

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-73-85

Цитометрическое и цитоморфологическое определение достижения ремиссии у детей с острым миелоидным лейкозом

Е.В. Михайлова, А.Н. Дагестани, С.А. Кашпор, С.А. Плясунова, Т.В. Конюхова, М.Э. Дубровина, К.А. Воронин, И.И. Калинина, Е.А. Зеркаленкова, Ю.В. Ольшанская, А.В. Попа, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова, А.М. Попов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Достижение клинко-гематологической ремиссии по окончании индукционной терапии является важным показателем ответа на проводимое лечение у детей с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Кроме «классической» цитоморфологической оценки количества бластов в костном мозге (КМ) в последние годы в рутинную практику широко внедряется цитометрическое определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Целью исследования являлось сравнение результатов определения МОБ методом многоцветной проточной цитометрии с результатами цитоморфологии (ЦМ) при оценке достижения ремиссии по окончании индукционной терапии у детей с ОМЛ. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В работе проанализированы образцы КМ 402 детей с ОМЛ, получавших терапию по протоколу AML-MRD-2018 и проходивших мониторинговое иммунофенотипирование (ИФТ) и исследование КМ методом ЦМ. Подсчет миелограммы производился на 500 ядросодержащих клеток в препарате КМ. Определение МОБ производилось методом 10-цветной проточной цитометрии. Пороговым уровнем для стандартизованного определения МОБ-позитивности была установлена величина в 0,1%. В качестве критерия достижения ремиссии был установлен порог в 5% бластных клеток. Общая сходимость результатов при оценке достижения ремиссии составила 83,3%: у 335 из 402 пациентов ремиссия или ее отсутствие были определены одновременно обоими методами. Среди расходящихся 67 образцов половину составили пациенты с вариантами ОМЛ с выраженным моноцитарным компонентом: 14 (20,9%) с ОМЛ М4, 20 (29,9%) с ОМЛ М5. Среди ФАБ-вариантов ОМЛ наилучшая сходимость результатов исследования КМ методами ИФТ и ЦМ наблюдалась для ОМЛ М1 (91,7%), наихудшая – для ОМЛ М7 (72,7%). Недостижение ремиссии по данным ЦМ никак не влияло на прогноз заболевания у пациентов, достигших ремиссии по данным ИФТ. Но и для ИФТ гораздо более существенно на прогноз заболевания влияло достижение МОБ-негативности (< 0,1%) даже уже на этом, относительно раннем этапе терапии. Более того, рецидивы у МОБ-позитивных пациентов случались значительно чаще, чем у детей, не достигших ремиссии по окончании индукционной терапии (МОБ ≥ 5%), причем эти различия были наиболее существенными в группе промежуточного риска. Причиной такой разницы в прогнозе заболевания является то, что не вышедшие в ремиссию пациенты получали более интенсивную химиотерапию (блок FLAI вместо HAM), а дети из группы промежуточного риска еще и рестратифицировались в группу высокого риска, что предусматривало проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Исследование КМ методами ИФТ и ЦМ на момент окончания индукции у детей с ОМЛ обладает достаточно высоким уровнем сопоставимости результатов оценки достижения ремиссии (83,3%). Определение ремиссии методом ЦМ слабо влияет на прогноз заболевания, однако и для ИФТ относительно стандартный порог в 5% опухолевых клеток представляется недостаточным. Можно предположить, что изменение терапии необходимо и пациентам с сохранением МОБ ≥ 0,1% на этом этапе лечения.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, ремиссия, цитоморфология, проточная цитометрия, минимальная остаточная болезнь

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 21.02.2024
Принята к печати 12.03.2024



EDN: HDMRAJ

Контактная информация:

Михайлова Екатерина Валерьевна,
врач клинической лабораторной
диагностики лаборатории
иммунофенотипирования гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: katmikhailova1805@gmail.com

Михайлова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (1): 73–85. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-73-85

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 21.02.2024

Accepted 12.03.2024

Flow cytometric and cytomorphological definition of remission achievement in children with acute myeloid leukemia

E.V. Mikhailova, A.N. Dagestani, S.A. Kashpor, S.A. Plyasunova, T.V. Konyukhova, M.E. Dubrovina, K.A. Voronin, I.I. Kalinina, E.A. Zerkalenkova, Yu.V. Olshanskaya, A.V. Popa, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, A.M. Popov

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Correspondence:

Ekaterina V. Mikhailova,
MD in Clinical Laboratory Medicine, Leukemia
Immunophenotyping Laboratory of the Dmitry
Rogachev National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: katmikhailova1805@gmail.com

The achievement of clinical and hematological remission at the end of induction therapy is one of the key treatment response parameters in pediatric acute myeloid leukemia (AML). Besides conventional cytomorphological evaluation of bone marrow (BM) blast count, minimal residual disease (MRD) measurement has been widely applied in routine clinical practice in recent years. The aim of the study was to compare the results of flow cytometric MRD evaluation with the results of cytomorphological BM investigation when assessing the achievement of remission at the end of induction in children with AML. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. We analyzed BM samples obtained from 402 children with AML, who had been treated according to the AML-MRD-2018 protocol and undergone simultaneous cytometric and cytomorphological BM investigation at the end of induction. A myelogram count was performed on 500 nucleated cells per BM smear. MRD was measured by 10-color flow cytometry with the 0.1% cut-off for reliable MRD-positivity. The threshold of 5% blasts was used as the criterion of complete remission (CR). Overall concordance of the two methods was 83.3% for the CR status confirmation: in 335 out of 402 patients, the presence or absence of CR was stated using both techniques. Half of the 67 discordant samples were obtained from patients with a significant monocytic component of the leukemic population: 14 (20.9%) with AML M4 and 20 (29.9%) with AML M5. Among all FAB subtypes, the highest concordance rate was noted in patients with M1 variant (91.7%), while the worst comparability – in children with megakarioblastic leukemia (M7 type, 72.7%). Failure to achieve CR by cytomorphology did not influence the outcome of the patients who achieved CR as confirmed by immunophenotyping. At the same time, for flow cytometric BM investigation, achieving MRD negativity ($< 0.1\%$) was the most significant favorable outcome predictor even at this rather early stage. Moreover, relapse incidence in children who were in CR but MRD positive ($\geq 0.1\%$) was higher than in patients who did not achieve CR at the end of induction according to flow cytometry (MRD $\geq 5\%$), especially in the intermediate-risk group. This difference can be explained by more intensive chemotherapy (FLAI instead of HAM cycle) given to patients who did not achieve CR at the end of induction, and patients in the intermediate-risk group were additionally re-stratified to a high-risk group with subsequent hematopoietic stem cell transplantation. Flow cytometric and cytomorphological BM examination for the CR status confirmation at the end of induction in children with AML demonstrated a relatively high concordance rate (83.3%). CR achievement by cytomorphology does not influence final outcome, although for the flow cytometry conventional threshold of 5% also seems inadequate. We can assume that the modification of therapy is also required for patients with MRD $\geq 0.1\%$ at this stage of treatment.

