

Проточная цитометрия в онкогематологии. Часть II. Основы и нововведения в диагностике хронического лимфолейкоза

Н.А. Купрышина, Н.Н. Тупицын

Flow cytometry in hematology malignancies. Part II: ABC and news in diagnostics of chronic lymphocytic leukaemia

N.A. Kupryshina, N.N. Tupitsyn

SUMMARY

Recent 10 years clinical significance of minimal residual disease in CLL has been proved and practical recommendations of this important prognostical sign in treatment individualization have been approved. 4-color flow cytometry diagnostics of minimal residual disease is now standardized both in the list of monoclonal antibodies used and in their combinations. It means that primary CLL immunodiagnostics should be adjusted to 4-color flow cytometry standards of residual disease diagnostics. We have illustrated in this paper the algorithm of minimal residual disease diagnosis according to ERIC protocol. Some suggestions of using minimal residual disease standards in primary chronic lymphocytic leukemia diagnosis are given.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

Контакты: ntca@yahoo.com

Принято в печать: 17 ноября 2012 г.

РЕФЕРАТ

За последние 10 лет доказано клиническое значение минимальной остаточной болезни (МОБ) при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) и сделаны практические выводы по использованию этого важнейшего прогностического признака в индивидуализации терапии. Проточно-цитометрическая диагностика МОБ стала стандартизированной как по набору используемых антител, так и по их комбинациям. Оптимальным является применение четырехцветной проточной цитометрии. Это диктует необходимость приведения первичной иммунодиагностики ХЛЛ в соответствие со стандартами выявления МОБ, т. е. внедрения четырехцветной проточной цитометрии уже на этапе установления диагноза ХЛЛ. В работе проиллюстрирован алгоритм определения МОБ при ХЛЛ в соответствии со стандартизированным протоколом ERIC (European Research Initiative in CLL), а также примеры проточно-цитометрической диагностики ХЛЛ. Представлены рекомендации по использованию критериев МОБ в первичной диагностике ХЛЛ.

Ключевые слова:

хронический лимфолейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия.

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — опухолевое лимфопролиферативное заболевание из моноклональных В-лимфоцитов. Заболевание, как правило, протекает индолентно, и главным симптомом в течение ряда лет является вялое нарастание абсолютного лимфоцитоза крови. Длительное время диагноз устанавливался по клинико-гематологическим данным, реже — с иммунологическим подтверждением на основании слабой мембранной экспрессии иммуноглобулинов и розеткообразования с эритроцитами мыши. В середине 70-х годов XX в. была установлена экспрессия Т-клеточного антигена (впоследствии отнесен к кластеру дифференцировки CD5) на клетках В-клеточного ХЛЛ (В-ХЛЛ). Стандартизация моноклональных антител и выявляемых ими антигенов дала возможность установить наи-

более типичный иммунофенотип заболевания — CD19+CD5+CD23+, который длительное время служил стандартом в диагностике ХЛЛ.

Поскольку клетки ХЛЛ являются зрелыми (периферическими, посткостномозговыми) В-лимфоцитами, то заболевание рассматривается в рубрике периферических В-клеточных лимфом (ВОЗ, 2008). Клетки В-ХЛЛ отличаются от нормальных В-лимфоцитов и клеток периферических В-клеточных лимфом (лимфомы из клеток мантии, фолликулярной, лимфомы из клеток маргинальной зоны) рядом особенностей: слабой экспрессией В-клеточных антигенов CD20, CD22, CD79b и др., что используется в дифференциальной диагностике этого заболевания. Хорошо известны варианты В-ХЛЛ с отсутствием CD5, CD23, яркой экспрессией CD20.

Длительное время в лечении ХЛЛ действовал принцип «наблюдай и жди» или сдерживания опухоли. Однако последняя декада XX и начало XXI в. ознаменовались внедрением в клиническую практику новых флударабин-содержащих схем лечения, включающих моноклональные антитела (ритуксимаб, алемтузумаб). Это позволило получать полные клинико-гематологические ремиссии.

Клинико-гематологические критерии ответа на лечение при В-ХЛЛ не позволяют судить о глубине ремиссии, т. е. о количестве остающихся лимфоцитов В-ХЛЛ в крови и костном мозге больного. За период с 1996 по 2008 г. накопилась убедительная доказательная база того, что чем ниже уровень остающихся опухолевых клеток В-ХЛЛ, определяемый проточной цитометрией или полимеразной цепной реакцией (ПЦР), тем лучше прогноз заболевания (более длительная выживаемость до прогрессирования и общая выживаемость). Доказано, что полуколичественные методы определения минимальной остаточной болезни (МОБ) не подходят для клиники. Следует использовать либо RQ-ASO IGH-ПЦР, либо четырехцветную проточную цитометрию — эти методы хорошо стандартизованы. Проточная цитометрия имеет ряд преимуществ в определении МОБ при В-ХЛЛ, главными из которых являются большая доступность и применимость метода более чем у 95 % больных, а также отсутствие строгой необходимости в информации относительно иммунофенотипа клеток В-ХЛЛ до лечения.

