is nonrandom and restricted to infants with acute megakaryoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study / A. Carroll, C. Civin, N. Schneider et al. // *Blood*. – 1991. – Vol. 78(3). – P. 748-752.

16. Dastugue, N. Cytogenetic profile of childhood and adult megakaryoblastic leukemia (M7): a study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH) / N. Dastugue, M. Lafage-Pochitaloff, M.P. Pagès et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – Iss. 2. – P. 618-626. ISSN 0006-4971. – URL : <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0241>.

17. Masettia, R. The changing scenario of non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia in children / R. Masettia, V. Guidia, L. Ronchinia et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2019. – Vol. 138. – P. 132-138. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.04.011.

18. De Marchi, F. Molecular features, prognosis, and novel treatment options for pediatric acute megakaryoblastic leukemia / F. De Marchi, M. Araki, N. Komatsu //

Expert Rev. Hematol. – 2019. – Vol. 12(5). – P. 285-293. DOI: 10.1080/17474086.2019.1609351.

19. Orazi, A. Acute panmyelosis with myelofibrosis: an entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia / A. Orazi, D. O'Malley, J. Jiang et al. // Mod. Pathol. – 2005. – Vol. 18. – P. 603-614. – URL: <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800348>.

20. Mercher, T. Recurrence of OTT-MAL fusion in t(1;22) of infant AML-M7 / T. Mercher, M. Busson-Le Coniat, F. Nguyen Khac et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2002. – Vol. 33(1). – P. 22-28.

21. Roberts, I. GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: Identification of a population at risk of leukemia / I. Roberts, K. Alford, G. Hall et al. // Blood. – 2013. – Vol. 122(24). – P. 3908-3917.

22. Wechsler, J. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome / J. Wechsler, M. Greene, M.A. McDevitt et al. // Nat. Genet. – 2002. – Vol. 32(1). – P. 148-152.

23. Maclean, G.A. Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic human pluripotent cells / G.A. Maclean, T.F. Menne, G. Guo et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109(43). – P. 17567-17572.

24. Yoshida, K. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders / K. Yoshida, T. Toki, Y. Okuno et al. // Nat. Genet. – 2013. – Vol. 45(11). – P. 1293-1299.

25. Solomon, D.A. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: From discovery to clinical significance / D.A. Solomon, J.S. Kim, T. Waldman et al. // BMB Rep. – 2014. – Vol. 47(6). – P. 299-310.

26. Pagano, L. Acute megakaryoblastic leukemia: experience of GIMEMA trials / L. Pagano, A. Pulsoni, M. Vignetti et al. // Leukemia. – 2002. – Vol. 16. – P. 1622-1626. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402618>.

27. Oki, Y. Adult acute megakaryocytic leukemia: an analysis of 37 patients treated at M.D. Anderson Cancer Center / Y. Oki, H.M. Kantarjian, X. Zhou et al. // Blood. – 2006. – Vol. 107. – Iss. 3. – P. 880-884. – ISSN 0006-4971. – URL : <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2450>.

28. Giri, S. Acute megakaryocytic leukemia is associated with worse outcomes than other types of acute myeloid leukemia / S. Giri, R. Pathak, P. Prouet et al. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124, Iss. 25. – P. 3833-3834. – ISSN 0006-4971. – URL : <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603415>.

29. Garderet, L. Hematopoietic stem cell transplantation for de novo acute megakaryocytic leukemia in first complete remission: a retrospective study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) / L. Garderet, M. Labopin, N. Gorin et al. // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, Iss. 1. – P. 405-409. – ISSN 0006-4971. – URL : <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1103>.

30. Canaani, J. Minimal residual disease status predicts outcome of acute myeloid leukaemia patients undergoing T-cell replete haploidentical transplantation. An analysis from the Acute Leukaemia Working Party (ALWP) of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) / J. Canaani, M. Labopin, X.J. Huang et al. // *Br. J. Haematol.* – 2018. – Vol. 183(3). – P. 411-420. doi: 10.1111/bjh.15540.

31. Buckley, S.A. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a metaanalysis) / S.A. Buckley, B.L. Wood, M. Othus et al. // *Haematologica*. – 2017. – Vol. 102. – P. 865-873. – режим доступа: <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.159343>.

32. Nagler, A. Measurable residual disease (MRD) testing for acute leukemia in EBMT transplant centers: a survey on behalf of the ALWP of the EBMT / A. Nagler, F. Baron, M. Labopin et al. // *Bone Marrow Transplant*. – 2021. – Vol. 56(1). – P. 218-224. doi: 10.1038/s41409-020-01005-y.

