

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.155.392.2-036.12-085-036.86]-076.5-073.175

Кисиличина Д.Г.¹, Луговская С.А.¹, Наумова Е.В.¹, Почтарь М.Е.¹, Никитин Е.А.², Долгов В.В.¹**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА**

¹Кафедра клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, ²ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4а

Достижение молекулярной ремиссии ассоциируется с увеличением выживаемости больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Важным направлением исследований является поиск параметров, применимых для прогнозирования ответа на терапию. Целью работы была оценка прогностической значимости показателя минимальной резидуальной болезни (МРБ), определяемого методом проточной цитофлюориметрии периферической крови пациентов с ХЛЛ во время проведения терапии.

112 пациентов с ХЛЛ (возраст от 43 до 82 лет) получили лечение, состоящее из 6 курсов иммунохимиотерапии комбинацией флударабина с циклофосфаном и ритуксимабом (FCR). Образцы периферической крови исследовали после 3 курсов (во время терапии) и 6 курсов (по завершении лечения). Клетки анализировали с помощью 5- и 6-цветной проточной цитометрии с целью выявления ХЛЛ-ассоциированного иммунофенотипа. Оценку МРБ проводили с использованием международного стандартизованного протокола (Rawstron A.C. et al., 2007; 21 (5): 956-64).

МРБ-негативный статус был достигнут у 87 (78%) пациентов при оценке ответа после 6-го курса терапии. Использование показателей резидуальной болезни после 3 курсов FCR позволило выделить 2 группы больных ХЛЛ: 67 пациентов с низким (<0,12%) уровнем МРБ и 45 пациентов с высоким (≥0,12%) уровнем опухолевых клеток. Частота молекулярной ремиссии после завершения лечения в данных группах составила 100 и 44% соответственно.

Данная работа демонстрирует возможности ранней иммунофенотипической оценки МРБ для прогнозирования различий в ответе на лечение у пациентов с ХЛЛ, что позволит избежать нежелательную токсичность терапии либо выбрать метод консолидации.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз; минимальная резидуальная болезнь; проточная цитофлюориметрия.

D.G. Kisilichina, S.A. Lugovskaya, E.V. Naumova, M.E. Pochtar, E.A. Nikitin, V.V. Dolgov

THE PROGNOSTIC VALUE OF EVALUATION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE USING TECHNIQUE OF FLOW CYTOFLUOROMETRY DURING APPLICATION OF THERAPY OF CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA

The achievement of molecular remission is associated with increasing of survival of patients with chronic lymphatic leukemia. The important direction of research is seeking of parameters applicable to forecast of response to therapy. The purpose of the study was evaluating prognostic significance of indicator of minimal residual disease detected by technique of flow cytofluorometry of peripheral blood of patients with chronic lymphatic leukemia during therapy application. The sampling included 112 patients with chronic lymphatic leukemia aged from 43 to 82 years. All patients were given treatment consisted of 6 courses of immune chemotherapy combined with fludarabine with cyclophosphan and rituximab. The samples of peripheral blood were analyzed after 3 courses during therapy and after 6 courses after completion of treatment. The cells were analyzed using 5 and 6 color flow cytometry for the purpose of detection of immune phenotype associated with chronic lymphatic leukemia. The evaluation of minimal residual disease was implemented according international standardized protocol (Rawstron A.C. et al. 2007; 21 (5): 956-64).

The minimal residual disease negative status was reached in 87 (78%) patients during evaluation of response after 6th course of treatment. The implementation of indicators of residual disease after 3 courses with fludarabine, cyclophosphan and rituximab permitted to sort out two groups of patients with chronic lymphatic leukemia i.e 67 patients with low (<0.12%) level of minimal residual disease and 45 patients with high (>0.12%) level of tumor cells. The rate of molecular remission after completion of treatment in the given groups consisted 100% and 44% correspondingly.

The study demonstrates possibilities of early immune phenotype evaluation of minimal residual disease to forecast differences in response to treatment in patients with chronic lymphatic leukemia that makes it possible to avoid undesirable toxicity of therapy or to choose method of consolidation.