В 2008 г. в журнале «Blood» были опубликованы усовершенствованные рекомендации по диагностике и лечению В-ХЛЛ «Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute—Working Group 1996 guidelines» («Руководство по диагностике и лечению ХЛЛ: сообщение Международного рабочего совещания по ХЛЛ, усовершенствовавшего критерии рабочей группы Национального института рака в 1996 г.»). [1]. В разд. 5 «Определение ответа, рецидива и рефрактерной болезни» при описании полной ремиссии (ПР) включено понятие МОБ. Подчеркивается, что при изучении лимфоцитов крови в клинических исследованиях необходимо оценивать наличие МОБ после лечения с указанием чувствительности метода ее оценки. Детальное описание МОБ дано в разд. 5.9. Авторы констатируют, что полная эрадикация лейкоза — очевидная и желаемая конечная цель лечения. Современные методы (проточная цитометрия, ПЦР) показали, что у многих больных в ПР (NCI-WG, 1996) имеется МОБ. Методы обнаружения МОБ хорошо стандартизованы [1] и достаточно чувствительны для обнаружения 1 клетки ХЛЛ среди 10 000 лейкоцитов.

Определение МОБ:

- Больные считаются имеющими ПР с отсутствием МОБ, если количество клеток В-ХЛЛ в крови или костном мозге менее 1 на 10 000 лейкоцитов.
- Для оценки МОБ может быть исследована кровь.
- Костный мозг необходимо изучать на предмет МОБ не ранее чем через 4 мес. после окончания терапии, особенно если применяются моноклональные антитела (ритуксимаб или алемтузумаб).

Клинические исследования, направленные на достижение длительных ПР, должны включать оценку МОБ, т. к. ее отсутствие — сильный фактор благоприятного прогноза.

Таким образом, в усовершенствованных международных рекомендациях по диагностике и лечению В-ХЛЛ (2008) подчеркивается необходимость определять МОБ с помощью метода проточной цитометрии [2]. Это обусловлено тем, что больные с МОБ-положительной ПР по клиническому течению заболевания и показателям выживаемости не отличаются от больных с частичной ремиссией (ЧР), а у больных с МОБ-отрицательной ПР наблюдается большая длительность периода до прогрессирования и продолжительности жизни [3]. Следовательно, только использование критерия МОБ позволяет разграничить группы с ПР и ЧР у больных В-ХЛЛ. При этом, по мнению большинства авторов, не имеет значения, каким способом достигнута эрадикация МОБ, для благоприятного прогноза важен сам факт МОБ-отрицательного статуса при ПР.

Рекомендация использовать проточную цитометрию для оценки МОБ отнюдь не случайна. Существует множество проточно-цитометрических методов определения МОБ при В-ХЛЛ, и только в 2007 г. группой ученых из 22 институтов и клиник Европы и США под руководством А. Rawstron (Leeds, UK) был разработан стандартизованный протокол диагностики МОБ при В-ХЛЛ. Он получил название ERIC (European Research Initiative in B-CLL). Авторы сравнили 50 комбинаций моноклональных антител (в каждой четыре антитела, меченные различными флюорохромами) на предмет возможности разграничения клеток В-ХЛЛ и нормальных В-лимфоцитов. Отобраны три комбинации антител, и в итоговом варианте панель для определения МОБ включает пять проб (представлены в табл. 1), из которых первая предназначена для определения клональности CD5-позитивных В-лимфоцитов (при наличии моноклональности остальные определения необязательны).

Таблица 1. Комбинации антител, отобранные для идентификации клеток В-ХЛЛ в соответствии с протоколом ERIC

№ пробы	Флюорохром			
	FITC (FL1)	PE (FL2)	PerCP-Cy5.5/PE-Cy5.5 (FL3)	APC (FL4)
1	slgλ	slgκ	CD19	CD5
2	CD45	CD14	CD19	CD3
3	CD20	CD38	CD19	CD5
4	CD81	CD22	CD19	CD5
5	CD43	CD79b	CD19	CD5

Таким образом, стандартом определения МОБ при В-ХЛЛ в настоящее время считается четырехцветная проточная цитометрия.

На рис. 1 и 2 проиллюстрированы примеры и детали определения МОБ при В-ХЛЛ четырехцветным проточно-цитометрическим методом [4, 5].

