



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.004>
УДК 616.155.392-036.11-036.87-097.3-071:577.27.088.7



Луцкович Д.В.✉¹, Столярова Е.А.², Полякова Е.А.¹, Мелешко А.Н.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

² Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем имени Сергея Березина, Санкт-Петербург, Россия

Значимость идентификации реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора для диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Луцкович Д.В. – концепция и дизайн исследования; Столярова Е.А. – редактирование; Полякова Е.А. – обзор литературы; Мелешко А.Н. – контроль выполнения исследования.

Подана: 06.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: lutskovichdm@gmail.com

Резюме

Цель. Определить разнообразие и частоту встречаемости возникающих при В-линейном остром лимфобластном лейкозе реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора и использовать выявление этих мишеней в качестве тестов диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни.

Материалы и методы. В исследование был включен 81 пациент в возрасте от 1 года до 18 лет (медиана возраста 9,5 года) с диагнозами «В-линейный острый лимфобластный лейкоз» и «рецидив острого лимфобластного лейкоза», получающий лечение по протоколу ALL MB-2008 и ALL-REZ BFM 2002 соответственно. Из них мониторинг минимальной остаточной болезни был произведен для 69 пациентов, с первичным ОЛЛ – 28 пациентов, с рецидивом ОЛЛ – 41 пациент.

Результаты. Согласно полученным данным, одна клональная реаранжировка была обнаружена у 88,8% (72/81) пациентов с В-линейным ОЛЛ, две и более – у 24,79% (20/81) пациентов. Наибольшая частота встречаемости реаранжировок приходится на генные сегменты VH-JH (44,9% от всех выявленных реаранжировок) и на реаранжировки гена TCRG Vγ1 – Jγ (20,41% от всех выявленных реаранжировок). У всех пациентов с острым лимфобластным лейкозом наблюдалось снижение показателей МОБ на этапе терапии. У 3 (7,31%) пациентов с рецидивом острого лимфобластного лейкоза наблюдался рост МОБ. У 22 (53,65%) определялась молекулярная ремиссия на этапе терапии, у 12 (29,26%) пациентов наблюдалось снижение показателей МОБ до уровня предела чувствительности метода 10^{-5} , 4 (9,75%) пациента находятся на стадии наблюдения.

Выводы. Мониторинг минимальной остаточной болезни с высокой чувствительностью («молекулярная ремиссия») имеет большое прогностическое значение для пациентов с ОЛЛ, особенно группы высокого риска, при лечении рецидива или после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В настоящей статье приведены результаты по разнообразию и частотам выявления при ОЛЛ мишеней МОБ и их практическое использование в диагностике. Реаранжировки генов Ig/TCR происходят практически во всех случаях ОЛЛ и в 95,8% пригодны для ПЦР-мониторинга МОБ. ПЦР в реальном времени позволяет количественно измерять низкие уровни МОБ с чувствительностью до 10^{-5} , что позволяет использовать в протоколах лечения клинически значимые пороговые уровни МОБ на разных этапах терапии.

Ключевые слова: реаранжировки, минимальная остаточная болезнь, острый лимфобластный лейкоз, аллель-специфические олигонуклеотиды, иммуноглобулин, Т-клеточный рецептор

Lutskovich D.^{✉1}, Stolyarova E.², Polyakova E.¹, Meleshko A.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

² Diagnostic and Treatment Center of the International Institution for Biological Systems named after Sergey Berezin, Saint Petersburg, Russia

Significance of Identification of Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Rearrangements for the Diagnosis and Monitoring of Minimal Residual Disease in B-Linear Acute Lymphoblastic Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Lutskovich D. – concept and design of the study; Stolyarova E. – editing; Polyakova E. – literature review; Meleshko A. – control of the study.

Submitted: 06.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: lutskovichdm@gmail.com

Abstract

Purpose. To determine the diversity and frequency of occurrence of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements that occur in B-linear acute lymphoblastic leukemia and use the identification of these "targets" as diagnostic tests and monitoring of minimal residual disease.

Materials and methods. The study included 81 patients aged 1 to 18 years (median age 9.5 years), diagnosed with "B-linear acute lymphoblastic leukemia" and "recurrent acute lymphoblastic leukemia", receiving treatment according to the ALL MB-2008 protocol and ALL-REZ BFM 2002 respectively. Of these, monitoring of minimal residual disease was performed for 69 patients, with primary ALL – 28 patients, with recurrent ALL – 41 patients.