Key words: chronic lymphatic leukemia; minimal residual disease; flow cytofluorometry.

Введение. В последнее десятилетие разработаны иммунохимиотерапевтические схемы лечения В-клеточного хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ), позволившие получить

полную клинко-гематологическую ремиссию и улучшить продолжительность жизни больных [1]. Комбинация флударабина с циклофосфамидом и ритуксимабом (режим FCR), продемонстрировав высокую эффективность, становится “золотым стандартом” первой линии терапии у больных В-ХЛЛ с хорошим соматическим статусом [2]. Одновременное развитие высокочувствительных лабораторных технологий приводит к изменению критериев оценки качества получаемого ответа – появляется возможность обнаружения циркулирую-

Для корреспонденции:

Луговская Светлана Алексеевна, д-р мед. наук, проф. каф. КЛД
Адрес: 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1
E-mail: slugovskaya@mail.ru

Таблица 1

МкАТ для оценки МРБ при В-ХЛЛ

Флюорохром	МкАТ
FITC	CD43, CD3, CD38, CD22, Каппа**
PE	CD14, CD20, CD81, CD79b, Lambda**
PE-Cy5.5	CD19, CD5, CD45
PE-Cy7	CD5, CD19
ECD	CD45
APC	CD5*, CD20*, CD45
APC-Cy7	CD45*, CD3*

Примечание. Все антитела, если это не указано специально, производства "Beckman Coulter"; * – антитела производства "Becton & Dickinson"; ** – антитела производства "Dako".

щих клеток В-ХЛЛ в количестве до 0,01% от числа лейкоцитов [3, 4]. Сохранение опухоли на столь низком уровне у пациентов в состоянии клинико-гематологической ремиссии характеризуется наличием минимальной резидуальной болезни (МРБ) – неблагоприятного фактора прогноза, обуславливающего развитие рецидива [5]. Согласно современным рекомендациям оценку МРБ при В-ХЛЛ следует проводить по завершении лечения, используя пациент-специфическую ПЦР либо многоцветную проточную цитофлюориметрию [6]. Оба подхода способны выявлять 1 опухолевую клетку из 10 000 проанализированных, т.е. обеспечивают чувствительность метода, составляющую 10-4 [7, 8].

Важно, что МРБ-негативные (молекулярные) ремиссии способствуют увеличению продолжительности жизни больных В-ХЛЛ [9], в то время как случаи полного клинико-гематологического ответа при детектируемой персистенции остаточного опухолевого клона по показателям выживаемости не отличаются от частичной ремиссии [10]. В связи с этим цель назначения режима FCR больным В-ХЛЛ с хорошим соматическим статусом состоит в эрадикации МРБ. В последние годы появляются работы, посвященные изучению режимов со снижением стандартного числа циклов терапии при хорошем ответе либо увеличением продолжительности лечения при сохраняющейся персистенции МРБ [11–13]. Однако на сегодняшний день отсутствуют показатели прогнозирования эффективности различных подходов до проведения терапии в полном объеме. Значительная гетерогенность качества ремиссии у пациентов с В-ХЛЛ одновременно с развитием новых терапевтических стратегий дикту-

Таблица 2

Комбинации маркеров для оценки МРБ при В-ХЛЛ: 5-цветная панель МкАТ для Cytomics FC500 BC

№ пробы	FITC	PE	ECD	Pe-Cy5	Pe-Cy7
1	sIgk	sIgl	CD45	CD19	CD5
2	CD3	CD14	CD45	CD19	CD5
3	CD38	CD20	CD45	CD19	CD5
4	CD22	CD81	CD45	CD19	CD5
5	CD43	CD79b	CD45	CD19	CD5

Таблица 3

Комбинации маркеров для оценки МРБ при В-ХЛЛ: 6-цветная панель МкАТ для FACS Canto II ИВ

№ пробы	FITC	PE	Pe-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-Cy7
1	sIgk	sIgl	CD19	CD5	CD20	CD45
2	CD22	CD81	CD19	CD5	CD45	CD3
3	CD43	CD79b	CD38	CD19	CD5	CD45

ют необходимость поиска надежных предикторов достижения глубокого ответа [14, 15].