33. Gilleece, M.H. Measurable residual disease, conditioning regimen intensity, and age predict outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: A registry analysis of 2292 patients by the Acute Leukemia Working Party European Society of Blood and Marrow Transplantation / M.H. Gilleece, M. Labopin, I. Yakoub-Agha et al. // *Am. J. Hematol.* – 2018. – Vol. 93(9). – P. 1142-1152. doi: 10.1002/ajh.25211.

34. Pagano, L. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: Diagnostic criteria and therapeutical approaches / L. Pagano, C.G. Valentini, S. Grammatico et al. //

Br. J. Haematol. – 2016. – Vol. 174. – P. 188-202.

35. Facchetti, F. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / eds. F. Facchetti, D.M. Jones, T. Petrella et al. – Revised. – 4th ed. – Lyon France: IARC Press, 2017. – P. 174-177. – World Health Organization Classification of Tumours. – vol. 2.

36. Petrella, T. Agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasm' (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56+ precursor cells related to plasmacytoid monocytes / T. Petrella, M.R. Comeau, M. Maynadié et al. // Am. J. Surg. Pathol. – 2002. – Vol. 26 (7). – P. 852-862.

37. 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). – P. 392-404.

38. Petrella, T. Tumoral aspects of plasmacytoid dendritic cells: what do we know in 2009? / T. Petrella, F. Facchetti // Autoimmunity. – 2010. – Vol. 43 (3). – P. 210-214.

39. Facchetti, F. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / eds. F. Facchetti, D.M. Jones, T. Petrella et al. – 4th ed. – Lyon France: IARC Press, 2008. – P. 146-147. – World Health Organization Classification of Tumours. – vol. 2.

40. Jacob, M.C. CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells / M.C. Jacob, L. Chaperot, P. Mossuz et al. // Haematologica. – 2003. – Vol. 88(8). – P. 941-955.

41. Petrella, T. Blastic NK-cell lymphomas (agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasms): a review / T. Petrella, M. Bago, R. Willemze et al. // Am. J. Clin. Pathol. – 2005. – Vol. 123. – P. 662-675.

42. Feuillard, J. Clinical and biologic features of CD4 +CD56 + malignancies / J. Feuillard, M.C. Jacob, F. Valensi et al. // Blood. – 2002. – Vol. 99. – P. 1556-1563.

43. Garnache-Ottou, F. Plasmacytoid dendritic cell leukaemia/ lymphoma: towards a well-defined entity? / Garnache- F. Ottou, J. Feuillard, P. Saas // Br. J. Haematol. – 2007. – Vol. 136. – P. 539-548.

44. Jegalian, A.G. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications / A.G. Jegalian, N.P. Buxbaum, F. Facchetti et al. // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95. – P. 1873-1879.
45. Shi, Y. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a clinicopathologic review / Y. Shi, E. Wang // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2014. – Vol. 138 (4). – P. 564-569.
46. Facchetti, F. Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms / F. Facchetti // *Knowles Neoplastic Hematopathology* / eds. by A. Orazi, L.M. Weiss, K.A. Foucar, Knowles D.M. – 3rd Edition. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2017. – P. 223.
47. Facchetti, F. Neoplasms derived from plasmacytoid dendritic cells / F. Facchetti, M. Cigognetti, S. Fisogni et al. // *Modern Pathol.* – 2016. – Vol. 29. – P. 98-111.
48. Gopcsa, L. Extensive flow cytometric characterization of plasmacytoid dendritic cell leukemia cells / L. Gopcsa, A. Banyai, K. Jakab et al. // *Eur. J. Haematol.* – 2005. – Vol. 75. – P. 346-351.
49. Petrella, T. TCL1 and CLA expression in agranular CD4/ CD56 hematodermic neoplasms (blastic NK-cell lymphomas) and leukemia cutis / T. Petrella, C.J. Meijer, S. Dalac et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2004. – Vol. 122. – P. 307-313.
50. Савченко, В.Г. Острые лейкозы / В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова // *Клиническая онкогематология: руководство для врачей* / Под ред. М.А. Волковой. – 2-е изд., перераб. и доп. – 2007. – С. 409-502.
51. Паровичникова, Е.Н. Клинический протокол ОМЛ-01.10 по лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / Е.Н. Паровичникова, Г.А. Клясова, А.Н. Соколов и др. // *Программное лечение заболеваний крови* / Под ред. В.Г. Савченко. – Москва: Практика, 2012. – С. 153-207.
52. Тупицын, Н.Н. Проточная цитометрия в онкогематологии / Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Гривцова, Н.А. Купрышина. Часть I. Основы и нововведения в диагностике острых лейкозов // *Клиническая онкогематология*. – 2012. – Т. 5, № 1.
53. Buldini, B. Flow-Cytometric Monitoring of Minimal Residual Disease in

Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia: Recent Advances and Future Strategies. / B. Buldini, M. Maurer-Granofszky, E. Varotto et al. // *Front Pediatr.* – 2019. – Vol. 117. – P. 412. doi: 10.3389/fped.2019.00412.

54. Papaemmanuil, E. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. / E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Bullinger et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 374(23). – P. 2209-2221. doi: 10.1056/NEJMoa1516192.

55. 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 et al. // *Blood.* – 2018. – Vol. 131(12). – P. 1275-1291.

56. Jongen-Lavrencic, M. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia / M. Jongen-Lavrencic, T. Grob D. Hanekamp et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – Vol. 378. – P. 1189-1199.

57. Van Dongen, J.J. EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes / J.J. Van Dongen, L. Lhermitte, S. Böttcher et al. // *Leukemia.* – 2012. – Vol. 26(9). – P. 1908-1975. doi: 10.1038/leu.2012.120.

58. Inaba, H. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia / H. Inaba, E. Coustan-Smith, X. Cao et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30(29). – P. 3625-3632. doi: 10.1200/JCO.2011.41.5323.

59. Loken, M.R. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group / M.R. Loken, T.A. Alonzo, L. Pardo et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120(8). – P. 1581-1588. doi: 10.1182/blood-2012-02-408336.

60. Döhner, H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade et al. // *Blood.* – 2017. – Vol. 129(4). – P. 424-447.

61. Hourigan, C.S. Measurable residual disease testing in acute myeloid

leukaemia / C.S. Hourigan, R.P. Gale, N.J. Gormley et al. // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 31(7).1482-1490. doi: 10.1038/leu.2017.113

62. Kern, W. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML / W. Kern, U. Bacher, C. Haferlach et al. // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2010. – Vol. 23(3). – P. 379-390.

63. Buccisano, F. The emerging role of measurable residual disease detection in AML in morphologic remission / F. Buccisano, L. Maurillo, G.J. Schuurhuis et al. // *Semin. Hematol.* – 2019. – Vol. 56(2). – P. 125-130. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.09.001.

64. 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 et al. // *Haematologica*. – 2017. – Vol. 102(5). – P. 865-873. doi: 10.3324/haematol.2016.159343.

65. Campana, D. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia / D. Campana, E. Coustan-Smith // *Acta Haematol.* – 2004. – Vol. 112(1-2). – P. 8-15. doi: 10.1159/000077554.

66. Campana, D. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation / Campana D, Leung W. // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 162(2). – P. 147-161.

67. Lacombe, F. Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL). Prognostic value of multicenter flow cytometry harmonized assessment of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia / F. Lacombe, L. Campos, K. Allou et al. // *Hematol. Oncol.* – 2018. – Vol. 6(2). – P. 422-428. doi: 10.1002/hon.2488.

68. Grimwade, D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? / D. Grimwade, S.D.Freeman // *Blood*. – 2014. – Vol. 124(23). – P. 3345-3355. doi: 10.1182/blood-2014-05-577593.

69. Loken, M.R. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group / M.R. Loken, T.A. Alonzo, L. Pardo et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 120(8). – P. 1581-1588.