Key words: acute myeloid leukemia, remission, cytomorphology, flow cytometry, minimal residual disease

Mikhailova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (1): 73–85.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-73-85

Терапия острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) была и остается трудной задачей в мировой онкогематологической практике [1]. За последние 2 десятилетия результаты лечения ОМЛ у детей значимо улучшились, однако произошло это не в связи с появлением новых терапевтических подходов, а благодаря успехам сопроводительной терапии, приведшим к снижению риска токсической, главным образом инфекционной, летальности [1]. Полная ремиссия (ПР) в зависимости от интенсивности индукционной химиотерапии и точки оценки достижения ремиссии в настоящее время достигается у 80–90% пациентов [1, 2], тогда как показатели бессобытийной (БСВ) и общей (ОВ) выживаемости составляют около 50% и 70% соответственно из-за сохраняющейся высокой частоты развития рецидивов [1, 3, 4]. В определение ПР входит исчезновение всех клинических субстратов лейкемии (органомегалия, лимфаденопатия, очаги экстрамедуллярного поражения и т.д.), снижение содержания бластных клеток менее 5% в клеточном костном мозге (КМ), обнаруживаемых при исследовании аспирата, и восстановление [суб]нормальных количественных показателей эритро-, миело- и мегакариопоэза: гемоглобина не менее 90–100 г/л, нейтрофилов не менее $1,0 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов не менее $100 \times 10^9/\text{л}$, [3, 5]. При этом, будучи обязательным условием достижения дальнейшего выздоровления, статус морфологической ПР не является достаточным, поскольку вероятность реци-

дива у пациентов, достигших ПР, составляет 20–90% в зависимости от цито- и молекулярно-генетического варианта ОМЛ и выполненной терапии. Более того, корреляция между достижением ПР и персистенцией субмикроскопического (т. е. ниже морфологического «порога видимости») лейкоэмического поражения (минимальная остаточная болезнь, МОБ), выявляемого молекулярно-генетическими методами или с помощью проточной цитометрии, не является сильной, и именно определение МОБ на сегодняшний день – наиболее чувствительный и специфичный инструмент для прогнозирования риска рецидива ОМЛ [2, 6, 7].

Персистенция МОБ после одного или нескольких курсов полихимиотерапии при лечении ОМЛ, по данным множества клинических исследований, является важным прогностическим фактором в отношении БСВ и, соответственно, ОВ [2, 8, 9]. В 2018 г. в России инициировано проспективное мультицентровое исследование AML-MRD-2018 (NCT03846362), одной из задач которого было определение клинического значения показателей МОБ, определяемой методом многоцветной проточной цитометрии на всех этапах лечения, в том числе и после проведения индукционной терапии, а также анализ сходимости результатов определения МОБ и исследования методом цитоморфологии (ЦМ), которое является, хотя и с существенными оговорками, «золотым стандартом» оценки статуса ремиссии [1]. Констатация морфологической ремиссии нередко затруднена

из-за морфологического сходства нормальных ранних гемопоэтических предшественников и лейкоэмических бластов [10], при этом выявление МОБ, основанное на анализе антигенного «портрета» лейкоэмических клеток, обладает большей чувствительностью и специфичностью и позволяет распознавать опухолевые клетки, присутствующие на уровнях значительно ниже тех, которые обнаруживаются морфологически [6, 7]. В связи с этим клиническая значимость морфологической оценки ответа на терапию в эпоху МОБ должна быть подвергнута критическому анализу [5].

Таким образом, сопоставление результатов исследования методами цитометрии и ЦМ по отношению к оценке достижения ремиссии по окончании индукционной терапии у детей с ОМЛ является важной и актуальной задачей ввиду крайней клинической важности оценки раннего ответа на терапию, который помогает в прогнозе риска развития рецидива и применяется для финальной стратификации пациентов и определения дальнейшей тактики лечения.

Цель данного исследования – сравнение результатов определения МОБ методом многоцветной проточной цитометрии с результатами ЦМ при оценке достижения ремиссии по окончании индукционной терапии у детей с ОМЛ. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования были проанализированы образцы КМ 402 детей с ОМЛ (медиана возраста 7,5 лет, разброс 15 дней – 18 лет), проходивших диагностическое и мониторинговое иммунофенотипирование (ИФТ) параллельно с исследованием методом ЦМ в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России с апреля 2018 г. по сентябрь 2023 г. в рамках протокола AML-MRD-2018. Все пациенты на момент исследования получали или завершили терапию по протоколу.

Инициальные характеристики пациентов представлены в таблице 1.

Исследование методами ЦМ и ИФТ выполнялось для установления диагноза до начала лечения (день 0). Для констатации достижения или недостижения ремиссии в период с 21-го по 35-й день после окончания индукционной химиотерапии цитарабином, митоксантроном и этопозидом (АМЕ) при восстановлении гранулоцитов $> 1 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов $> 100 \times 10^9/\text{л}$ производилась пункция КМ для дальнейшего определения МОБ и исследования методом ЦМ.

Для исследования методом ЦМ мазки КМ окрашивались по методу Романовского–Гимзы. Подсчет

миелограммы производился на 500 ядросодержащих клеток в препарате КМ. В качестве критерия достижения ремиссии был установлен классический порог в 5% бластных клеток.

Определение МОБ производилось методом многоцветной проточной цитометрии по технологии группы FlowCluster [11]. Для мониторингового ИФТ по определению МОБ окраска образцов КМ производилась с помощью сухих реагентов Duraclone (Beckman Coulter, США). Пробы содержали антитела к поверхностным антигенам клеток, меченные флуорохромами (FITC, PE, ECD, PC5.5, PC7, APC, APC-A700,

Таблица 1

Краткая характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1

Brief characteristics of the patients included in the study

Параметр Parameter	Значение Value
Общее число пациентов, <i>n</i> Total number of patients, <i>n</i>	402
Пол: мужской/женский, <i>n</i> (%) Sex: male/female, <i>n</i> (%)	217/185 (54/46)
Возраст, медиана (разброс), годы Median age (range), years	7,5 (0,04–17,89)
Вариант ОМЛ по ФАБ-классификации, <i>n</i> (%): AML type according to the FAB classification, <i>n</i> (%):	
M0	2 (0,5)
M1	36 (9,0)
M2	94 (23,4)
M4	81 (20,1)
M5	101 (25,1)
M6	8 (2,0)
M7	33 (8,2)
Mx	35 (8,7)
нет данных no data	12 (3,0)
Хромосомные aberrации, <i>n</i> (%): Chromosomal aberrations <i>n</i> (%):	322/385 (83,6)
inv16/t(16;16) – CBFb::MYH11	42 (10,4)
t(8;21)(q22;q22) – RUNX1::RUNX1T1	69 (17,1)
перестройка гена KMT2A KMT2A gene rearrangement	100 (24,9)
перестройка гена NUP98 NUP98 gene rearrangement	26 (6,5)
inv(16)(p13q24) – CBFA2T3::GLIS2	9 (2,2)
перестройка гена RUNX1 RUNX1 gene rearrangement	2 (0,5)
t(10;11)(p11-15;q21) – PICALM::MLLT10	6 (1,5)
перестройка локуса HOXA rearrangement of the HOXA locus	4 (1,0)
перестройка гена ETV6 ETV6 gene rearrangement	3 (0,7)
t(6;9)(p23;q34) – DEK::CAN	5 (1,2)
t(1;22)(p13;q13) – OTT::MAL	1 (0,2)
t(16;21)(p11;q22) – FUS::ERG	1 (0,2)
t(8;16)(p11;p13) – KAT6A::CREBBP	1 (0,2)
перестройка гена EVI1 EVI1 gene rearrangement	2 (0,5)
моносомия 7/делеция 7q monosomy 7/7q deletion	5 (1,2)
другое other	34 (8,4)
Комплексные перестройки, <i>n</i> (%) Complex rearrangements, <i>n</i> (%)	12 (3,0)
Нет известных цитогенетических аномалий, <i>n</i> (%) No known cytogenetic abnormalities, <i>n</i> (%)	63 (15,7)
Нет данных, <i>n</i> (%) No data, <i>n</i> (%)	17 (4,2)
Группа риска по протоколу ОМЛ-MRD-2018, <i>n</i> (%): Risk group according to the AML-MRD-2018 protocol, <i>n</i> (%):	
стандартный риск standard risk	42 (10,4)
промежуточный риск intermediate risk	176 (43,8)
высокий риск high risk	184 (45,8)

Note. AML – acute myeloid leukemia.