Results. According to the results obtained, at least one clonal rearrangement was found in 88.8% (72/81) of patients with B-linear ALL, two or more in 24.79% (20/81) of patients.



The highest frequency of occurrence of rearrangements falls on the VH-JH gene segments (44.9% of all identified rearrangements) and V λ I-J γ rearrangements (20.41% of all identified rearrangements). In all patients with acute lymphoblastic leukemia, a decrease in MRD values was observed at the stage of therapy. In patients with relapse of acute lymphoblastic leukemia, 3 (7.31%) patients showed an increase in MRD. In 22 (53.65%) patients, molecular remission was determined at the stage of therapy, in 12 (29.26%) patients, a decrease in MRD values was observed to the level of the sensitivity limit of the method 10^{-5} , 4 (9.75%) patients are under observation.

Conclusions. Monitoring of minimal residual disease with high sensitivity ("molecular remission") is of great prognostic value for patients with ALL, especially at high risk, in the treatment of relapse or after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This article presents the results on the diversity and frequency of MRD targets detected in ALL, and their practical use in diagnostics. Rearrangements of Ig/TCR genes occur in almost all cases of ALL, and in 95.8% are suitable for PCR monitoring of MRD. Real-time PCR allows quantitative measurement of low MRD levels with a sensitivity up to, which allows the use of clinically relevant threshold levels of MRD in treatment protocols at different stages of treatment.

Keywords. Rearrangements, minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, allele-specific oligonucleotides, immunoglobulin, T-cell receptors

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – онкологическое заболевание, наиболее часто встречающееся в детском возрасте, развивается стремительно и имеет высокую летальность. К настоящему времени лечение данного заболевания имеет достаточно высокую эффективность и дальнейшую продолжительную ремиссию. Однако всегда остается вероятность развития рецидива, что является основной и достаточно частой проблемой. Рецидивы возникают у 30–35% пациентов и являются одной из наиболее частых причин смертности [1, 2]. Выживаемость пациентов, у которых возник рецидив, составляет около 3–19% (в группе высокого риска) [3]. В случае клинического рецидива после проведенной терапии согласно протоколу лечения варианты дальнейшего лечения ограничены и часто неэффективны. В то же время терапия на стадии раннего рецидива (до гематологического проявления), когда клон лейкоза еще невелик, более эффективна, чем лечение рецидива перенесенного заболевания. Поэтому особенно важно вести мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) для предсказания раннего рецидива.

На сегодняшний день существует несколько принципиально различных методов выявления минимальной остаточной болезни: проточная цитометрия и количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием в качестве мишеней химерных онкогенов или клональных реаранжировок генов иммуноглобулина (Ig) или Т-клеточного рецептора (TCR) [4–6]. Метод ПЦР-РВ является наиболее чувствительным, но остается актуальным выбор мишени и интерпретация результатов. Химерные онкогены обладают достаточной специфичностью, но выявляются не более чем в 30% случаев детского острого лимфобластного лейкоза [7–9].

Реаранжировка генов Ig и TCR – это нормальный физиологический процесс, который проходит на ранних стадиях дифференцировки лимфоцитов в костном мозге и тимусе. Лимфоциты в нормальном состоянии имеют практически неограниченное количество вариантов реаранжировки, что является большим потенциалом для антигенного распознавания адаптивного иммунитета. Все огромное разнообразие специфических Ig и TCR молекул является результатом соматической реаранжировки ограниченного набора «зародышевых» последовательностей.

V(D)J-реаранжировка представляет собой ряд последовательных реакций сближения, разрывов и воссоединений двойной спирали ДНК и протекает в два этапа. На первом этапе рекомбиназы – продукты гена RAG1 и RAG2 (recombination activation genes) – распознают RSS (recombination signal sequence) и связываются с ними. Рекомбиназы вносят односторонний разрыв в ДНК на 5' конце гептамера и активируют 3'-ОН конец кодирующего сегмента, который гидролизует фосфатную связь во второй нити ДНК с образованием ковалентно замкнутой шпильки на конце сегмента и тупых концов гептамера. На втором этапе реакции тупые концы гептамеров соединяются, образуя так называемое сигнальное соединение. Кодирующие концы перед объединением подвергаются процессингу. Шпилька расщепляется в случайном месте, оставляя иногда палиндромную последовательность, называемую Р-нуклеотидами, на конце генного сегмента. Перед воссоединением генных сегментов концы ДНК могут немного деградировать при участии экзонуклеаз, а также происходит нематричное добавление так называемых N-нуклеотидов терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT). В итоге кодирующие концы объединяются. Результатом реаранжировки генов антигенных рецепторов является сближение отдельных генных сегментов в процессе генетической рекомбинации. При неточном воссоединении и добавлении нематричных нуклеотидов перестроенный ген составляет уникальную для данной клетки (клона) последовательность, детерминирующую уникальную антиген-распознающую специфичность рецептора [10].