70. Harris, R. Leukaemia antigens and immunity in man / R. Harris // *Nature*. – 1973. – Vol. 241(5385). – P. 95-100. doi: 10.1038/241095a0.
71. Baker, M.A. Specificity of heteroantisera to human acute leukemia-associated antigens / M.A. Baker, K. Ramachandar, R.N. Taub // *J. Clin. Invest.* – 1974. – Vol. 54(6). – P. 1273-1278. doi: 10.1172/JCI107872.
72. Greaves, M.F. Proceedings: surface antigens of leukaemic cells / M.F. Greaves // *Br. J. Cancer*. – 1975. – Vol. 32. – P. 280-281.
73. Greaves, M.F. Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: their relationship to presentation features and prognosis / M.F. Greaves, G. Janossy, J. Peto et al. // *Br. J. Haematol.* – 1981. – Vol. 48(2). – P. 179-197.
74. San Miguel, J.F. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients / J.F. San Miguel, A. Martínez, A. Macedo et al. // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – P. 2465-2470.
75. 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 et al. // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – P. 1746-1751.
76. Al-Mawali, A. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry / A. Al-Mawali, D. Gillis, P. Hissaria et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2008. – Vol. 129. – P. 934-945.
77. 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 et al. // *Bone Marrow Transplant*. – 2014. – Vol. 49(9). – P. 1129-1138. doi: 10.1038/bmt.2014.99.
78. Bachas, C. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse / C. Bachas, G.J. Schuurhuis, Y.G. Assaraf et al. // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26. – P. 1313-1320.

79. Terwijn, M. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia / M. Terwijn, W. Zeijlemaker, A. Kelder et al. // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9(9). – e107587. doi:10.1371/journal.pone.0107587
80. Van Rhenen, A. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival / A. Van Rhenen, N. Feller, A. Kelder et al. // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11(18). – P. 6520-6527. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0468.
81. Olney, H.J. Unique balanced chromosome abnormalities in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an international workshop / H.J. Olney, F. Mitelman, B. Johansson et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2002. – Vol. 33(4). – P. 413-423. doi: 10.1002/gcc.10045.
82. Grimwade D, Mrózek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia / D. Grimwade, K. Mrózek // Hematol. Oncol. Clin. North Am. – 2011. – Vol. 25(6). – P. 1135-1161. vii. doi: 10.1016/j.hoc.2011.09.018.
83. Zhang, Y. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia / Y. Zhang, J.D. Rowley // DNA Repair (Amst). – 2006. – Vol. 5(9-10). – P. 1282-1297. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.020.
84. Wen, H. New fusion transcripts identified in normal karyotype acute myeloid leukemia / H. Wen, Y. Li, S.N. Malek // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(12). – e51203. doi: 10.1371/journal.pone.0051203.
85. Yan, M. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis / M. Yan, E. Kanbe, L.F. Peterson et al. // Nat. Med. – 2006. – Vol. 12(8). – P. 945-949. doi: 10.1038/nm1443.
86. Goemans, B.F. Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia / B.F. Goemans, C.M. Zwaan, M. Miller et al. // Leukemia. – 2005. – Vol. 19. – P. 1536-1542.
87. Raimondi, S.C. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative Pediatric Oncology Group study-POG 8821 / S.C. Raimondi, M.N. Chang, Y. Ravindranath et al. // Blood. – 1999. – Vol. 94. – P. 3707-3716.

88. Martinez-Climent, J.A. Chromosomal rearrangements in childhood acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes / J.A. Martinez-Climent, J. García-Conde // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* – 1999. – Vol. 21. – P. 91-102.
89. Kaspers, G.J. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients / G.J. Kaspers, C.M. Zwaan // *Haematologica.* – 2007. – Vol. 92(11). – P. 1519-1532. doi: 10.3324/haematol.11203.
90. Bennett, J.M. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the FrenchAmerican-British Cooperative Group / J.M. Bennett, D. Catovsky, M.T. Daniel et al. // *Ann. Intern. Med.* – 1985. – Vol. 103. – P. 460-462.
91. Bennett, J.M. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO) / J.M. Bennett, D. Catovsky, M.T. Daniel et al. // *Br. J. Haematol.* – 1991. – Vol. 78. – P. 325-329.
92. Pui, C.H. Childhood leukemias / C.H. Pui // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – Vol. 332(24). – P. 1618-1630. doi: 10.1056/NEJM199506153322407.
93. Campana, D. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia / D. Campana, Coustan- E. Smith, G. Janossy // *Blood.* – 1990. – Vol. 76(1). – P. 163-171.
94. Buccisano, F. Minimal residual disease as a biomarker for outcome prediction and therapy optimization in acute myeloid leukemia / F. Buccisano, L. Maurillo, M.I. Del Principe et al. // *Expert Rev. Hematol.* – 2018. – Vol. 11(4). – P. 307-313. doi: 10.1080/17474086.2018.1447378.
95. Buldini, B. Prognostic significance of flow-cytometry evaluation of minimal residual disease in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP-AML 2002/01 study protocol / B. Buldini, F. Rizzati, R. Masetti et al. // *Br. J. Haematol.* – 2017. – Vol. 177(1). – P. 116-126. doi: 10.1111/bjh.14523.
96. Hauwel, M. Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? / M. Hauwel, T. Matthes // *Swiss Med. Wkly.* – 2014. – Vol. 144. – w13907. doi: 10.4414/smw.2014.13907.
97. Kern, W. Prognostic impact of early response to induction therapy as

assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia / W. Kern, D. Voskova, C. Schoch et al. // *Haematologica*. – 2004. – Vol. 89(5). – P. 528-540.