APC-A750, PB, KrO). Панель для анализа состояла из 2 комбинаций антител: для определения миелоидных клеток на ранних стадиях дифференцировки и для выявления клеток с изначально диагностированным лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом [11, 12]:

- комбинация 1: CD38-FITC, CD371-PE, CD34-ECD, CD117-PC5.5, CD33-PC7, CD99-APC, CD123-APC-A700, CD45RA-APC-A750, HLA-DR-PB, CD45-KrO;
- комбинация 2: CD15-FITC, CD34-ECD, CD117-PC5.5, CD33-PC7, CD14-APC-A700, CD11b-APC-A750, HLA-DR-PB, CD45-KrO; каналы PE и APC служат для добавления дополнительных маркеров опухолевых клеток, не входящих в панель [11].

Образец считался МОБ-позитивным при наличии кластера не менее чем из 50 опухолевых клеток, соответствующих минимум 2 из 3 критериев: отличие от нормальных клеток-предшественников миелопоэза; наличие лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа, обнаруженного при диагностике; наличие незрелого иммунофенотипа [11]. Количество опухолевых клеток выражалось в процентном соотношении их числа к числу ядродержащих клеток. В качестве критерия достижения ремиссии был установлен порог в 5% опухолевых клеток. Пороговым уровнем для «уверенного» стандартизованного определения МОБ-позитивности была установлена относительно стандартная величина в 0,1%.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение XLSTAT v2020.4.1. Кривые БСВ, ОВ и выживаемости без признаков болезни (ВББ) были построены по методу Каплана-Майера [13]. БСВ определялась как время от диагностики ОМЛ до первого события (рецидив, смерть вследствие любой причины как первое событие, вторая опухоль) либо последнего контакта с пациентом, если неблагоприятное событие не было зарегистрировано. Для ОВ неблагоприятным событием считалась смерть от любой причины. ВББ рассчитывалась только для пациентов, достигших клинко-гематологической ремиссии, как время от даты достижения ремиссии до неблагоприятного события (аналогично БСВ). Стандартную ошибку рассчитывали по формуле Гринвуда [14]. Для сравнения кривых использовали непараметрический критерий log-rank [15]. Кумулятивную частоту развития рецидива (КЧР) определяли путем оценки конкурирующих рисков согласно методике J. Kalbfleisch, R. Prentice [16], для сравнения кривых использовали критерий Грея [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные инициального исследования методом ЦМ были доступны у 390 из 402 пациентов, включенных в

исследование. Согласно критериям ФАБ-классификации [18, 19] у 2 (0,5%) пациентов был диагностирован М0-вариант, у 36 (9,2%) – М1, у 94 (24,1%) – М2, у 81 (20,8%) – М4, у 101 (25,9%) – М5, у 8 (2,1%) – М6, у 33 (8,4%) – М7. У 35 (9,0%) пациентов точное определение морфологического варианта ОМЛ оказалось невозможным (таблица 1).

По данным цитогенетического и молекулярно-генетического исследований наиболее частыми соматическими хромосомными aberrациями в клетках ОМЛ являлись перестройки гена *KMT2A* ($n = 100$, 24,9%), транслокация $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1$ ($n = 69$, 17,1%), $inv16/t(16;16)/CBFB::MYH11$ ($n = 42$, 10,4%) и перестройка гена *NUP98* ($n = 26$, 6,5%). Весь спектр генетических перестроек у пациентов, включенных в исследование, отображен в таблице 1.

При сопоставлении результатов определения МОБ методом ИФТ и данных миелограммы при исследовании КМ после проведения индукционной терапии во всей исследуемой когорте пациентов общая сходимость результатов на предмет достижения ремиссии составила 83,3%: у 335 из 402 пациентов ремиссия или ее отсутствие были определены одновременно обоими методами (таблица 2, рисунок 1).

В 67 (16,7%) случаях достижение ремиссии было констатировано лишь по данным одного из двух методов исследования: 56 (14%) пациентов достигли ремиссии только по данным ИФТ (опухолевых клеток при определении МОБ < 5%, а по данным миелограммы бластоз КМ \geq 5%), тогда как 11 (2,7%) – только по данным ЦМ (по данным миелограммы бластоз КМ < 5%, а опухолевых клеток при определении МОБ \geq 5%). Среди всех расходящихся результатов половину от общего числа составили пациенты с вариантами ОМЛ с выраженным моноцитарным компонентом: 14 (20,9%) с ОМЛ М4, 20 (29,9%) с ОМЛ М5. Кроме этого, расхождения продемонстрировали 14 (20,9%) пациентов с ОМЛ М2, 9 (13,4%) – с ОМЛ М7, 3 (4,5%) – с ОМЛ М1, 1 (1,5%) – с ОМЛ М6, а также 6 (8,9%) образцов КМ пациентов с неverified по ФАБ-критериям вариантом ОМЛ (рисунок 2А). Наиболее крупную генетическую группу среди расходящихся образцов составили образцы от пациентов с ОМЛ с перестройкой гена *KMT2A*: 24 (35,8%) из 67 (рисунок 2А). Генетический спектр ОМЛ при дискордантных результатах ИФТ и ЦМ представлен на рисунке 2А.

Распределение по ФАБ-вариантам и генетическим группам ОМЛ у тех пациентов, кто достиг ремиссии только по данным ИФТ ($n = 56$), было подобно таковому для всех пациентов с дискордантными результатами: преобладали ОМЛ М5 ($n = 18$, 32,1%) и ОМЛ М4 ($n = 9$, 16,1%), а также ОМЛ с перестройками гена *KMT2A* ($n = 22$, 39,3%) (рисунок 2Б). У пациентов, достигших ремиссии

Таблица 2

Сопоставление результатов исследования методами ИФТ и ЦМ по отношению к достижению ремиссии в парных образцах КМ внутри ФАБ-вариантов ОМЛ после проведения индукционной терапии

Table 2

Comparison of the results of MFC and CM testing used to assess remission in paired bone marrow samples within FAB-variants of AML after the end of induction therapy

Вариант ОМЛ по ФАБ-классификации AML type according to the FAB classification	Количество образцов Number of samples	ЦМ ≥ 5%, ИФТ ≥ 5% CM ≥ 5%, MFC ≥ 5%	ЦМ < 5%, ИФТ ≥ 5% CM < 5%, MFC ≥ 5%	ЦМ ≥ 5%, ИФТ < 5% CM ≥ 5%, MFC < 5%	ЦМ < 5%, ИФТ < 5% CM < 5%, MFC < 5%	Сходимость, % Comparison, %
ОМЛ М1 AML M1	36	5	0	3	28	91,7
ОМЛ М2 AML M2	94	9	2	12	71	85,1
ОМЛ М4 AML M4	81	6	5	9	61	82,7
ОМЛ М5 AML M5	101	8	2	18	73	80,2
ОМЛ М6 AML M6	8	3	0	1	4	87,5
ОМЛ М7 AML M7	33	5	1	8	19	72,7
Все образцы All samples	402	48	11	56	287	83,3