Данный пример хорошо иллюстрирует моноклональность CD5-позитивных В-лимфоцитов по λ-цепям мембранных иммуноглобулинов уже на уровне 1-й пробы. Именно с этой целью используются пробы № 1 и 2, позволяющие оценить клональность В-клеток CD5+ в случае их незначительного количества, а также степень контаминации Т-клетками (детали установления гейта для снижения уровня контаминации можно получить на сайте: www.cllmrd.org). В представленном нами образце зарегистрирован 1 млн событий, из них лейкоцитов — 952 966, В-клеток немного — 35 030 (3,68 %), порог детекции — 0,00525 %. Иными словами, образец отвечает всем требованиям для оценки МОБ в соответствии со стандартизованным протоколом А. Rawstron и соавт. [2].

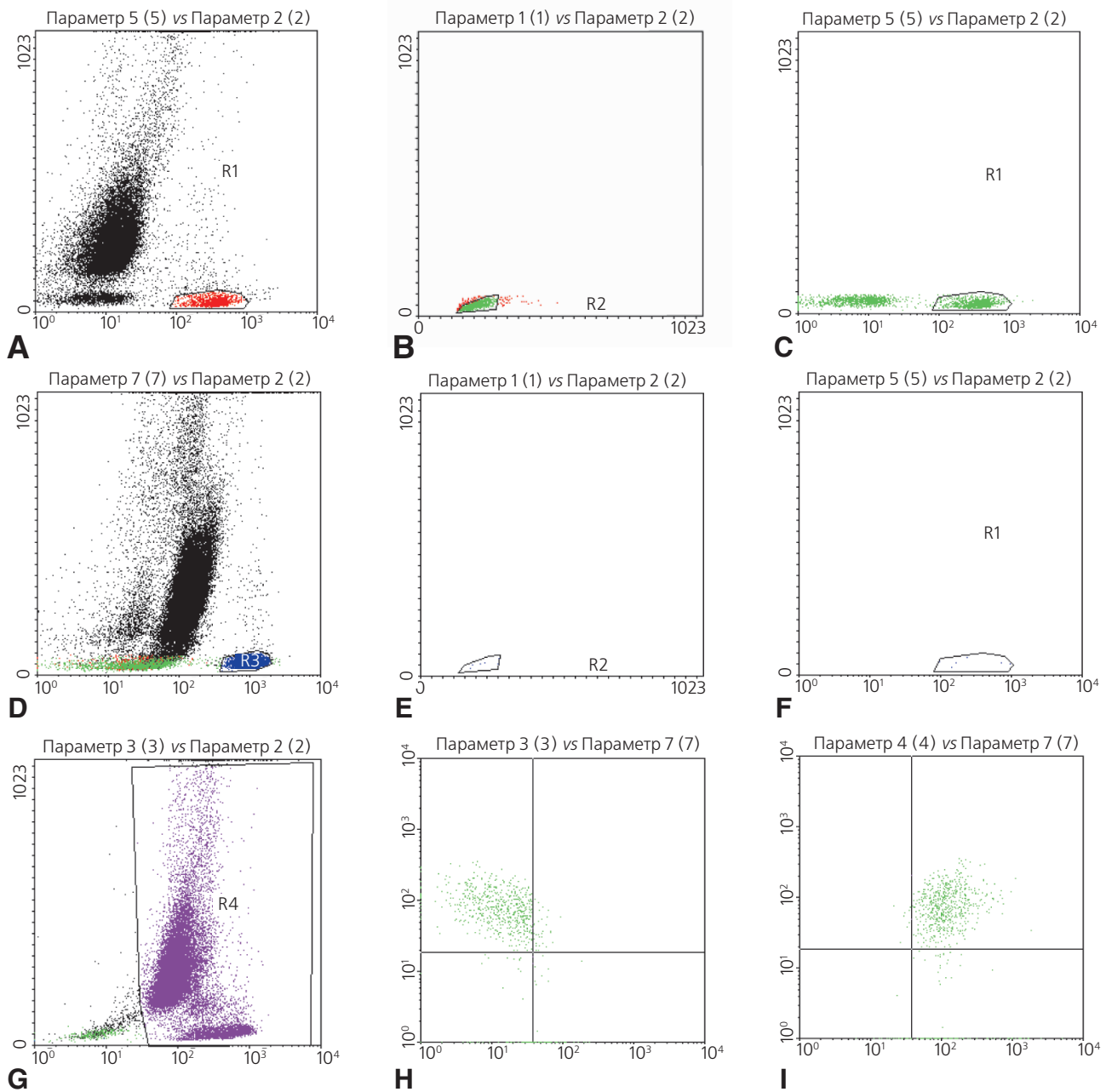


Рис. 1. Пробы № 1 и 2 в исследовании минимальной остаточной болезни (МОБ) при В-ХЛЛ по протоколу A. Rawstron и соавт. [2]. Выделение гейта В-клеток, установление уровня контаминации Т-клетками (порога детекции/обнаружения) и оценка клональности CD5-позитивных В-лимфоцитов. Продемонстрирована необходимость включения проб № 1 и 2 (см. табл. 1) для идентификации В-лимфоцитов, в пределах которых проводится дальнейший анализ: *a* — проба 2. CD19 (ось X) против SSC (ось Y), все клетки (без гейта). Формируется область R1 вокруг популяции В-клеток (CD19+ SSClow). Первоначально эта область должна включать максимально возможное количество В-клеток и исключать моноциты на основании светорассеяния; *b* — проба 2. FSC (ось X) против SSC (ось Y). Формируется область R2 вокруг популяции В-лимфоцитов, исключая апоптотические, разрушенные (дебрис) клетки и клеточные дуплеты; *c* — проба 2. CD19 (ось X) против SSC (ось Y) в гейте R2; *d* — проба 2. CD3 (ось X) против SSC (ось Y) в гейте R1+R2+R3; *e* — проба 