Цель настоящей работы – оценка возможности использования ранних показателей кинетики элиминации клона В-ХЛЛ на фоне применения FCR для прогнозирования качества окончательного ответа. Определение МРБ производили с помощью иммунофенотипирования методом многоцветной проточной цитофлюориметрии как наиболее быстрого способа выявления остаточной опухоли.

Материалы и методы. Обследованы 112 пациентов с В-ХЛЛ, среди которых 68 мужчин и 44 женщины в возрасте от 43 до 82 лет (медиана возраста – 67 лет). Анализ МРБ выполняли в двух точках наблюдения: после 3 курсов FCR (оценка промежуточного ответа) и по завершении лечения в стандартном объеме 6 курсов терапии (оценка окончательного ответа). Материалом исследования служили образцы периферической крови, стабилизированные К2ЭДТА.

Оценку остаточного опухолевого клона осуществляли с помощью метода 5- и 6-цветной лазерной проточной цитофлюориметрии на приборах FACS Canto II ("Becton & Dickinson", США) и Cytomics FC500 ("Beckman Coulter", США) с использованием реагентов производства "Becton & Dickinson", "Beckman Coulter" и "Dako" (табл. 1). Пробоподготовка образцов периферической крови включала следующие эта-

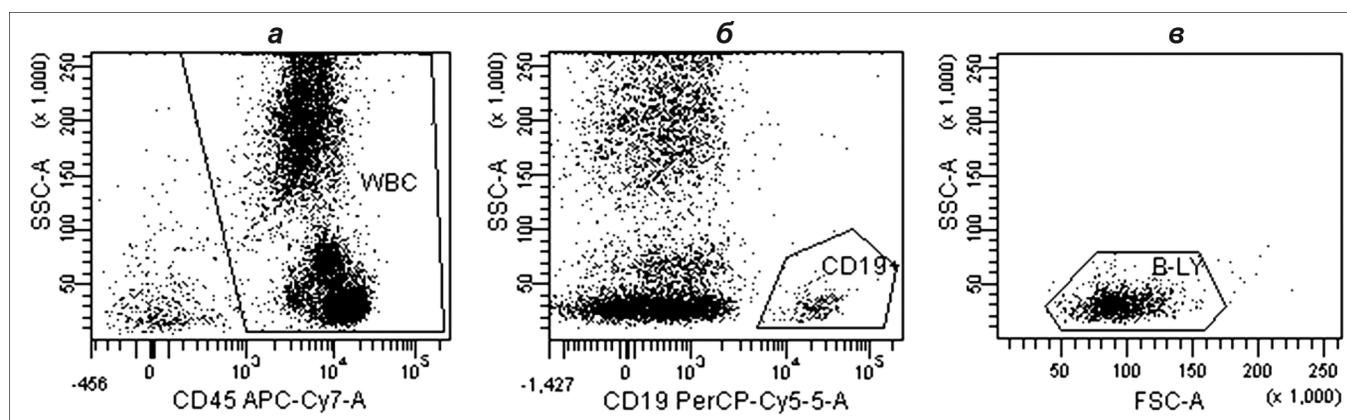


Рис. 1. Первый этап гейтирования в ходе анализа МРБ при В-ХЛЛ: а – выделение CD45-позитивных лейкоцитов; б – гейтирование В-клеток по экспрессии CD19; в – коррекция В-клеточного гейта по параметрам светорассеяния (проточный цитометр FACS Canto II).