Рисунок 1

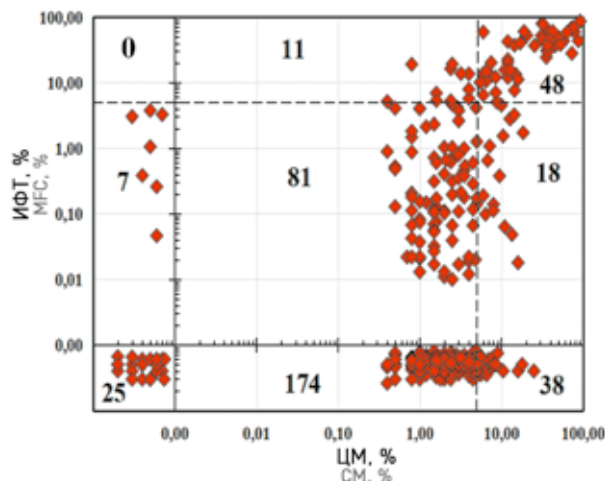
Сопоставление результатов определения МОБ методом ИФТ и данных ЦМ после окончания индукционной терапии по отношению к достижению ремиссии у пациентов с ОМЛ ($n = 402$)

Пунктирными линиями обозначен порог достижения ремиссии (5% опухолевых клеток для исследования методом ИФТ, 5% бластных клеток для исследования методом ЦМ)

Figure 1

Comparison of minimal residual disease (MRD) levels measured by MFC with the results of CM testing after the end of induction therapy for the assessment of remission in patients with AML ($n = 402$)

The dashed lines indicate the threshold for achieving remission (5% tumor cells for MFC, 5% blast cells for CM)



только по данным миелограммы ($n = 11$), преобладал ОМЛ М4-вариант по ФАБ-классификации ($n = 5$, 45,5%), в то время как явно преобладающей генетической аберрации в данной группе обнаружено не было (рисунок 2В).

Среди ФАБ-вариантов ОМЛ в работе наилучшая сходимость результатов исследования КМ методами ИФТ и ЦМ на предмет достижения ремиссии наблюдалась для ОМЛ М1 (91,7%), наихудшая – для ОМЛ М7 (72,7%); сходимость для ОМЛ М2 составила 85,1%, для ОМЛ М4 – 82,7%, для ОМЛ

М5 – 80,2%, для ОМЛ М6 – 87,5% (таблица 2, рисунок 3).

Так как наиболее крупную генетическую группу как в общей когорте больных, так и среди пациентов с расходящимися результатами составили дети с перестройкой гена *KMT2A*, были сопоставлены результаты ИФТ и ЦМ в данной генетической группе ($n = 100$). Сходимость результатов составила 76%, при этом наибольшую часть расходящихся образцов (22 из 24) составляли достигшие ремиссии по данным ИФТ, но имеющие 5% бластов и более по данным миелограммы (рисунок 4). Примечательно, что подавляющее большинство случаев в данной когорте были классифицированы по критериям ФАБ как ОМЛ с выраженным моноцитарным компонентом: 68 (68%) случаев как ОМЛ М5, 13 (13%) – как ОМЛ М4.

Анализ прогностического значения показателей ответа на терапию проводили у 370 пациентов, диагностированных до 31.06.2023 в целях обеспечения адекватного периода наблюдения. Во всей исследуемой группе ($n = 370$) 4-летняя БСВ составила $44,8 \pm 2,9\%$, ОВ – $72,8 \pm 2,8\%$, а КЧР – $36,3 \pm 3,0\%$. Пациенты с МОБ < 5% имели одинаковую вероятность рецидива вне зависимости от того, достигали они ремиссии по данным ЦМ или нет (рисунок 5А): КЧР у детей с бластозом $\geq 5\%$ ($n = 54$) составила $39,4 \pm 7,6\%$, а у тех, кто достиг ремиссии по данным обоих методов ($n = 257$), – $35,7 \pm 3,5\%$ ($p = 0,720$). Так как в исследовании AML-MRD 2018 недостижение ремиссии по данным проточной цитометрии (МОБ $\geq 5\%$) автоматически переводило таких пациентов в категорию первично-рефрактерных, что предусматривало обязательную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), адекватно оценить прогностическое

Рисунок 2

Распределение по ФАБ-вариантам ОМЛ (1) и генетическим группам (2): А – всех образцов КМ с расходящимися результатами определения МОБ методом ИФТ и данными ЦМ ($n = 67$); Б – расходящихся образцов КМ с МОБ методом ИФТ $< 5\%$ и количеством бластов по данным ЦМ $\geq 5\%$ ($n = 56$); В – расходящихся образцов КМ с методом ИФТ $\geq 5\%$ и количеством бластов по данным ЦМ $< 5\%$ ($n = 11$)

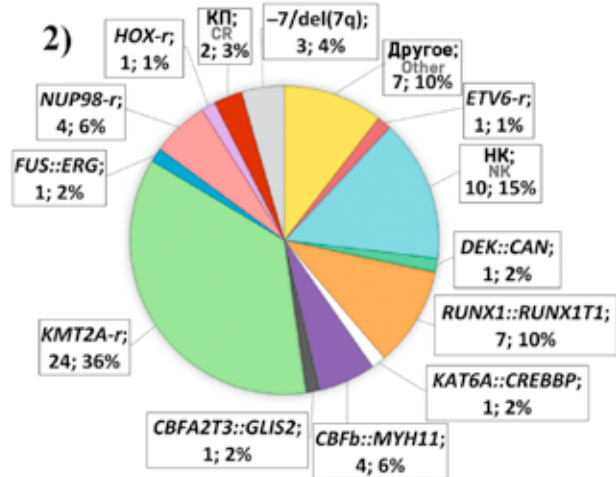
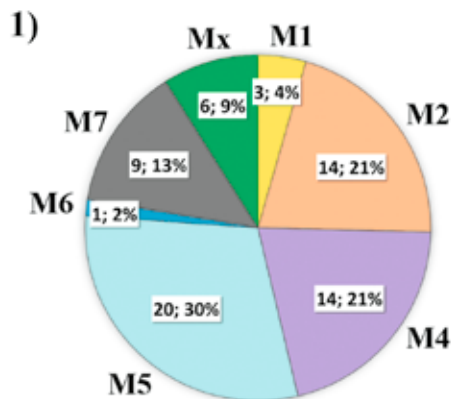
НК – нормальный кариотип; КП – комплексные перестройки