98. Kern, W. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow / W. Kern, S. Danhauser-Riedl, R. Ratei et al. // *Haematologica*. – 2003. – Vol. 88(6). – P. 646-653.

99. Kern, W. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia / W. Kern, D. Voskova, C. Schoch et al. // *Blood*. – 2004. – Vol. 104(10). – P. 3078-3085. doi: 10.1182/blood-2004-03-1036.

100. Köhnke, T. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse / T. Köhnke, D. Sauter, K. Ringel et al. // *Leukemia*. – 2015. – Vol. 29(2). – P. 377-386. doi: 10.1038/leu.2014.186.

101. Langebrake, C. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group / C. Langebrake, U. Creutzig, M. Dworzak et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24(22). – P. 3686-3692. doi: 10.1200/JCO.2005.05.4312.

102. Vidriales, M.B. PETHEMA Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas Cooperative Study Group. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia / M.B. Vidriales, E. Pérez-López, C. Pegenaute et al. // *Leuk. Res.* – 2016. – Vol. 40. – P. 1-9. doi: 10.1016/j.leukres.2015.10.002.

103. 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 et al. // *Am. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 90(2). – P. 125-131. doi: 10.1002/ajh.23893.

104. Ouyang, J. The clinical significance of negative flow cytometry immunophenotypic results in a morphologically scored positive bone marrow in

patients following treatment for acute myeloid leukemia / J. Ouyang, M. Goswami, G. Tang et al. // *Am. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 90(6). – P. 504-510. doi: 10.1002/ajh.23988.

105. Van Rhenen, A. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38-stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission / A. Van Rhenen, B. Moshaver, A. Kelder et al. // *Leukemia.* – 2007. – Vol. 21(8). – P. 1700-1707. doi: 10.1038/sj.leu.2404754.

106. Van Rhenen, A. New approaches for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia / A. Van Rhenen, B. Moshaver, G.J. Ossenkoppele et al. // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* – 2007. – Vol. 2(2). – P. 111-118. doi: 10.1007/s11899-007-0016-0.

107. Rubnitz, J.E. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial / J.E. Rubnitz, H. Inaba, G. Dahl et al. // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11(6). – P. 543-552. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70090-5.

108. Sievers, E.L. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia / E.L. Sievers, B.J. Lange, T.A. Alonzo et al. // *Blood.* – 2003. – Vol. 101(9). – P. 3398-3406. doi: 10.1182/blood-2002-10-3064.

109. Terstappen, L.W. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis / L.W. Terstappen, M. Safford, S. Könemann et al. // *Leukemia.* – 1992. – Vol. 6(1). – P. 70-80.

110. 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. van Putten, A. Kelder et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31(31). – P. 3889-3897. doi: 10.1200/JCO.2012.45.9628.

111. Tierens, A. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study / A. Tierens, E. Bjørklund, S. Siitonen et al. // *Br. J. Haematol.* –

2016. – Vol. 174(4). – P. 600-609. doi: 10.1111/bjh.14093.

112. Van der Velden, V.H. 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. Van der Velden, A. Van der Sluijs-Geling, B.E. Gibson et al. // *Leukemia*. – 2010. – Vol. 24(9). – P. 1599-1606. doi: 10.1038/leu.2010.153.

113. 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 et al. // *Cytometry B Clin Cytom.* – 2004. – Vol. 62(1). – P. 25-38. doi: 10.1002/cyto.b.20025.

114. 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 et al. // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – P. 3574-3580.

115. Langebrake, C. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: implications for MRD monitoring / C. Langebrake, I. Brinkmann, A. Teigler-Schlegel et al. // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2005. – Vol. 63. – P. 1-9.

116. Venditti, A. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia / A. Venditti, F. Buccisano, G. Del Poeta et al. // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 3948-3952.

117. Walter, R.B. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission / R.B. Walter, S.A. Buckley, J.M. Pagel et al. // *Blood*. – 2013. – Vol. 122(10). – P. 1813-1821. doi: 10.1182/blood-2013-06-506725.