Перечень праймеров для первичного скрининга реаранжировок Ig/TCR, рекомендации по интерпретации количественных данных, рекомендации по оценке МОБ методом ПЦР-РВ были высоко стандартизированы благодаря международному сотрудничеству с Европейской исследовательской группой по выявлению МОБ при ОЛЛ [11, 12].

Использование метода минимальной остаточной болезни для детей с острым лимфобластным лейкозом позволяет составить прогноз эффективности предпринимаемого лечения, предсказания рецидива и принять решение о проведении трансплантации ГСК.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить разнообразие и частоту выявляемых реаранжировок генов иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора у пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом и на основании полученных данных предложить новую методологию диагностики минимальной остаточной болезни.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2011 по 2022 г. обследован 81 пациент в возрасте от 1 года до 18 лет (медиана возраста 9,5 года) с диагнозами «острый лимфобластный лейкоз»



и «рецидив острого лимфобластного лейкоза», получавший лечение по протоколам ALL MB-2008 и ALL-REZ BFM 2002. У всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь.

В качестве биологического материала для исследования использовали геномную ДНК, выделенную из мононуклеаров пунктата костного мозга (КМ) с содержанием опухолевых клеток более 90%.

Для последовательной амплификации переменных регионов тяжелой/легких цепей иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора использовали метод ПЦР. Реакционная смесь состояла из 1,5 ммоль/л $MgCl_2$, 0,2 ммоль/л дНТП и содержала 12,5 пмоль каждого из праймеров, 0,5 U Taq-полимеразы и 100 нг ДНК в объеме раствора 30 мкл.

Гетеродуплексный анализ для различения моноклональных и поликлональных продуктов ПЦР, полученных из клональных лейкоэмических клеток и поликлональных реактивных лимфоцитов соответственно, проводили по протоколу – денатурация (95 °C, 5 мин.) и ренатурация (4 °C, 1 ч.) для образования дуплекса. Обнаружение гомодуплексов (ренатурация идентичных одиночных цепей ДНК) указывало на моноклональность. Обнаружение гетеродуплексов (ренатурация цепей ДНК частично отличающейся последовательности, соответствующей стыку между перестроенными генами) интерпретировалось в соответствии с характером миграции как биклональная/биаллельная перестройка.

Для секвенирования моноклональных продуктов ПЦР использовали праймеры для амплификации в обоих направлениях. Идентификацию реаранжированных генов проводили путем сравнения полученных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными в базах данных IMGT® (<http://imgt.cines.fr>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Аллель-специфические олигонуклеотиды подбирали к соединительному региону перестроенных генов Ig/TCR, то есть на стыке V- (D) J-геновых сегментов, максимально располагая праймер в области нематричных (N) нуклеотидов. Праймер подбирался в прямой ориентации относительно V(D)J региона и в обратной, в зависимости от типа реаранжировки и комбинации со вторым (консенсусным) праймером и зондом [12, 13].

Для амплификации использовали двухкратную реакционную смесь, не содержащую референсных красителей, воду и раствор смеси праймеров. Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, включающем в себя 10 пмоль каждого праймера, 5 пмоль TaqMan пробы и 500 нг геномной ДНК.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение и идентификация реаранжировок генов Ig/TCR

В результате проведенных исследований было выявлено 95 клональных реаранжировок генов Ig/TCR для 72 пациентов (для 9 пациентов из 81 реаранжировки обнаружены не были), включающих 46 реаранжировок гена IgH, 15 реаранжировок гена IgK (10 Vκ-Kde и 5 Vκ-Jk), 16 неполных перегруппировок TCRD (11 Vδ2-Dδ3 и 5 Dδ2-Dδ3), 18 реаранжировок TCRG (6 – VγI – Jγ1.1/2.1, 9 – VγI – Jγ1.3/2.3, 2 – VγII – Jγ1.3/2.3, 2 – VγIII – Jγ1.3/2) и 4 перегруппировки TCRB (2 Vβ: Jβ и 2 Dβ-Jβ).