Figure 2

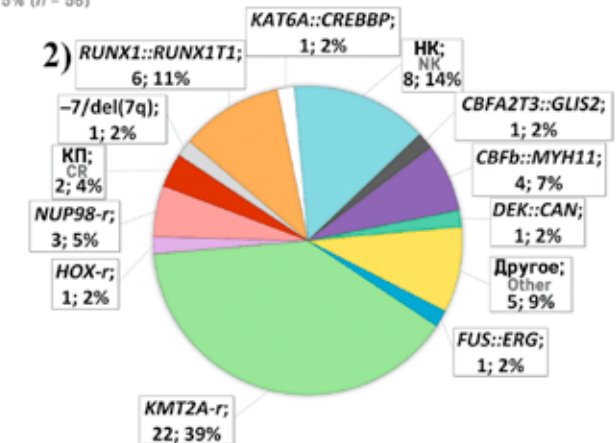
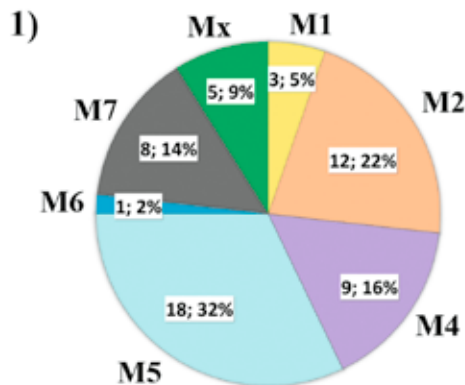
Distribution by the FAB-variants of AML (1) and genetic groups (2): А – all bone marrow samples with discordant results of MRD monitoring by MFC and data from the CM testing ($n = 67$); Б – discordant bone marrow samples with MRD by MFC $< 5\%$ and blast count by CM $\geq 5\%$ ($n = 56$); В – discordant bone marrow samples with MRD by MFC $\geq 5\%$ and blast count by CM $< 5\%$ ($n = 11$)

NK – normal karyotype; CR – complex rearrangements

А

Все расходящиеся образцы ($n = 67$)All discordant samples ($n = 67$)

Б

ИФТ $< 5\%$, ЦМ $\geq 5\%$ ($n = 56$)MFC $< 5\%$, CM $\geq 5\%$ ($n = 56$)

В

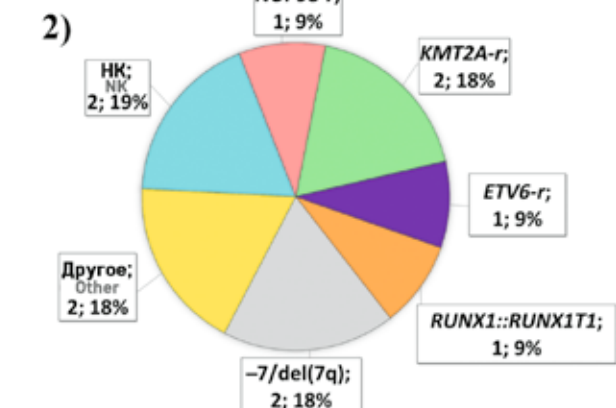
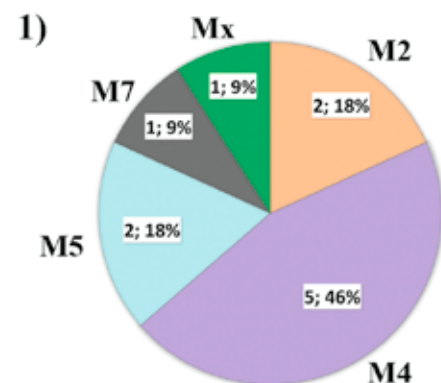
ИФТ $\geq 5\%$, ЦМ $< 5\%$ ($n = 11$)MFC $\geq 5\%$, CM $< 5\%$ ($n = 11$)

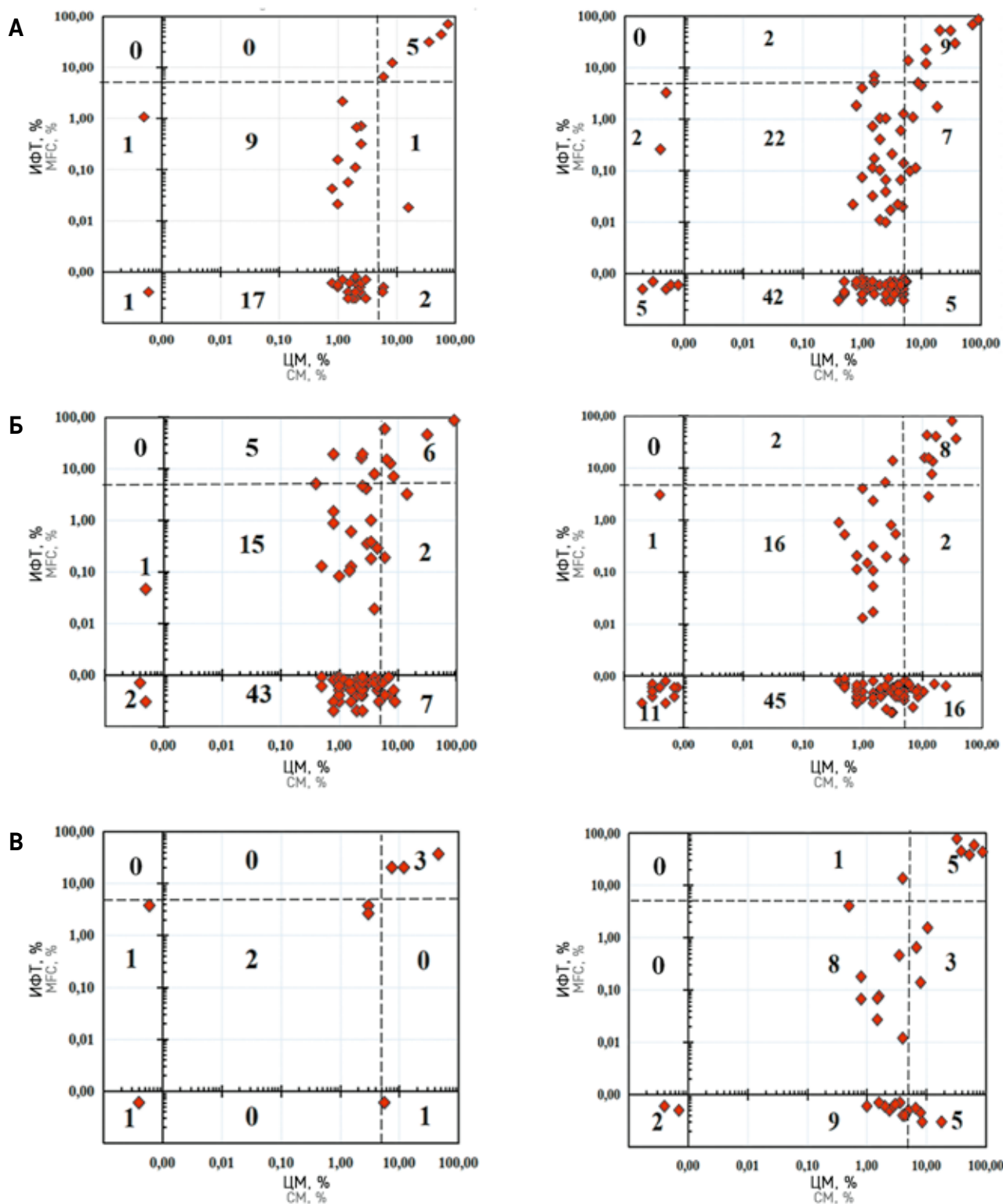
Рисунок 3

Сопоставление результатов определения МОБ методом ИФТ и данных ЦМ после окончания индукционной терапии по отношению к достижению ремиссии у пациентов в зависимости от варианта ОМЛ по ФАБ-классификации А – ОМЛ М1 ($n = 36$); Б – ОМЛ М2 ($n = 94$); В – ОМЛ М4 ($n = 81$); Г – ОМЛ М5 ($n = 101$); Д – ОМЛ М6 ($n = 8$); Е – ОМЛ М7 ($n = 33$). Пунктирными линиями обозначен порог достижения ремиссии (5% опухолевых клеток для ИФТ, 5% бластных клеток для ЦМ)

Figure 3

Comparison of MRD levels measured by MFC with the results of CM testing after the end of induction therapy for the assessment of remission in patients with AML according to the FAB-variant

A – AML M1 ($n = 36$); Б – AML M2 ($n = 94$); В – AML M4 ($n = 81$); Г – AML M5 ($n = 101$); Д – AML M6 ($n = 8$); Е – AML M7 ($n = 33$). The dashed lines indicate the threshold for achieving remission (5% tumor cells for MFC, 5% blast cells for CM)



значение показателей ответа на терапию в данной группе достаточно сложно. Тем не менее и в ней вероятность рецидива не зависела от того, достигнута ли ремиссия по данным ЦМ (рисунки 5Б): КЧР у детей с бластом $\geq 5\%$ ($n = 36$) составила $34,6 \pm 10,3\%$, а у тех, кто достиг ремиссии только по данным ЦМ ($n = 9$), – $35,2 \pm 16,5\%$ ($p = 0,650$).