118. Witte, K.E. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia / K.E. Witte, J. Ahlers, I. Schäfer et al. // *Pediatr. Hematol. Oncol.* – 2011. – Vol. 28(2). – P. 91-99. doi: 10.3109/08880018.2010.528171.

119. Sakaguchi, M. Prognostic impact of low allelic ratio *FLT3*-ITD and *NPM1* mutation in acute myeloid leukemia / M. Sakaguchi, H. Yamaguchi, Y. Najima et al. // *Blood Adv.* – 2018. – Vol. 2(20). – P. 2744-2754. doi: 10.1182/bloodadvances.2018020305.

120. Taskesen, E. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity / E. Taskesen, L. Bullinger, A. Corbacioglu et al. // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 2469-2475.

121. Martin-Martin, L. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile / L. Martin-Martin, A. Lopez, B. Vidriales et al. // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6(22). – P. 19204-19216.

122. Ceribelli, M. A Druggable *TCF4*- and *BRD4*- dependent transcriptional network sustains malignancy in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm / M. Ceribelli, Z.E. Hou, P.N. Kelly et al. // *Cancer Cell.* – 2016. – Vol. 30(5). – P. 764-778.

123. Лобанова, Т.И. Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) / Лобанова, Т.И., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. // *Онкогематология.* – 2018. – Т. 13, №1.

124. Buccisano, F. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia / F. Buccisano, L. Maurillo, M.I. Del Principe et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 119. – P. 332-341.

125. Hourigan, C.S. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia / C.S. Hourigan, J.E. Karp // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 10. – P. 460-471.

126. Grossmann, V. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations / V. Grossmann, S. Schnittger, A. Kohlmann et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120. – P. 2963-2972.

127. Hokland, P. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission / P. Hokland, H.B. Ommen // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P.

2577-2584.

128. Selim, A.G. Molecular Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia: Challenges and Future Directions / A.G. Selim, A.S. Moore // *J. Mol. Diagn.* – 2018. – Vol. 20(4). – P. 389-397. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.03.005.

129. Garcés-Eisele, J. Molecular biology strategies to detect residual disease / J. Garcés-Eisele // *Hematol.* – 2012. – Vol.17. – Suppl. 1. – S66-68. doi: 10.1179/102453312X13336169155691.

130. Pettersson, L. Improved minimal residual disease detection by targeted quantitative polymerase chain reaction in Nucleophosmin 1 type a mutated acute myeloid leukemia / L. Pettersson, P. Levéen, O. Axler et al. // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2016. – Vol. 55(10). – P. 750-766. doi: 10.1002/gcc.22375.

131. Cai, S.F. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis / S.F. Cai, R.L. Levine // *Semin Hematol.* – 2019. – Vol. 56(2). – P. 84-89. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.001.

132. Woods, W.G. Timed-sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group / W.G. Woods, N. Koblinsky, J.D. Buckley et al. // *Blood.* – 1996. – Vol. 87. – P. 4979-4989.

133. Pui, C.H. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update / C.H. Pui, W.L. Carroll, S. Meshinchi et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 551-565.

134. Elgarten, C.W. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy / C.W. Elgarten, R. Aplenc // *Curr. Opin. Pediatr.* – 2020. – Vol. 32(1). – P. 57-66. doi: 10.1097/MOP.0000000000000855.

135. Lange, B.J. Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891 / B.J. Lange, N. Koblinsky, D.R. Barnard et al. // *Blood.* – 1998. – Vol. 91. – P. 608-615.

136. Klusmann, J.H. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome / J.H. Klusmann, U. Creutzig, M. Zimmermann et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 111. – P. 2991-2998.

137. Gamis, A.S. Natural history of transient myeloproliferative disorder clinically diagnosed in Down syndrome neonates: a report from the Children's Oncology Group Study A2971 / A.S. Gamis, T.A. Alonzo, R.B. Gerbing et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – P. 6752-6759. quiz 996

138. Gamis, A.S. Acute myeloid leukemia and Down syndrome evolution of modern therapy: state of the art review / AS. Gamis // *Pediatr. Blood Cancer*. – 2005. – Vol. 44. – P. 13-20.

139. Wheatley, K. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties / K. Wheatley, A.K. Burnett, A.H. Goldstone et al. // *Br. J. Haematol.* – 1999. – Vol. 107. – P. 69-79.