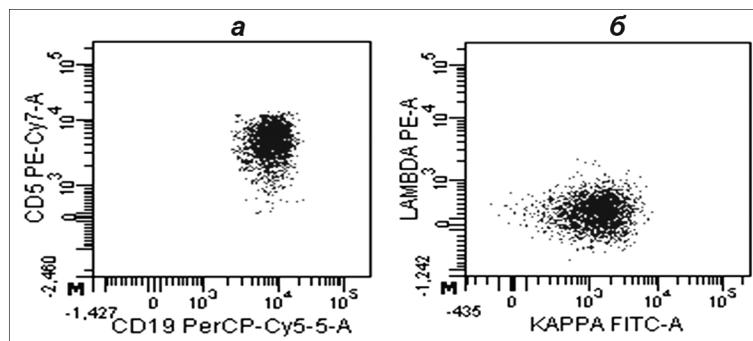


Рис. 2. Оценка экспрессии CD5 (а) и клональности (б) В-клеток в пробе. Все CD19-позитивные события представлены клетками В-ХЛЛ (проточный цитометр FACS Canto II).

пы: добавление к образцу (содержащему не менее 10^6 лейкоцитов) лизирующего эритроциты раствора (Pharm Lysing solution, Becton & Dickinson), двукратную отмывку с помощью 4 мл фосфатно-солевого буфера (Cell Wash, “Becton & Dickinson”) в режиме центрифугирования 300g 5 мин, инкубацию клеток с моноклональными антителами (МкАТ) в течение как минимум 15 мин. Далее производили анализ на проточном цитофлюориметре, обязательным условием которого был сбор не менее $5 \cdot 10^5$ лейкоцитов в каждой пробе.

Обработку полученных результатов выполняли в соответствии с рекомендациями международного стандартизованного подхода к оценке МРБ при В-ХЛЛ [7], модифицированного добавлением МкАТ к CD45 в каждую пробу для более точного расчета количества лейкоцитов. Для Cytomics FC500 использовали 5-цветную панель МкАТ (табл. 2), а в случае FACS Canto II были составлены 6-цветные комбинации реагентов (табл. 3).

В основе анализа данных лежала стратегия последовательного гейтирования, первым этапом которой являлось выделение лейкоцитов среди всех собранных в пробе событий по экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45, позволяющего исключить из области анализа CD45-негативные эритроидные клетки и детрит (рис. 1, а). Далее определяли В-клетки по позитивной экспрессии В-клеточного маркера CD19 (рис. 1, б) с последующей коррекцией гейта по параметрам светорассеяния, исключая разрушенные клетки, т. е. мелкие по размеру события, и клеточные дублеты, характеризующиеся высокими параметрами светорассеяния (рис. 1, в). Все последующие действия выполняли для событий скорректированного таким образом В-клеточного гейта.

Следующим этапом обработки данных проводили оценку фактического порога детекции метода в анализируемом образце. Для этой цели вычисляли уровень контаминации В-клеточного гейта CD3-позитивными событиями. Порог детекции рассчитывали как отношение количества клеток объединенного гейта (регион CD19⁺ и CD3⁺) к числу собранных в пробе лейкоцитов, и получаемое значение отражало уровень загрязненности пробы. Такую пороговую величину устанавливали для разграничения искомым опухолевых клеток и продуктов неспецифического связывания

Таблица 4

Результаты определения МРБ в периферической крови 112 больных В-ХЛЛ при промежуточной и окончательной оценке эффективности терапии

Число курсов FCR	МРБ "-"		МРБ "+"	
	число случаев (%)	число случаев (%)	% МРБ (Me; min-max)	
3 курса	32 (29)	80 (71)	0,17; 0,01–9,98	
6 курсов	87 (78)	25 (22)	0,07; 0,01–2,68	

антител. Чувствительность исследования определяли как уровень, превышающий рассчитанный порог детекции. Для достижения чувствительности 10^{-4} при анализе $5 \cdot 10^5$ лейкоцитов порог детекции не должен превышать 0,01%, т. е. 50 событий. Дополнительно для оценки уровня контаминации можно использовать монокитарный маркер CD14 [16].

При соответствии рассмотренных показателей условиям международного протокола (т. е. число проанализированных лейкоцитов $\geq 5 \cdot 10^5$ клеток и уровень контаминации $< 0,01\%$) производили анализ CD19-позитивных событий. По данным пробы 1 (см. табл. 1, 2) оценивали экспрессию маркера CD5 и клональность В-клеток (рис. 2).