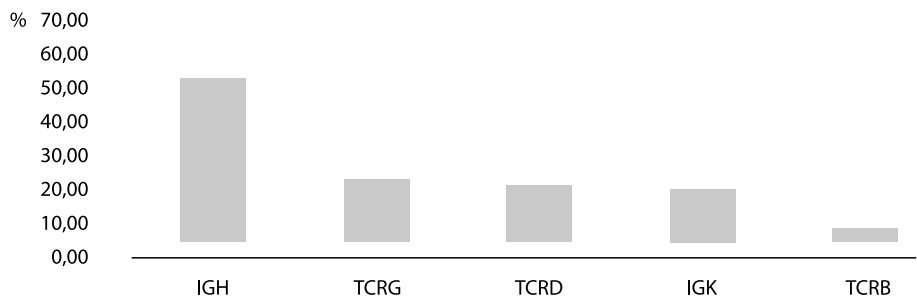


Рис. 1. Процентная частота встречаемости по генным сегментам
Fig. 1. Percentage frequency of occurrence by gene segments

В результате хотя бы одна клональная реаранжировка была обнаружена у 88,8% (72/81) пациентов с В-клеточным ОЛЛ, а также две и более у 24,79% (20/81) пациентов. Характерным является то, что наибольшая частота встречаемости реаранжировок приходится на генные сегменты VH-JH (44,9% от всех выявленных реаранжировок) и V γ I – J γ (20,41% от всех выявленных реаранжировок). Данные по процентному соотношению обнаруженных реаранжировок генов Ig/TCR представлены на рис. 1.

Кроме того, были изучены частота вариабельных генов, генов разнообразия и соединения в реаранжировках, идентифицированных в отдельных локусах Ig/TCR, для определения характера использования V(D)J.

Реаранжировки в локусе IgH чаще всего затрагивали членов семейства VH3-JH (47,83%, 22/46) VH1-JH (17,39%, 8/46), VH6-JH (15,22%, 7/46) и VH4-JH (13,04%, 6/46). Из реаранжировок в локусе IgK наиболее часто выявлялись члены семейства V κ 1-KDE (66,67%, 10/15) и V κ -J κ (33,33%, 5/15). В локусе TCRD перестройки V δ 2-D δ 3

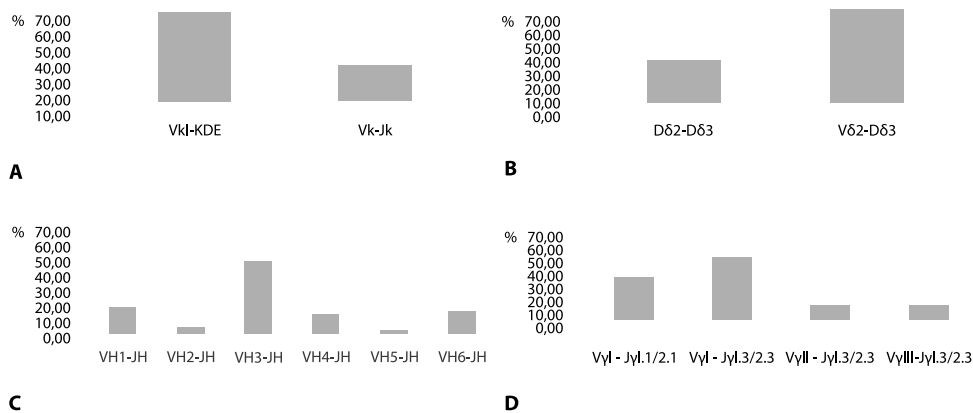


Рис. 2. Процентная частота встречаемости реаранжировок в локусах А – IgK, В – TCRD, С – IgH, D – TCRG
Fig. 2. Percentage frequency of occurrence of rearrangements in loci А – IgK, В – TCRD, С – IgH, D – TCRG