140. Bolouri, H. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions / H. Bolouri, J.E. Farrar, T. Triche Jr. et al. // *Nat. Med.* – 2018. – Vol. 24. – P. 103-112.

141. Conneely, S.E. The genomics of acute myeloid leukemia in children / S.E. Conneely, R.E. Rau // *Cancer Metastasis Rev.* – 2020. – Vol. 39(1). – P. 189-209. doi: 10.1007/s10555-020-09846-1.

142. Rosse, C. Bone marrow cell populations of normal infants; the predominance of lymphocytes / C. Rosse, M.J. Kraemer, T.L. Dillon et al. // *J. Lab. Clin. Med.* – 1977. – Vol. 89(6). – P. 1225-1240.

143. Rimsza, L.M. Benign B-cell precursors (hematogones) are the predominant lymphoid population in the bone marrow of preterm infants / L.M. Rimsza, V.K. Douglas, P. Tighe et al. // *Biol Neonate*. – 2004 – Vol. 86(4). – P. 247-253. doi: 10.1159/000079907.

144. Pont, J. Accurate Quantification of Fourteen Normal Bone Marrow Cell Subsets in Infants to the Elderly by Flow Cytometry / J. Pont, A. Souvignet, L. Campos et al. // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2018. – Vol. 94(5). – P. 627-636. doi: 10.1002/cyto.b.21643.

145. Тупицын, Н.Н. Иммунодиагностика опухолей крови на основании

многоцветных (8 цветов панелей) европейского консорциума по проточной цитометрии (EURO-FLOW) / Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Гривцова, Н.А. Купрышина // Иммунология гемопоза. – 2015. – Т. 13(1). С. – 31-62.

146. Collin, M. Human dendritic cell subsets: an update (2018) / M. Collin, V. Bigley // *Immunol.* – 2018. – Vol. 154. – P. 3-20. doi: 10.1111/imm.12888.

147. McKenna, K. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. / K. McKenna, A. Beignon, N. Bhardwaj // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79(1). – P.17-27. doi: 10.1128/JVI.79.1.17-27.2005.

148. Osaki, Y. Characterization of CD56+ Dendritic-Like Cells: A Normal Counterpart of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm? / Y. Osaki, A. Yokohama, A. Saito et al. // *PLoS ONE.* – Vol. 20138(11). – e81722.

149. Руководство по гематологии 1-3 тт. с приложениями / Под ред. А.И. Воробьева. – 4-е издание. – Москва: НЬЮДИАМЕД, 2007. – 1275 с. – ил.

150. Coustan-Smith, E. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia / E. Coustan-Smith, R.C. Ribeiro, J.E. Rubnitz et al. // *Br. J. Haematol.* – 2003. – Vol. 123(2). – P. 243-252.

151. Khoury, H. Acute myelogenous leukemia with t(8;21) identification of a specific immunophenotype / H. Khoury, B.I. Dalal, T.J. Nevill et al. // *Leuk. Lymphoma.* – 2003. – Vol. 44(10). – P. 1713-1718. doi: 10.1080/1042819031000116698.

152. Hurwitz, C.A. Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children / C.A. Hurwitz, S.C. Raimondi, D. Head et al. // *Blood.* – 1992. – Vol. 80(12). – P. 3182-3188.

153. Shang, L. The immunophenotypic characteristics and flow cytometric scoring system of acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 / L. Shang, X. Chen, Y. Liu et al. // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2019. – Vol. 41(1). – P. 23-31. doi: 10.1111/ijlh.12916.

154. Miyawaki, K. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis / K. Miyawaki, H. Iwasaki, T. Jiromaru et al. // *Blood.* – 2017. – Vol. 129(25). – P. 3332-3343. DOI: 10.1182/blood-2016-09-741611.

155. Nishikii, H. Unipotent Megakaryopoietic Pathway Bridging Hematopoietic Stem Cells and Mature Megakaryocytes / H. Nishikii, Y. Kanazawa, T. Umemoto et al. // *Stem Cells*. – 2015. – Vol. 33(7). – P. 2196-2207. DOI: 10.1002/stem.1985.

156. Ferkowicz, M.J. CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo / M.J. Ferkowicz, M. Starr, X. Xie et al. // *Development*. – 2003. – Vol. 130. – P. 4393-4403.

157. Deutsch, V.R. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: From bench to bedside / V.R. Deutsch, A. Tomer // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 161. – P. 778-793.