Оказалось, что гораздо более существенно на прогноз заболевания влияет достижение МОБ-нега-

Рисунок 4

Сопоставление результатов определения МОБ методом ИФТ и данных ЦМ после окончания индукционной терапии по отношению к достижению ремиссии у пациентов с ОМЛ с перестройкой гена *KMT2A* ($n = 100$). Пунктирными линиями обозначен порог достижения ремиссии (5% опухолевых клеток для ИФТ, 5% бластных клеток для ЦМ)

Figure 4

Comparison of MRD levels measured by MFC with the results of CM testing after the end of induction therapy for the assessment of remission in patients with *KMT2A*-rearranged AML ($n = 100$). The dashed lines indicate the threshold for achieving remission (5% tumor cells for MFC, 5% blast cells for CM)

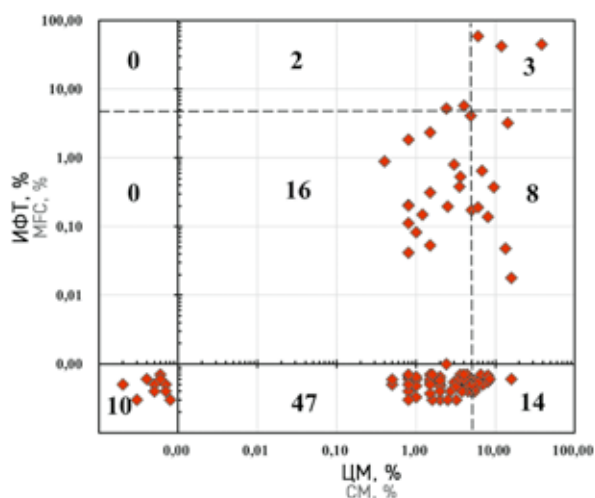
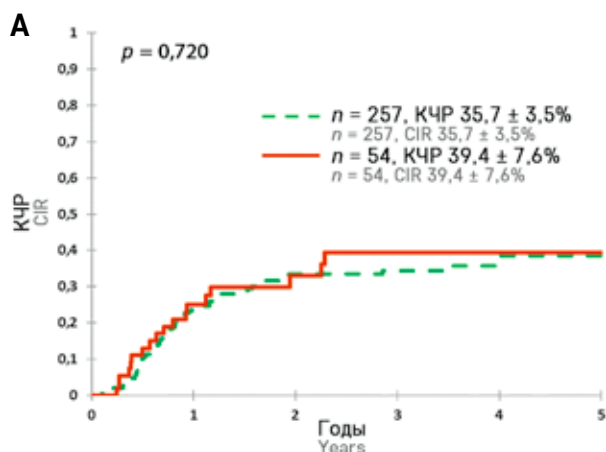


Рисунок 5

КЧР у детей с ОМЛ с бластом $< 5\%$ (зеленая пунктирная линия) и $\geq 5\%$ (красная сплошная линия) на момент окончания индукции по протоколу AML-MRD 2018. А – пациенты с МОБ $< 5\%$; Б – пациенты с МОБ $\geq 5\%$

Figure 5

Cumulative incidence of relapse (CIR) in children with AML with blast counts $< 5\%$ (green dashed line) and $\geq 5\%$ (red solid line) at the end of induction according to the AML-MRD 2018 protocol. А – patients with MRD $< 5\%$; Б – patients with MRD $\geq 5\%$



тивности ($< 0,1\%$) даже уже на этом, относительно раннем этапе терапии. Пациенты с МОБ $< 0,1\%$ ($n = 244$) имели существенно лучшую КЧР ($30,1 \pm 3,4\%$) по сравнению с теми, кто имел МОБ $\geq 0,1\%$ ($n = 67$; КЧР $59,7 \pm 6,8\%$), но достиг формальной МОБ-ремиссии (МОБ $< 5\%$) ($p < 0,001$) (рисунки 6). Данная тенденция сохранялась и при анализе пациентов в группах промежуточного (рисунки 7А) и высокого (рисунки 7Б) риска, а также среди больных, достигших и не достигших ремиссии по данным ЦМ (рисунки 7В, Г). Более того, пациенты с МОБ $\geq 0,1\%$, но $< 5\%$ (т. е. достигшие ремиссии по данным многоцветной проточной цитофлуориметрии) имели худший прогноз ($n = 67$; ВББ $33,9 \pm 6,7\%$, КЧР $59,7 \pm 6,8\%$) по сравнению с теми, кто имел МОБ $\geq 5\%$ ($n = 45$; ВББ $54,7 \pm 9,3\%$, КЧР $35,0 \pm 9,0\%$; $p = 0,094$ и $p = 0,036$ соответственно) (рисунки 8А). Данная тенденция оказалась крайне выраженной в группе промежуточного риска (рисунки 8Б), но менее значимой в группе высокого риска (рисунки 8В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенный анализ показал, что подавляющая часть расходящихся результатов (56 (83,6%) из 67) наблюдалась в образцах, в которых ремиссия была достигнута только по данным ИФТ, но в которых обнаруживалось $> 5\%$ бластов по данным миелограммы. При этом следует отметить, что 38 из 58 этих пациентов являлись МОБ-негативными. Данный факт, вероятно, связан с тем, что КМ пациентов с ОМЛ после проведения индукционной терапии часто имеет обедненный клеточный состав, по причине чего активное постиндукционное восстановление кроветворения может приводить к относи-

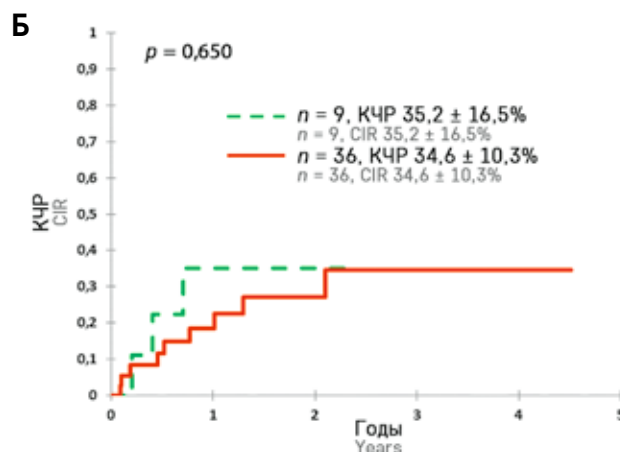
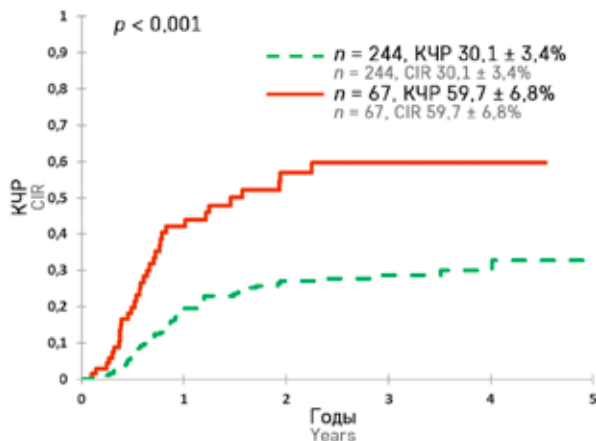