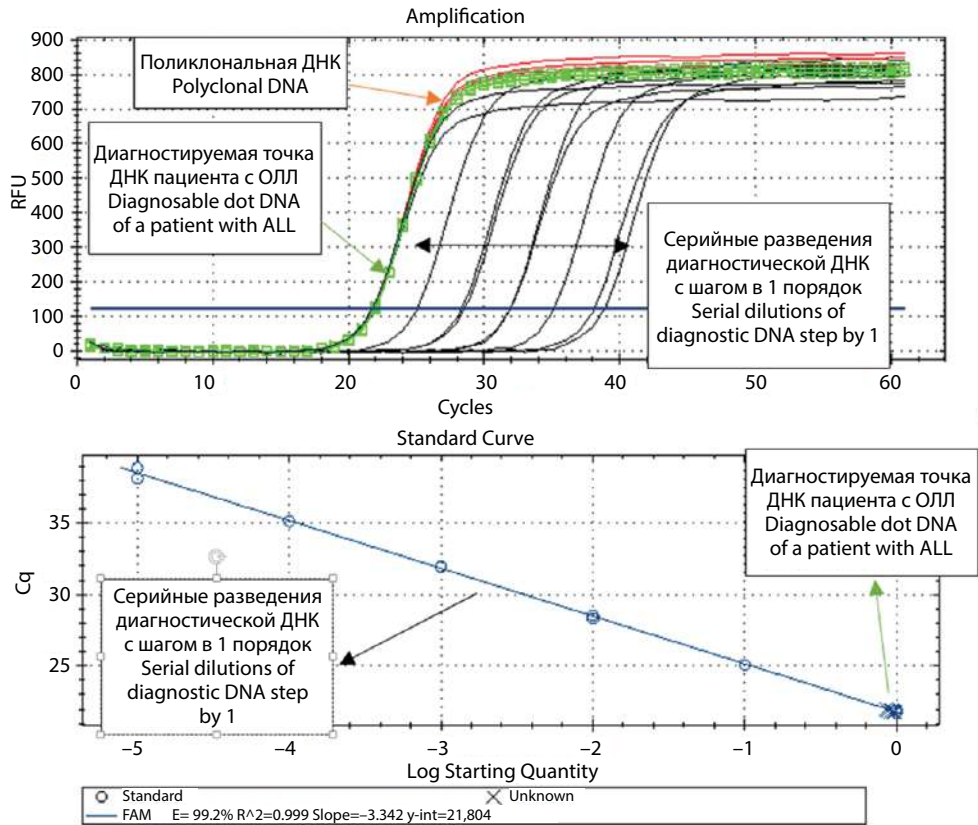


Рис. 3. Выполнение калибровки и построение стандартной калибровочной кривой для одного пациента с ОЛЛ при анализе МОБ для контрольного гена (альбумин)

Примечания: зеленая амплификационная кривая – диагностируемая точка ДНК пациента с ОЛЛ на этапе лечения; красная амплификационная кривая – поликлональная ДНК; синие амплификационные кривые – серийные разведения диагностической ДНК с шагом в 1 порядок; Slope – угловой коэффициент; R – коэффициент корреляции; E – эффективность ПЦР.

Fig. 3. Performing calibration and building a standard calibration curve, for one patient with ALL, in the analysis of MRD for the control gene (albumin)

Notes: green amplification curve – diagnosed point of the patient's ALL DNA during treatment; red amplification curve – polyclonal DNA; blue amplification curves – serial dilutions of diagnostic DNA with a step of 1 order; Slope – slope; R – correlation coefficient; E – PCR Efficiency.

(68,75%, 11/16) были преимущественно идентифицированы по сравнению с Dδ2-Dδ3 (31,25%, 5/15). В локусе TCRG в реаранжировках наиболее часто участвовали гены членов семейства Vγ1-Jy1.3 (50%, 9/18) и Vγ1-Jy1.1 (33,33%, 6/18). Графическое распределение представлено на рис. 2.