2. FSC (ось X) против SSC (ось Y) в гейтах R1+R2+R3. Количество клеток в гейте на этой цитограмме иллюстрирует контаминацию выделенного региона В-клеток Т-лимфоцитами (в представленном случае — 6 клеток). Это позволяет определить предел детекции/обнаружения МОБ в анализируемом материале (описано ниже); *g* — проба 2. CD45 (ось X) против SSC (ось Y) без гейта. Формируется область R4 вокруг лейкоцитов (CD45+), исключая эритроидные клетки и дебрис; *h* — проба 1. κ-цель Ig (ось X) против CD5 (ось Y) в гейте R1+R2; *i* — проба 1. λ-цель Ig (ось X) против CD5 (ось Y) в гейте R1+R2 FSC — параметр прямого рассеяния света лазерного луча; SSC — параметр бокового рассеяния света лазерного луча; SSClow — низкое боковое светорассеяние лазерного луча.

Важно подчеркнуть, что в усовершенствованном руководстве 2008 г. по диагностике и лечению В-ХЛЛ [1] говорится о необходимости изучения МОБ с целью более точного определения глубины противоопухолевого ответа, разграничения ПР и ЧР, но не дается рекомендаций относительно того, что достижение МОБ-отрицательного статуса является целью терапии.

Этому вопросу посвящено большое число работ. В одной из наиболее авторитетных статей [6] сравниваются результаты лечения первичных больных В-ХЛЛ в за-

висимости от достижения МОБ-отрицательного статуса, а также проводится соответствующий анализ у больных с рецидивами и рефрактерным ХЛЛ. Внимание уделено вопросам консолидирующей и поддерживающей терапии. К сожалению, относительно МОБ после аллогенной трансплантации при ХЛЛ информации недостаточно. В абсолютном большинстве работ достижение МОБ-отрицательного статуса (вне зависимости от метода лечения, с помощью которого он достигнут) ассоциировалось со значительно более длительной продолжительностью