При выявлении моноклональной CD5-позитивной популяции В-клеток, составляющей не менее 50 событий, устанавливали МРБ-позитивный статус образца уже на данном этапе обработки результатов. Однако при наличии в исследуемом материале нормальных В-клеточных предшественников или зрелых поликлональных В-лимфоцитов, часть которых в норме экспрессирует маркер CD5, для обнаружения клеток В-ХЛЛ требовался анализ дополнительных информативных маркеров (рис. 3). На графиках CD20 vs CD5 и CD20 vs CD38 клетки В-ХЛЛ выделяли по экспрессии CD5 и одновременно низкой плотности CD20 и CD38. При этом В-клеточные предшественники характеризовались яркой экспрессией CD38, а зрелые В-лимфоциты отличались высокой плотностью маркера CD20. Согласно данным графиков CD22 vs CD5 и CD81 vs CD22 опухолевые В-клетки дифференцировали по наличию CD5 и низкой экспрессии антигенов CD81 и CD22. При анализе CD79b vs CD5 и CD43 vs CD5 выделяли области CD5/CD43-позитивных событий со слабой экспрессией CD79b. Таким образом, одновременный анализ нескольких В-клеточных маркеров в каждой из рассмотренных комбинаций позволял дифференцировать опухолевые клетки В-ХЛЛ от нормальных предшественников и зрелых В-лимфоцитов.

В случае FACS Canto II 6-цветный анализ позволял, помимо построения гейтирующей схемы стандартизованного протокола, применять дополнительные комбинации информативных маркеров. Так, благодаря сочетанию в одной пробе антител к CD38 вместе с парой CD79b/CD43 анализировали графики CD43 vs CD38 и CD79b vs CD38.

Для констатации наличия МРБ в соответствующих характеристикам В-ХЛЛ регионах должно было определяться не менее 50 событий, т. е. не ниже установленного порога детекции. Величину клона вычисляли как отношение среднего по результатам анализа проб количества клеток в гейтах В-ХЛЛ к количеству лейкоцитов, т. е. CD45-позитивных событий.

Результаты и обсуждение. Среди 112 обследованных больных В-ХЛЛ у 32 (29%) опухолевый клон не выявлялся уже после первых циклов терапии с сохранением МРБ-негативного статуса при оценке окончательного ответа. У 55 (49%) больных остаточный клон обнаружился после 3 циклов FCR, но эрадикация МРБ была достигнута после 6 циклов терапии. В остальных 25 (22%) случаях не удалось

Таблица 5

Сравнение количества опухолевых клеток В-ХЛЛ, выявляемых при промежуточной оценке ремиссии в группах больных, выделенных по критерию достижения молекулярной ремиссии на финальном исследовании

Группа пациентов	МРБ при В-ХЛЛ при промежуточной оценке ответа	
	МРБ при В-ХЛЛ, Me, % от числа лейкоцитов	МРБ при В-ХЛЛ, диапазон, % от числа лейкоцитов
Финальная оценка МРБ "+"	1,2	0,13–9,98
МРБ "-"	0,01	< 0,01–3,13