Рисунок 6

КЧР у детей с ОМЛ с МОБ < 5% на момент окончания индукции по протоколу AML-MRD 2018
Зеленой пунктирной линией показана группа МОБ-негативных пациентов (< 0,1%), а красной сплошной линией – группа пациентов с МОБ ≥ 0,1%

Figure 6

CIR in children with AML with MRD < 5% at the end of induction according to the AML-MRD 2018 protocol
The green dashed line indicates the group of MRD negative patients (< 0.1%), and the red solid line indicates the group of patients with MRD ≥ 0.1%

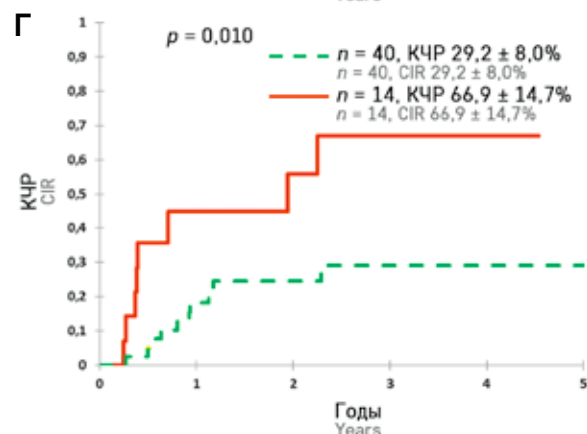
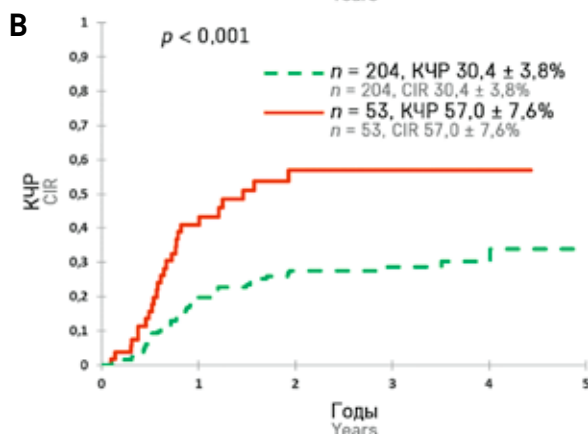
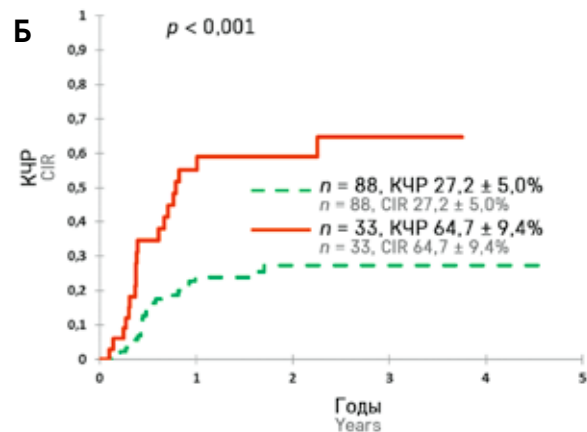
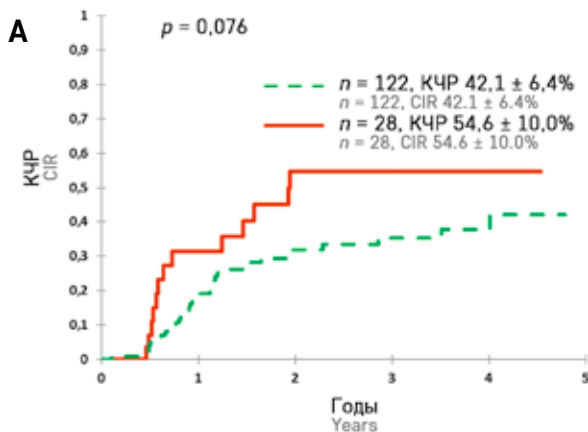
**Рисунок 7**

КЧР у детей с ОМЛ, достигших ремиссии на момент окончания индукции по протоколу AML-MRD 2018 по данным проточной цитометрии
Зеленой пунктирной линией показана группа МОБ-негативных пациентов (< 0,1%), а красной сплошной линией – группа пациентов с МОБ ≥ 0,1%. А – пациенты группы промежуточного риска; Б – пациенты группы высокого риска; В – пациенты с бластом менее 5%; Г – пациенты с бластом более 5% по данным ЦМ

Figure 7

CIR in children with AML, who achieved remission at the end of induction according to the AML-MRD 2018 protocol as confirmed by MFC

The green dashed line indicates the group of MRD negative patients (< 0.1%), the red solid line indicates the group of patients with MRD ≥ 0.1%.
А – intermediate-risk group patients; Б – high-risk group patients; В – patients with blast count < 5%; Г – patients with blast count ≥ 5% by CM



тельному повышению количества бластов за счет появления нормальных гемопоэтических предшественников, которые морфологически далеко не всегда четко отличимы от бластов ОМЛ. Похожая проблема описана в работе M.R. Loken и соавт. [10]. В этом исследовании также были выявлены случаи МОБ-негативных ремиссий «на восстановлении» гемопоэза после индукционной терапии ОМЛ с морфологическими признаками персистенции лейкемии (> 5% бластных клеток) [10]. При этом ОБ у данной когорты пациентов оказалась значительно выше, чем у больных, которые имеют одновременно МОБ-положительный статус и ≥ 5% бластных клеток по данным миелограммы [10], что подтверждает влияние МОБ на исход заболевания вне зависимости от достижения ремиссии по данным исследования методом ЦМ. Авторы также отмечают трудности дифференциации нормальных бластов от опухолевых после индукционной терапии по причине активной регенерации КМ [10]. Похожие данные представлены в исследовании H. Inaba и

соавт., в котором более половины, а именно 90 из 167 образцов, в которых содержание морфологически опознаваемых бластов было $> 5\%$, оказались МОБ-негативны по данным ИФТ [5].