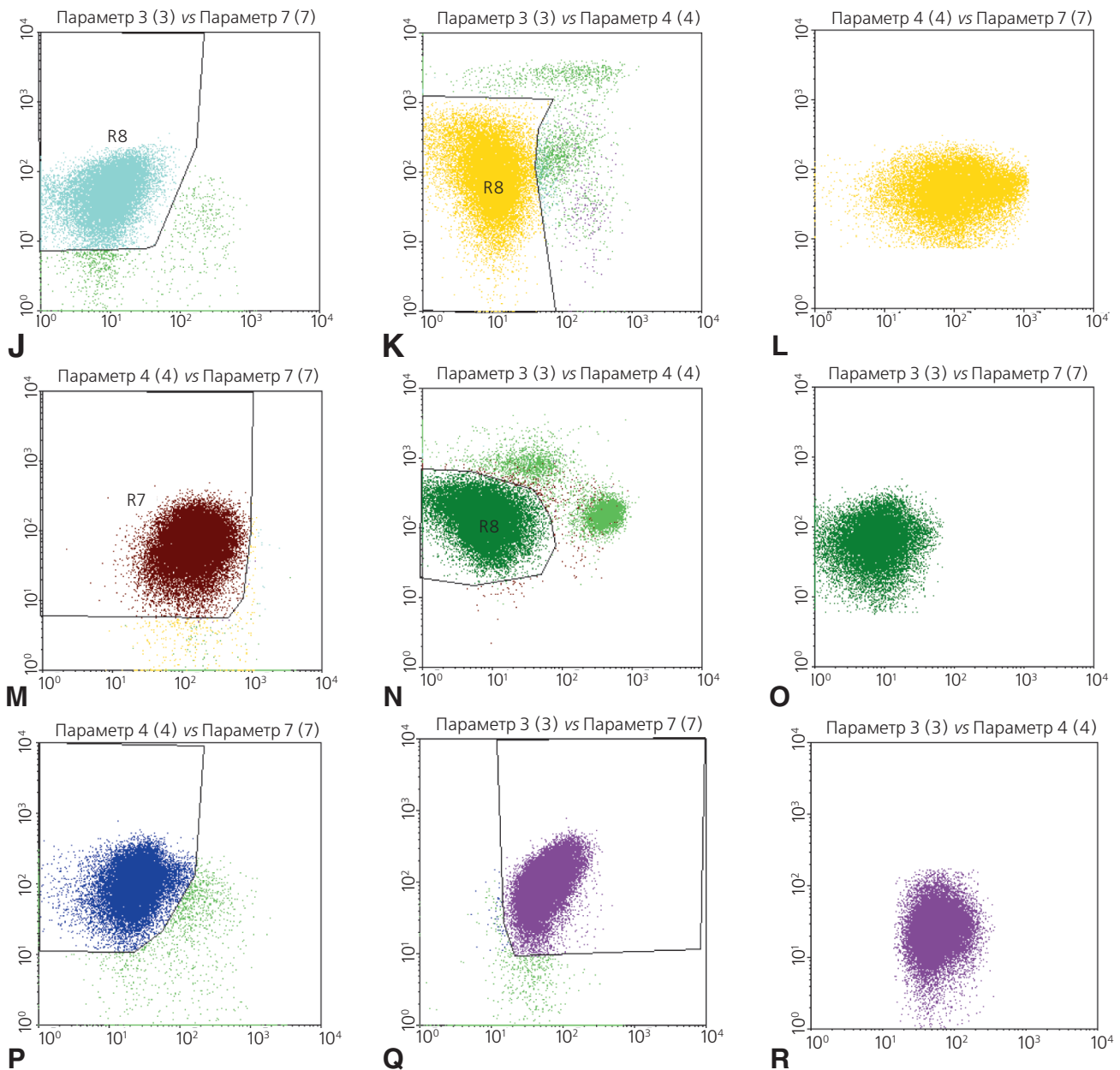


Рис. 2. Пробы № 3, 4 и 5 в исследовании минимальной остаточной болезни при В-ХЛЛ по протоколу A. Rawstron и соавт. [2]. Установление экспрессии CD20, CD38, CD22, CD81, CD79b, CD43 на CD5-положительных В-лимфоцитах: *j* — проба 3. CD20 (ось X) против CD5 (ось Y) в регионе R1+R2, показано формирование региона R5, включающего CD5-положительные (экспрессия CD5 слабая), CD20-слабоположительные В-клетки; *k* — проба 3. CD20 (ось X) против CD38 (ось Y) в гейтах R1+R2. Формируется область R6, исключающая В-лимфоидные предшественники с яркой экспрессией CD38, а также все В-клетки с выраженной экспрессией CD20 вне зависимости от уровня CD38; *l* — проба 3. CD38 (ось X) против CD20 (ось Y) в гейтах R1+R2+R5+R6. Количество клеток В-ХЛЛ в этом регионе 29 886, а общее количество В-лимфоцитов в данной пробе 35 905, т. е. клетки В-ХЛЛ составляют 83,24% среди В-лимфоцитов. Учитывая общее относительное содержание В-клеток среди миелокарицитов (3,68%), доля клеток В-ХЛЛ среди них в костном мозге составила 3,06%; *m* — проба 4. CD22 (ось X) против CD5 (ось Y) в гейте R1+R2. Формируется область В-клеток CD5+ (R7), исключающая клетки с яркой экспрессией CD22 (в представленном образце различий в уровне экспрессии CD22 между клетками В-ХЛЛ и нормальными В-лимфоцитами практически нет); *n* — проба 4. CD81 (ось X) против CD22 (ось Y) в гейте R1+R2. Формируется область R8, исключающая клетки с выраженной экспрессией CD81 и более интенсивной экспрессией CD22 (в данной пробе клетки В-ХЛЛ разделились от нормальных В-лимфоцитов на основании экспрессии CD22); *o* — проба 4. CD81 (ось X) против CD5 (ось Y) в гейтах R1+R2+R7+R8. Количество клеток В-ХЛЛ, отвечающих этим требованиям, равно 28 070, общее количество В-клеток в данной пробе 35 905, т. е. клетки В-ХЛЛ составляют 78,18% среди В-лимфоцитов. Учитывая общее относительное содержание В-клеток среди миелокарицитов (3,68%), доля клеток В-ХЛЛ среди них в костном мозге составила 2,88%; *p* — проба 5. CD79b (ось X) против CD5 (ось Y) в гейтах R1+R2. Формируется область клеток R9, положительных по CD5 со слабой экспрессией CD79b; *q* — проба 5. CD43 (ось X) против CD5 (ось Y) в гейтах R1+R2. Формируется область R10, положительная по CD5 с отчетливой экспрессией CD43; *r* — проба 5. CD43 (ось X) против CD79b (ось Y). Количество клеток В-ХЛЛ, отвечающих этим требованиям, равно 30 567, общее количество В-клеток в данной пробе 38 220, т. е. клетки В-ХЛЛ составляют 80,2% среди В-лимфоцитов. Учитывая общее относительное содержание В-клеток среди миелокарицитов (3,68%), доля клеток В-ХЛЛ среди них в костном мозге составила 2,95%

периода до прогрессирования и общей выживаемостью. Однако остается неясным, насколько достижение МОБ-отрицательного статуса является целью лечения.