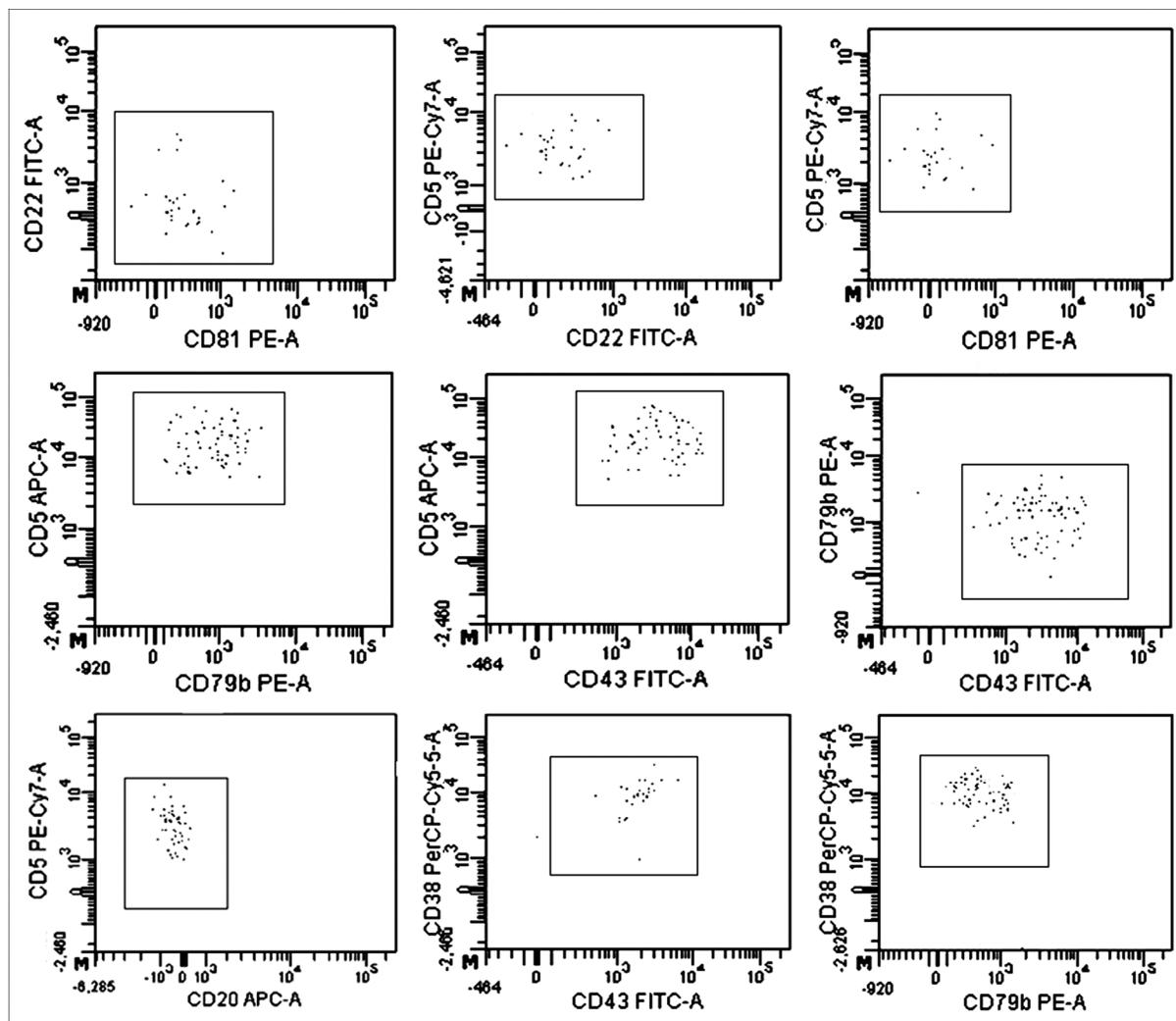


Рис. 3. Стратегия последовательного гейтирования МРБ при В-ХЛЛ по данным анализа экспрессии информативных маркеров в регионе CD19-позитивных событий. Популяция В-ХЛЛ ограничена прямоугольным гейтом. Прибор FACS Canto II.

достичь молекулярной ремиссии даже после завершения лечения в стандартном объеме 6 циклов FCR (табл. 4).