Методология выявления и мониторинга минимальной остаточной болезни базировалась на экспериментальной модели, воспроизводимой при каждом анализе. Каждое измерение сопровождалось построением двух калибровочных кривых:

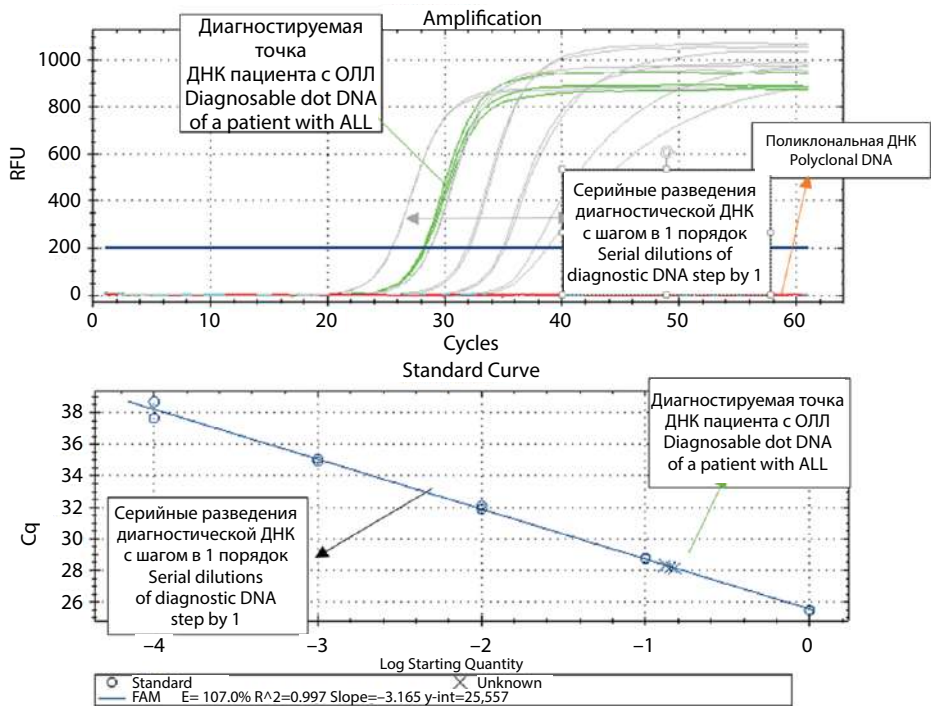


Рис. 4. Выполнение калибровки и построение стандартной калибровочной кривой для пациента с ОЛЛ при анализе МОБ для АСО-праймера VH3_F1. Чувствительность данной мишени составляет 10^{-4}

Примечания: зеленая амплификационная кривая – диагностируемая точка ДНК пациента на этапе лечения; красная амплификационная кривая – поликлональная ДНК; серые амплификационные кривые – серийные разведения диагностической ДНК с шагом в 1 порядок; Slope – угловой коэффициент; R – коэффициент корреляции; E – эффективность ПЦР; int – точка пересечения стандартной прямой оси ординат.

Fig. 4. Performing calibration and building a standard calibration curve, for an ALL patient, in the analysis of MRD for ASO primer VH3_F1. The sensitivity of this target is 10^{-4}

Notes: the green amplification curve is the diagnosable point of the patient's DNA at the stage of treatment; red amplification curve – polyclonal DNA; gray amplification curves – serial dilutions of diagnostic DNA with a step of 1 order; Slope – slope; R – Correlation coefficient; E – PCR efficiency; int is the point of intersection of the standard straight y-axis.

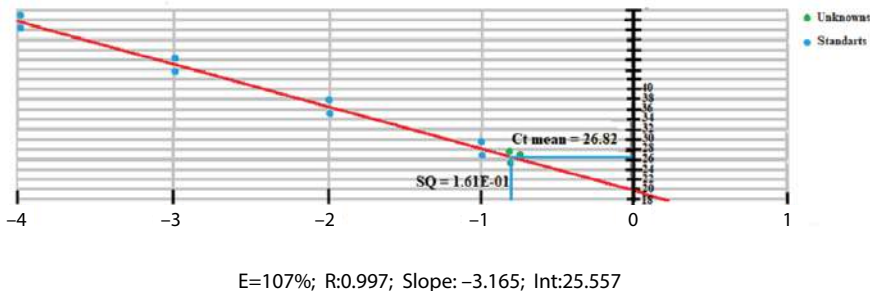


Рис. 5. Расчет уровня SQ по калибровочной кривой, мишень VH3_F1 для пациента с ОЛЛ. $SQ=1.61 \times 10^{-1}$
Fig. 5. Calculation of the SQ level from the calibration curve, target VH3_F1 for a patient with ALL. $SQ=1.61 \times 10^{-1}$



для контрольного гена – калибровку использовали для нормализации количества ДНК между образцами (рис. 3) и для мишени МОБ – использовали расчет уровня МОБ в follow up образцах (рис. 4).