Решение этой проблемы чрезвычайно сложно, т. к. нет консенсуса даже относительно первичного лечения В-ХЛЛ: отдавать ли предпочтение флударабинсодержащим режимам с добавлением анти-CD20 моноклональных антител (именно эти схемы терапии приводят

к большей частоте МОБ-отрицательного статуса) в случаях отсутствия аномалий р53.

Результаты первого крупного рандомизированного исследования III фазы продемонстрировали, что эрадикация МОБ улучшает показатели выживаемости независимо от примененного метода лечения [7, 8]. На практике не существует прямых указаний на то, у каких больных целесообразно проведение эрадикации МОБ. В каждом

Протокол эрадикации МОБ UKCLL07

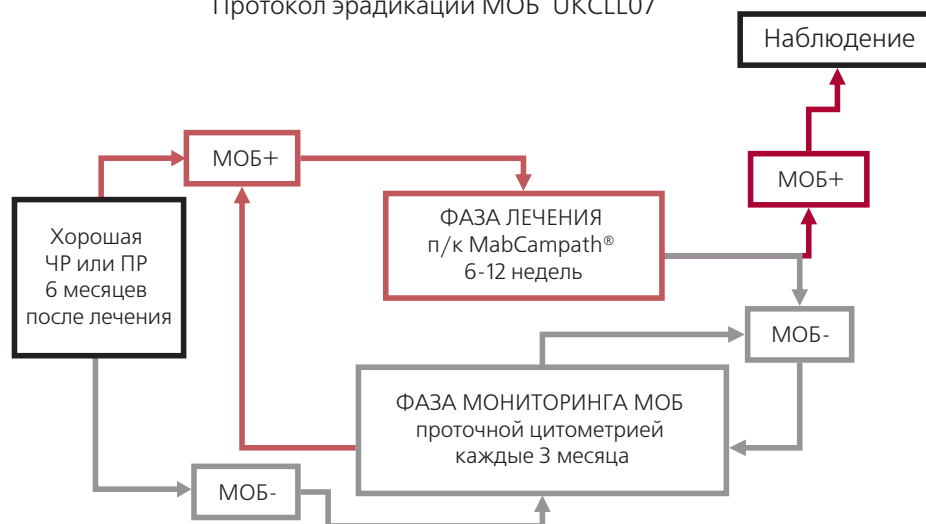


Рис. 3. Протокол эрадикации минимальной остаточной болезни (МОБ) UKCLL07 (по [11])

конкретном случае вопрос решается индивидуально. В целом можно отметить, что эрадикация МОБ должна быть целью лечения у больных с нормальным соматическим статусом и прогрессирующей симптоматической болезнью (при отсутствии противопоказаний к эрадикации МОБ). Этот принцип особенно применим для пациентов с неблагоприятными прогностическими факторами: немутированными IgV_H , ZAP-70+, 17p-, 11q-. Какой тип лечения применить для эрадикации МОБ, зависит от ряда причин. Например, у больных с делецией 17p наблюдается значительно более низкая частота ответов, а также выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости на фоне флударабинсодержащих схем. Это обусловлено тем, что флударабин вызывает р53-зависимые ответы. В этих случаях показано применение алемтузумаба (в качестве монотерапии или в комбинациях с другими препаратами), т. к. он вызывает р53-независимый ответ [9, 10].

При достижении МОБ-отрицательного статуса показано регулярное наблюдение в отношении рецидива МОБ. Подобное исследование проводится в Великобритании (в качестве первой линии терапии используются схемы на основе пуриновых аналогов). Больные, у которых после проведенного лечения сохраняется МОБ, получают алемтузумаб подкожно в течение 6–12 нед. до достижения МОБ-эрадикации. Затем продолжается наблюдение согласно схеме, представленной на рис. 3 (схема приводится по докладу А. Rawstron на VII Российской с международным участием конференции «Иммунология гемопоэза» [11]).