158. Björklund, E. CD34+ cell subpopulations detected by 8-color flow cytometry in bone marrow and in peripheral blood stem cell collections: application for MRD detection in leukemia patients / E. Björklund, A. Gruber, J. Mazur et al. // *Int. J. Hematol.* – 2009. – Vol. 90(3). – P. 292-302. DOI: 10.1007/s12185-009-0389-z.

159. Wen, Q. Normal and malignant megakaryopoiesis / Q. Wen, B. Goldenson, J.D. Crispino // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2011. – Vol. 13. e32. DOI:10.1017/S1462399411002043.

160. Macedo, A. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease / A. Macedo, A. Orfao, J. Ciudad et al. // *Leukemia*. – 1995. – Vol. 9(11). – P. 1896-1901.

161. Coustan-Smith, E. Universal monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia / E. Coustan-Smith, G. Song, S. Shurtleff et al. // *JCI Insight*. – 2018. – Vol. 3(9). – e98561. doi: 10.1172/jci.insight.98561.

162. В. Савченко Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови / под. Ред. В.Г. Савченко // *Практика*. – 2018. – Том 1. – 1008 С.

163. Leroux, D. CD4(+), CD56(+) DC2 acute leukemia is characterized by recurrent clonal chromosomal changes affecting 6 major targets: a study of 21 cases by the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique / D. Leroux, F. Mugneret, M. Callanan et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 99(11). – P. 4154-4159.

164. Petrella, T. CD4+ CD56+ cutaneous neoplasms: a distinct hematological

entity? Groupe Francais d'Etude des Lymphomes Cutanes (GFELC) / T. Petrella, S. Dalac, M. Maynadie, et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1999. – Vol. 23(2). – P. 137-146.

165. Reichard KK. CD4(+) CD56(+) lineage-negative malignancies are rare tumors of plasmacytoid dendritic cells / K.K. Reichard, E.J. Burks, M.K. Foucar et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2005. – Vol. 29(10). – P. 1274-1283.

166. Kikushige, Y. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells / Y. Kikushige, T. Shima, S. Takayanagi et al. // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7(6). – P. 708-717. doi: 10.1016/j.stem.2010.11.014.

167. 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. – S49-S53.

168. Daver, N. Targeting *FLT3* mutations in AML: review of current knowledge and evidence / N. Daver, R.F. Schlenk, N.H. Russell, M. J. Levis // *Leukemia.* – 2019. – Vol. 33. – P. 299–312. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>

169. Палладина А. Диагностика и мониторинг минимальной остаточной болезни при остром мегакариобластном лейкозе у детей / А.Д. Палладина, А.В. Попа, Т.Т. Валиев, В.Г. Никитаев, и др. // *Современная онкология.* – 2021. – Т. 23 (1). – С.130-137 DOI: 10.26442/18151434.2021.1.200762

170. Валиев Т. Опухоль из бластных плазмацитоидных дендритических клеток / Т.Т. Валиев, Г.З. Серегин, И.Н. Серебрякова и др. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2019. – Т. 18 (4). – С.79-89. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-4-79-89

171. Porwit, A. Blood and bone marrow pathology / A. Porwit, J. McCullough, W. Erber et al // Elsevier. – 2 edition. – 2011. – P. 708

172. Блиндарь, В.Н. Гематологические методы исследования. Клиническое значение показателей крови / В.Н. Блиндарь, Г.Н. Зубрихина, Н.Е. Кушлинский. – 2 издание. – Медицинское информационное агентство. – 2020. – 96 С.

173. Wood B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis / *Methods in Cell Biology.* – 2004. – Vol. 75. – 559-76 P.

174. Wood B. Principles of Minimal Residual Disease Detection for

Hematopoietic Neoplasms by Flow Cytometry // Cytometry B Clinical Cytometry. – 2016. – Vol. 90(1). – P. 47-53. doi: 10.1002/cyto.b.21239

175. Ngai L. MRD Tailored Therapy in AML: What We Have Learned So Far / L. Ngai, A. Kelder, J. Janssen, G. Ossenkoppele, J. Cloos // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol.10. – p.1-14 doi: 10.3389/fonc.2020.603636

176. Hanekamp D. Myeloblasts in normal bone marrows expressing leukaemia-associated immunophenotypes / D. Hanekamp, C. Bachas, A. van de Loosdrecht, G. Ossenkoppele, J..Cloos // *Pathology*. – 2020. – Vol.52(2). – P. 289-291