Каждую калибровку количественно характеризовали следующими параметрами:

- slope (наклон), или угловой коэффициент (численно равен $\Delta Ct/\Delta SQ$ или тангенсу угла наклона стандартной кривой по отношению к оси абсцисс);
- коэффициент корреляции (R): рассчитывался как коэффициент Пирсона между разными разведениями;
- эффективность ПЦР – указывает количество ПЦР продукта относительно теоретически расчетного в процентах;
- интерсепт (intercept) – точка пересечения стандартной прямой оси ординат, количественно выражается в значении Ct условно (или реально) нулевого уровня разведения ($SQ=0$), т. е. среднее Ct диагностической ДНК.

Результаты построения калибровочной кривой для одного пациента с ОЛЛ представлены на рис. 3 и 4.

Диагностика минимальной остаточной болезни

Для количественной оценки МОБ мы использовали метод «стандартной кривой», который позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (Ct) измеряемого образца в значение стандартного количества (SQ), которое выражает количество мишени в логарифмическом виде относительно эталонного образца (диагностической ДНК), принятого за 1. Принцип определения SQ показан на рис. 5.

При генерации отчета в программе запуска ПЦР в режиме реального времени прибор автоматически производит средние значения Ct и SQ для всех образцов. Значение SQ мишени в образцах МОБ не отражает точно уровень МОБ, поскольку искажения вносит количество ДНК всех образцов, внесенных в реакцию. Для учета количества ДНК осуществлялась нормализация по контрольному гену. Для этого точно так же, как представлено на рис. 3 и 4, определяли значение SQ для количества ДНК. В результате для каждого образца ДНК, участвующего в амплификации, включая диагностическую ДНК, получали два значения SQ – для мишени МОБ и для количества ДНК.

Окончательно уровень МОБ рассчитывали по формулам:

$$\text{Поправочный коэффициент (K ref)} = \frac{\text{Стандартное количество ДНК (SQ)(follow up)}}{\text{Стандартное количество ДНК (SQ)(D – DNA)}}$$

$$\text{Снижение мишени} = \frac{\text{Стандартное количество мишени (SQ)(follow up)}}{\text{Стандартное количество мишени (SQ)(D – DNA)}}$$

$$\text{Нормализованное снижение мишени} = \frac{\text{K ref (follow up)}}{\text{Снижение мишени (follow up)}}$$

$$\text{МОБ} = \frac{1}{\text{Нормализованное снижение мишени}}$$

Подробное описание расчета уровня МОБ представлено в инструкции по применению [14].

Клиническое заключение об измерении уровня МОБ в ходе лечения пациентов с ОЛЛ

В результате анализ МОБ был произведен для 69 пациентов (из 81 пациента, первоначально взятого в исследование, для 9 не удалось идентифицировать реаранжировки, и для 3 пациентов не была получена достаточная специфичность и/или чувствительность праймеров), из них с первичным ОЛЛ – 28 пациентов, с рецидивом ОЛЛ – 41 пациент. Чувствительность детекции опухолевых клеток методом АСО-ПЦР индивидуальна и в среднем составила 10^{-5} . Для пациентов с диагнозом «острый лимфобластный лейкоз», получающих лечение по протоколу ALL MB-2008, показатели МОБ определялись на 15-е и 36-е сутки индукционной терапии, а также на 52-й и 100-й дни консолидирующей терапии. Для пациентов с диагнозом «рецидив острого лимфобластного лейкоза» показатели МОБ определялись перед каждым блоком полихимиотерапии.

У всех пациентов с острым лимфобластным лейкозом наблюдалось снижение показателей МОБ на этапе терапии. Среди пациентов с первичным ОЛЛ у 11 (39,28%) определялась молекулярная ремиссия на этапе окончания индукционной терапии (36-е сутки терапии), у 3 (10,71%) пациентов молекулярная ремиссия определялась на этапе I блока консолидирующей терапии, у 5 (17,85%) пациентов ремиссия была достигнута к 100-му дню терапии (этап: консолидация II), у 9 (32,14%) пациентов не констатировано молекулярной ремиссии в исследуемый период времени.