Установление отличий иммунофенотипа клеток В-ХЛЛ от нормальных В-лимфоцитов в ходе работ по поиску критериев МОБ при В-ХЛЛ позволило существенно усовершенствовать и первичную диагностику этого заболевания. На практике достаточно часто встречаются aberrantные фенотипы В-ХЛЛ — с высоким уровнем CD20, моноклональных мембранных иммуноглобулинов, слабой или нечеткой экспрессией CD23, CD5 и т. д. Наиболее часто в таких случаях возникает вопрос о необходимости дифференциальной диагностики с другими мелкоклеточными В-лимфомами (фолликулярной, лимфомой зоны мантии или маргинальной зоны). К настоящему времени нами проанализирован иммунофенотип у 50 больных В-ХЛЛ с особенностями иммунофенотипа при первичной диагностике. Применение протокола ERIC в большин-

стве случаев позволяет установить правильный диагноз методом иммунофенотипирования с использованием четырехцветной проточной цитометрии. **Важно помнить, что резидуальными в данном случае являются не лейкозные, а нормальные В-лимфоциты.** Для их обнаружения, так же как и в случае детекции МОБ, требуется цитометрический анализ большого числа клеток — от 100 000 до 1 000 000. На рис. 4 показано отличие фенотипа нормальных В-клеток от клеток В-ХЛЛ при диагностике заболевания.

Информативным и чрезвычайно полезным при первичной диагностике В-ХЛЛ является сочетание экспрессии маркеров CD22/CD81 в пределах CD5-позитивных В-лимфоцитов (см. рис. 2, n).

Маркеры CD22 и CD81 в настоящее время не являются мишенями противоопухолевой терапии В-ХЛЛ (хотя лечебные антитела к CD22 уже получены), и обнаружение характерного для ХЛЛ профиля экспрессии этих молекул позволяет определять истинное количество клеток с соответствующим фенотипом как при диагностике, так и в процессе лечения. Это выгодно отличает данную комбинацию от таковой с использованием маркера CD20, на уровень экспрессии которого могут повлиять режимы лечения ХЛЛ, включающие ритуксимаб.

Следует отметить, что несмотря на установленные отличия фенотипа клеток В-ХЛЛ от нормальных лимфоцитов, отдельные маркеры информативны не в 100 % случаев В-ХЛЛ. Важное преимущество использования критериев протокола ERIC при диагностике В-ХЛЛ в том, что для больных могут быть подобраны индивидуальные маркеры и их комбинации, пригодные в дальнейшем для мониторинга МОБ. Таким образом, использование маркеров, включенных в панель антител протокола ERIC при первичной диагностике В-ХЛЛ, позволяет верифицировать диагноз В-ХЛЛ, исключить другие варианты индолентных лимфом и индивидуально подбирать маркеры для мониторинга МОБ в процессе лечения [12].

С внедрением протокола ERIC многие аспекты диагностики МОБ стали стандартизованы. Протокол позволил усовершенствовать и первичную диагностику ХЛЛ. Вместе с тем иммунодиагностика этого заболевания не стоит на месте. Предложены 6- и 8-цветные панели антител, которые позволяют сократить число проб. Так, А. Rawstron предложил использовать 6-цветную панель антител, которая включает

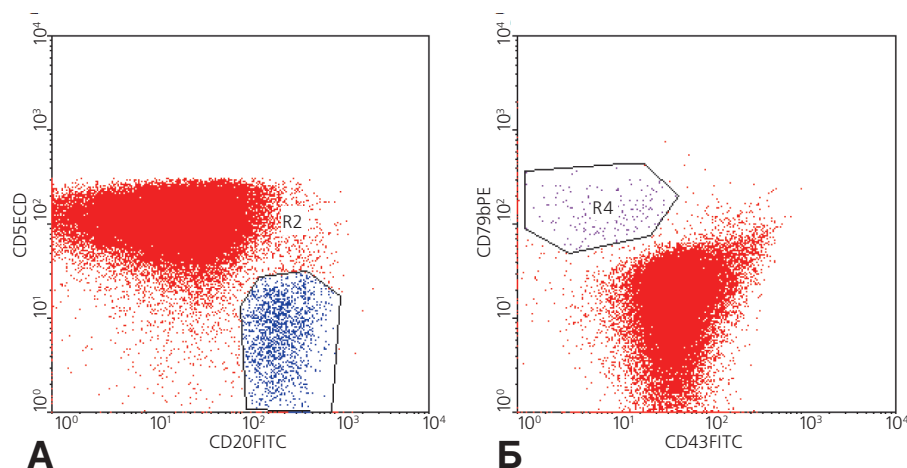


Рис. 4. Пример успешного использования четырехцветного цитометрического протокола обнаружения МОБ в первичной диагностике В-ХЛЛ: **А** — наблюдение 1. Представлены клетки в гейте В-лимфоцитов (CD19+). Нормальные В-лимфоциты (обведены на рисунке) составляют 1,9% всех В-клеток и характеризуются более интенсивной экспрессией CD20 в сравнении с остальными В-лимфоцитами (клетками В-ХЛЛ); **Б** — наблюдение 2. Представлены клетки в гейте CD19+CD5+. Нормальные остаточные В-лимфоциты (обведены на рисунке), характеризующиеся более выраженной экспрессией CD79b и отсутствием антигена CD43 (в сравнении лимфоцитами В-ХЛЛ), составляют 0,4% всех В-клеток

Таблица 2. Панель моноклональных антител для дифференциальной диагностики В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний

№ пробы	Флюорохром							
	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PECy7	APC	APC-H7
1*	CD20/CD4	CD45	slgλ/CD8	slgκ/CD56	CD5	CD19/TCRγδ	CD3	CD38
2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
3	CD20	CD45	CD31	LAIR	CD11c	CD19	slgM	CD81
4	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d
5	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	—**

* Скрининговая панель.