Для анализа полученных результатов выделено 2 группы пациентов по критерию достижения МРБ-негативной ремиссии после завершения лечения: МРБ⁻ (n = 87) и МРБ⁺ (n = 25). Наблюдались достоверные (p=0,001) различия между указанными группами больных в количестве опухолевых клеток В-ХЛЛ, детектируемых при промежуточной оценке ответа. В группе МРБ⁻ уже после 3 курсов FCR уровень выявляемого опухолевого клона составлял от <0,01 до 3,13% (Me 0,01%), в группе МРБ⁺ в ходе промежуточной оценки обнаружено от 0,13 до 9,98% (Me 1,2%) остаточного опухолевого клона (табл. 5). Для определения количества клеток В-ХЛЛ после 3 циклов в качестве фактора прогнозирования МРБ-статуса окончательного ответа на терапию проведен анализ методом характеристических кривых (рис. 4). Установлен критерий – 0,12% опухолевых клеток от числа лейкоцитов – с наибольшей диагностической значимостью (диагностическая чувствительность – 100%, диагностическая специфичность – 72%, диагностическая эффективность – 86%). Во всех 67 случаях выявления при промежуточной оценке менее 0,12% клеток В-ХЛЛ была достигнута МРБ-негативная ремиссия. При этом среди 45 больных с сохранением после 3 циклов терапии более 0,12% клеток В-ХЛЛ только у 20 (44%) пациентов при продолжении лечения была достигнута эрадикация МРБ.

Случаи выявления при промежуточной оценке терапии менее 0,12% клеток В-ХЛЛ характеризовались достоверно

(p < 0,0001) более высокой вероятностью достижения МРБ-негативного статуса после завершения лечения по сравнению с вариантами обнаружения более 0,12% опухолевых клеток. Таким образом, уже после 3 циклов терапии с включением ритуксимаба, ориентируясь на пороговую величину 0,12%

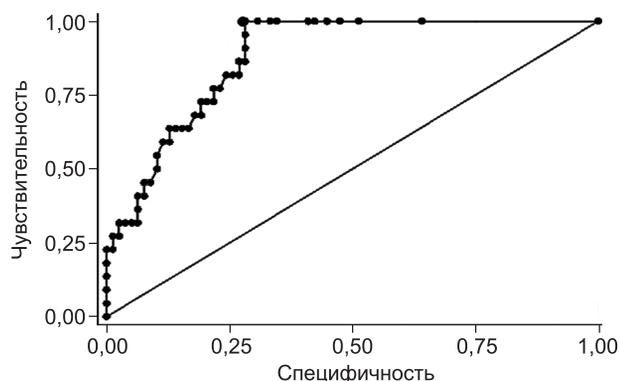


Рис. 4. ROC – кривая для оценки МРБ при промежуточной оценке терапии. Оптимальная точка разделения пациентов с финальными статусами МРБ⁻ и МРБ⁺ показана заштрихованным кружком.

клеток В-ХЛЛ, можно предсказать возможность эрадикации опухолевого клона после завершения терапии.

Заключение. Исследование продемонстрировало возможность использования величины остаточного клона В-ХЛЛ, оцениваемого методом проточной цитофлуориметрии после первых циклов терапии, для стратификации пациентов по группам риска и прогнозирования эффективности дальнейшего лечения. Наблюдаемое после 3 циклов FCR снижение количества циркулирующих опухолевых В-клеток до уровня < 0,12% от числа лейкоцитов сопровождалось достижением МРБ-негативной ремиссии по завершении 6 стандартных циклов терапии. При выявлении в ходе промежуточной оценки более 0,12% клеток В-ХЛЛ от числа лейкоцитов продолжение лечения приводило к эрадикации остаточного клона лишь в 44% случаев. Таким образом, ранняя оценка кинетики элиминации клона В-ХЛЛ может быть использована в качестве фактора прогноза вероятности молекулярной ремиссии, а следовательно, установления оптимального объема терапии в каждом конкретном случае.