У пациентов с рецидивом острого лимфобластного лейкоза также наблюдалось снижение показателей МОБ на этапе терапии, за исключением 3 (7,31%) пациентов, у которых наблюдался рост МОБ. У 22 (53,65%) определялась молекулярная ремиссия на этапе терапии, у 12 (29,26%) пациентов наблюдалось снижение показателей МОБ до уровня предела чувствительности метода 10^{-5} , оставшиеся 4 (9,75%) пациента находятся на стадии наблюдения.

■ ВЫВОДЫ

1. Мониторинг минимальной остаточной болезни с высокой чувствительностью («молекулярная ремиссия») имеет большое прогностическое значение для пациентов с ОЛЛ, особенно группы высокого риска, при лечении рецидива или после трансплантации ТГСК. В настоящей статье приведены результаты по разнообразию и частотам выявляемых при ОЛЛ мишенях МОБ, и их практическое использование в диагностике.
2. Реаранжировки генов Ig/TCR происходят практически во всех случаях ОЛЛ и в 95,8% пригодны для ПЦР мониторинга минимальной остаточной болезни.
3. ПЦР в реальном времени позволяет количественно измерять низкие уровни МОБ с чувствительностью до 10^{-5} , что позволяет использовать в протоколах лечения клинически значимые пороговые уровни МОБ на разных этапах лечения.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Barrett A.J., Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):429–441.
2. Pasquini M., Zhu X. Center for International Blood and Marrow Transplant Research [Electronic resource]: *Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides*, 2015. Available at: <http://www.cibmtr.org>. 2015 (accessed 05.10.2016).
3. Mielcarek M., Storer B.E., Flowers M.E., Storb R., Sandmaier B.M., Martin P.J. Outcomes among Patients with Recurrent High-Risk Hematologic Malignancies after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(10):1160–1168.
4. Kröger N., Miyamura K., Bishop M.R. Minimal Residual Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2011;17(1 Suppl):94–100.
5. Nagafuji K., Miyamoto T., Eto T., Kamimura T., Taniguchi S., Okamura T., Ohtsuka E., Yoshida T., Higuchi M., Yoshimoto G., Fujisaki T., Abe Y., Takamatsu Y., Yokota S., Akashi K., Harada M. *Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study)*. 2013;6:14.
6. Athale U.H., Gibson P.J., Bradley N.M., Malkin D.M., Hitzler J.; POGO MRD Working Group. Minimal Residual Disease and Childhood Leukemia: Standard of Care Recommendations from the Pediatric Oncology Group of Ontario MRD Working Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(6):973–982.
7. Van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996–4009.
8. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology*. 2010:7–12.
9. Brüggemann M., Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv*. 2017;1(25):2456–2466.
10. Galaktionov V. *Immunology*. M.: Publishing house. Center "Academy", 2004;528. (in Russian)
11. Pongers-Willems M.J., Seriu T., Stolz F., d'Aniello E., Gameiro P., Pisa P., Gonzalez M., Bartram C.R., Panzer-Grumayer E.R., Biondi A., San Miguel J.F., Dongen J.J. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:110–118. doi: 10.1038/sj/leu/2401245.
12. Velden V.H., Cazzaniga G., Schrauder A., Hancock J., Bader P., Panzer-Grumayer E.R., Flohr T., Sutton R., Cave H., Madsen H.O., Cayuela J.M., Trka J., Eckert C., Foroni L., Zur Stadt U., Beldjord K., Raff T., Schoot C.E., Dongen J.J. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21:604–611.
13. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuurin E., Garcia-Sanz R., Krieken J.H., Droege J., Gonzalez D., Bastard C., White H.E., Spaargaren M., Gonzalez M., Parreira A., Smith J.L., Morgan G.J., Kneba M., Macintyre E.A. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17:2257–2317. doi: 10.1038/sj.leu.2403202
14. Lutskevich D., Gil A., Stolyarova E., Lipai N., Meleshko A. *Method for determining residual tumor cells in patients with acute lymphoblastic leukemia: instructions for use No. 122-1120: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus on December 24, 2020*. State Institution "Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology". Minsk, 2020; 18. (in Russian)
15. Meleshko A., Savva N., Fedasenka U., Romancova A., Krasko O., Eckert C., von Stackelberg A., Aleinikova O. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk. Res*. 2011;10(35):1312–1320.