** В данной пробе 7 цветов.

CD81FITC, CD22PE, CD5PerCP-Cy5.5, CD43APC, CD19PE-Cy7, CD20-APC-H7 [11]. Европейскими консорциумами по онкогематологии активно ведется работа по совершенствованию первичной диагностики МОБ при ХЛЛ. Профессора Ж. Ван Донген и А. Орфао предлагают использование 8-цветного подхода (табл. 2) [13].

Эта панель позволяет проводить дифференциальную диагностику всех зрело-В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний и при использовании программы INFINICYT интегрировать пробирки с возможностью реализации 30-цветной проточной цитометрии [13]. Важно отметить, что наряду с традиционными подобный подход включает и ряд новых маркеров (CD200, LAIR, CXCR5 и т. д.), которые, судя по последним публикациям, весьма информативны.

Возможности многоцветной проточной цитометрии поистине многообразны. На наш взгляд, в этом вопросе нет предела совершенству. Вместе с тем, поскольку речь идет о диагностике (первичной МОБ), то важно придерживаться определенных стандартов и говорить «на общем языке». Несомненно, европейский стандарт, заложенный протоколом ERIC, может на ближайшие годы остаться полезным и шире тиражироваться в диагностике ХЛЛ и обнаружении остаточного клона (МОБ). Это отнюдь не исключает дальнейшее накопление опыта с использованием 6–8-цветной проточной цитометрии при данном заболевании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–56.

2. Rawstron A.C., Villmor N., Ritgen M. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21(5): 956–64.

3. Moreton P., Kennedy B., Lukas G. et al. Eradication of minimal residual disease in B-CLL Chronic lymphocytic leukemia after Alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(13): 2971–9.

4. Купрышина Н.А., Гривцова Л.Ю., Тулицын Н.Н. Определение минимальной резидуальной болезни при В-клеточном хроническом лимфолейкозе по стандартизованному Европейско-Американскому протоколу 2007 г. *Общие положения и иллюстрации на конкретном примере. Иммунол. гемопоза* 2008; 2: 60–75.

5. Тулицын Н.Н. Стандартизованный иммунологический протокол определения минимальной остаточной болезни при В-клеточном хроническом лимфолейкозе. *Клин. онкогематол.* 2010; 3(2): 217.

6. Varghese A.M., Rawstron A.C., Hillmen P. Eradicating minimal residual disease in Chronic lymphocytic leukemia: should this be the goal of treatment? *Curr. Hematol. Malign. Rep.* 2010; 5: 35–44.

7. Boettcher S., Fischer K., Stilgenbauer S. et al. Quantitative MRD assessments predict progression free survival in CLL patients treated with fludarabine and cyclophosphamide with or without rituximab — a prospective analysis in 471 patients from the randomized GCLLSG CLL8 trial [abstract]. *Blood (ASH Annual meeting abstracts)* 2008; 112: abstract 326.

8. Hallek M., Fingerle-Rowson G., Fink A.M. et al. Immunochemotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus fludarabine and cyclophosphamide (FC) improves response rates and progression-free survival (PFS) of previously untreated patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia [abstract]. *Blood (ASH annual meeting abstracts)* 2008; 112: abstract 325.

9. Stilgenbauer S., Krober A., Busch R. et al. 17p deletion predicts for inferior overall survival after fludarabine based first line therapy in chronic lymphocytic leukemia: first analysis of genetics in the CLL4 trial of the GCLLSG [abstract]. *Blood* 2005; 106: 212a.

10. Lozanski G., Heerema N.A., Flinn I.W. et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 2004; 103: 3278–81.

11. Роустрон Э.С. Минимальная остаточная болезнь при хроническом лимфоцитарном лейкозе. *Иммунол. гемопоза* 2011; 1: 60.

12. Тулицына Д.Н., Купрышина Н.А., Гривцова Л.Ю. Критерии минимальной остаточной болезни В-клеточного хронического лимфолейкоза в диагностике индолентных лимфом. *Вестн. гематол.* 2011; VII(1): 52–3.

13. van Dongen J.J.M. EuroFlow достижения и проблемы. Новая концепция проточно-цитометрического обнаружения минимальной остаточной болезни при острых лейкозах. *Иммунол. гемопоза* 2011; 2: 131–62.