Необходимо помнить, что даже достижение молекулярной ремиссии в соответствии с современными критериями оценки МРБ не исключает вероятности сохранения лейкоэмических клеток в организме на уровне, не детектируемом самими высокочувствительными на сегодняшний день методами [17]. Интерес представляют дальнейшие исследования, в частности продолжительный мониторинг качества молекулярной ремиссии при В-ХЛЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин Е.А., Судариков А.Б. Хронический лимфолейкоз высокого риска: история, определение, диагностика и лечение. *Клиническая онкогематология*. 2013; 1: 59–67.
2. Никитин Е.А., Халлек М., Байков В.В. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического лимфолейкоза (версия 2012 г.). *Клиническая онкогематология*. 2013; 1: 99–105.
3. Montserrat E. Treatment of chronic lymphocytic leukemia: achieving minimal residual disease – negative status as a goal. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(13): 2884-5.
4. Moreno C., Villamor N., Colomer D. Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107(11): 4563-9.
5. Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 459-65.
6. Hallek M., Cheson B., 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(12): 5446-56.
7. Sayala H., Rawstron A., Hillmen. Minimal residual disease assessment in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2007; 10: 499–512.
8. Uhrmacher S., Erdfelder F., Kreuzer K. Flow cytometry and polymerase chain reaction-based analyses of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Adv. Hematol.* 2010; 2010: 1–11.
9. Moreno C., Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 22 (4): 211-9.
10. Moreton P., Kennedy B., Lucas G. et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukaemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 2971-9.
11. DelPoeta G., DelPrincipe M.I., Buccisano F. et al. Consolidation and maintenance immunotherapy with rituximab improve clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2008; 112(1): 119-28.
12. Montillo M., Tedeschi A., Miqueleiz S. et al. Alemtuzumab as consolidation after a response to fludarabine is effective in purging residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(15): 2337-42.
13. O'Brien S.M., Kantarjian H.M., Thomas D.A. et al. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2003; 98(12): 2657-63.
14. Ghia P. A look into the future: can minimal residual disease guide therapy and predict prognosis in chronic lymphocytic leukemia? *Hematology*. 2012; 2012: 97–104.
15. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Oncol.* 2010; 21(7): 154-64.
16. Rawstron A.C., Villamor N., Ritgen M. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007; 21(5): 1–9.
17. Marie C., Bene S. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European Leukaemia Net. *Haematologica*. 2009; 94(8): 1135-50.

REFERENCES

1. Nikinin E.A., Sudarikov A.B. Chronic lymphocytic leukemia of high risk: history, definition, diagnostic and treatment. *Klinicheskaya onkohematologiya*. 2013; 1: 59–67. (in Russian)
2. Nikitin E.A., Hallek M., Baikov V.V. et al. Russian clinical guidelines for the diagnostic and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkohematologiya*. 2013; 1: 99–105. (in Russian)
3. Montserrat E. Treatment of chronic lymphocytic leukemia: achieving minimal residual disease – negative status as a goal. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(13): 2884-5.
4. Moreno C., Villamor N., Colomer D. Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107(11): 4563-9.
5. Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 459-65.
6. Hallek M., Cheson B., 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(12): 5446-56.
7. Sayala H., Rawstron A., Hillmen. Minimal residual disease assessment in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2007; 10: 499–512.
8. Uhrmacher S., Erdfelder F., Kreuzer K. Flow cytometry and polymerase chain reaction-based analyses of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Adv. Hematol.* 2010; 2010: 1–11.
9. Moreno C., Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 22 (4): 211-9.
10. Moreton P., Kennedy B., Lucas G. et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukaemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 2971-9.
11. DelPoeta G., DelPrincipe M.I., Buccisano F. et al. Consolidation and maintenance immunotherapy with rituximab improve clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2008; 112(1): 119-28.
12. Montillo M., Tedeschi A., Miqueleiz S. et al. Alemtuzumab as consolidation after a response to fludarabine is effective in purging residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(15): 2337-42.
13. O'Brien S.M., Kantarjian H.M., Thomas D.A. et al. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2003; 98(12): 2657-63.
14. Ghia P. A look into the future: can minimal residual disease guide therapy and predict prognosis in chronic lymphocytic leukemia? *Hematology*. 2012; 2012: 97–104.
15. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Oncol.* 2010; 21(7): 154-64.
16. Rawstron A.C., Villamor N., Ritgen M. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007; 21(5): 1–9.
17. Marie C., Bene S. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European Leukaemia Net. *Haematologica*. 2009; 94(8): 1135-50.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14