Наличие образцов КМ, где по данным миелограммы наблюдается ремиссия на фоне наличия цитометрической МОБ $\geq 5\%$ (11 (16,4%) из 67)

связано с тем, что отслеживание опухолевых клеток при помощи проточной цитометрии обладает большей чувствительностью и специфичностью в сравнении с исследованием методом ЦМ. В отличие от микроскопического визуального исследования КМ, которое позволяет детектировать прежде всего самый незрелый бластный компонент ОМЛ, проточная цито-

Рисунок 8

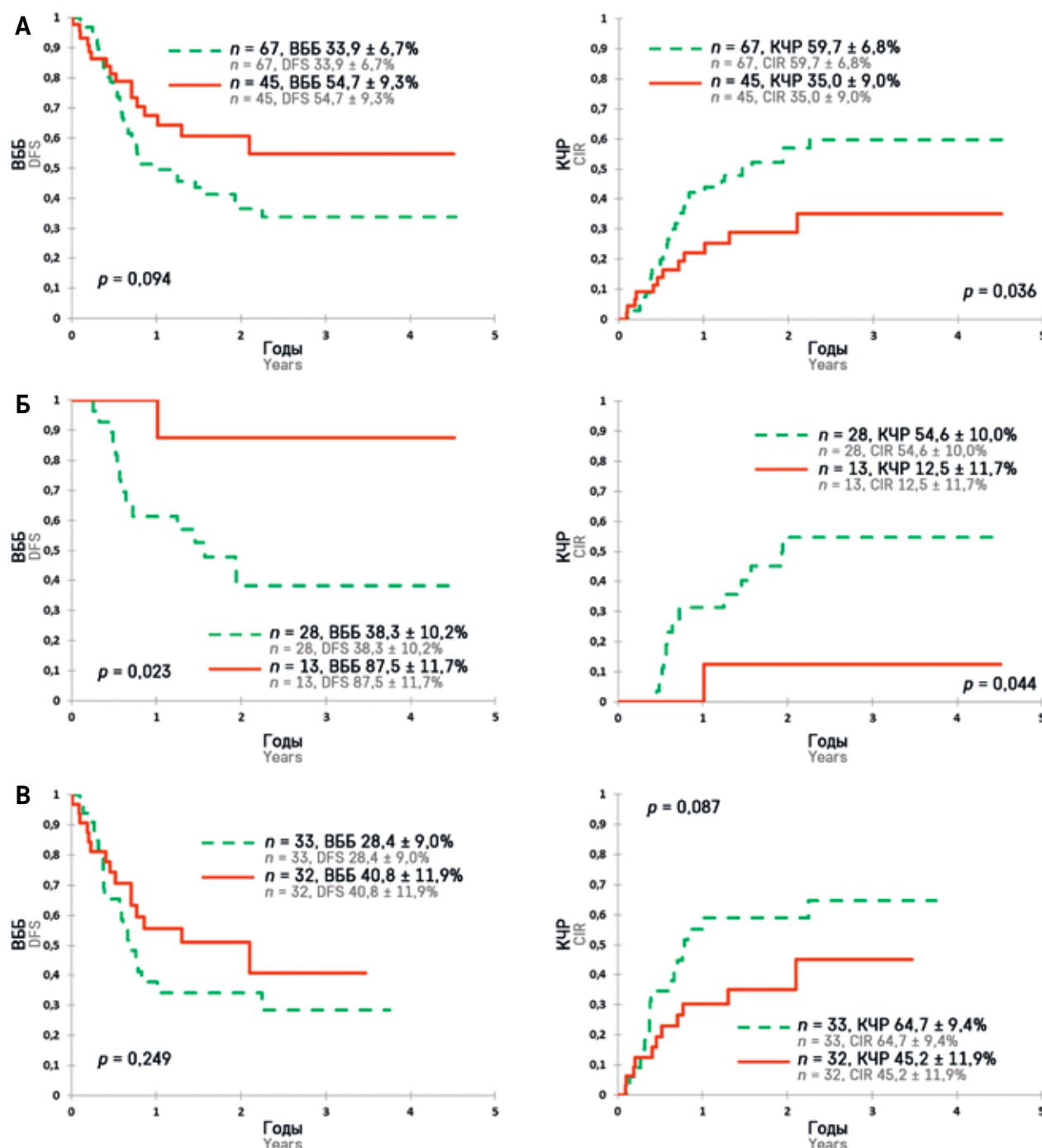
ВББ (верхний ряд) и КЧР (нижний ряд) у детей с ОМЛ, не достигших ремиссии на момент окончания индукции по протоколу AML-MRD 2018 по данным проточной цитометрии (красная сплошная линия), и у пациентов, достигших ремиссии, но с МОБ $\geq 0,1\%$ (зеленая пунктирная линия)

А – все пациенты; Б – пациенты группы промежуточного риска; В – пациенты группы высокого риска

Figure 8

Disease-free survival (DFS, upper row) and CIR (lower row) in children with AML, who did not achieve remission at the end of induction according to the 2018 AML-MRD protocol as measured by MFC (red solid line), and in patients who achieved remission, but with MRD $\geq 0.1\%$ (green dashed line)

A – all patients; Б – intermediate risk group patients; В – high risk group patients



метрия зачастую дает возможность отличить более зрелые клетки опухоли от нормальных созревающих и зрелых миелоидных клеток КМ на основании aberrантного иммунофенотипа [10]. Как и в случае пациентов, не достигших ремиссии по данным миелограммы, наличие постиндукционной МОБ у пациентов, достигших морфологической ремиссии, в опубликованных работах тесно коррелировало с частотой развития рецидива и являлось независимым предиктором исхода [10].

Среди ФАБ-вариантов ОМЛ в настоящем исследовании наибольшую долю расходящихся образцов (30%) составили случаи с М5-вариантом. Этот факт можно во многом объяснить статистически, учитывая, что М5 был самым многочисленным ФАБ-вариантом в данном исследовании (25%), это полностью коррелирует с данными литературы, свидетельствующими о том, что данный вариант является самым распространенным подтипом ОМЛ у детей [20, 21]. При этом следует отметить, что среди исследованных в данной работе пациентов с ОМЛ М5 имелось 20 образцов с расходящимися результатами, среди которых в 18 ремиссия не была достигнута только по данным миелограммы, при этом 16 из них являлись МОБ-негативными. Проблема дискордантности результатов мониторинга КМ при ОМЛ М5 связана с тем, что морфологические и иммунофенотипические характеристики опухолевых клеток при данном ФАБ-варианте могут существенно совпадать с морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками нормального моноцитарного компонента КМ [20, 21]. В повседневной лабораторной практике различение опухолевых клеток ОМЛ М5 с нормальными моноцитарными предшественниками или моноцитами при реактивном моноцитозе затруднено из-за их морфологической схожести [21].

Среди ФАБ-вариантов ОМЛ наилучшая сходимость результатов ИФТ и ЦМ наблюдалась для М1. В случае данного варианта ОМЛ единственным или доминирующим субстратом опухоли являются атипичные бластные клетки, обладающие морфологическими чертами бластов, а также чаще всего имеющие иммунофенотипические черты ранних гемопоэтических клеток [22]. В этом случае при детекции остаточных опухолевых клеток с помощью ИФТ и ЦМ объектом поиска будут одни и те же клетки – бласты с цитоморфологическими и иммунофенотипическими чертами aberrантности (в отличие, например, от М5-варианта, при котором клетки имеют морфологические черты моноцитов и при описании миелограммы не учитываются при подсчете количества бластов).

Самая низкая сходимость результатов ИФТ и ЦМ была выявлена для случаев с ОМЛ М7. Вероятной причиной высокой доли расхождений является значи-

тельно отличающаяся специфичность 2 методов относительно данного варианта ОМЛ. В отличие от иммунофенотипических особенностей (отсутствие CD11a [23], CD371, частое наличие коэкспрессии CD7 и/или CD56 [24, 25]), позволяющих отделить даже малое количество опухолевых клеток от нормальных клеток, для клеток ОМЛ М7 не существует четких морфологических критериев, по причине чего их трудно детектировать в КМ во время терапии [19, 26].

Среди цитогенетических особенностей в группе ОМЛ с расходящимися результатами наиболее крупной оказалась группа с перестройкой гена *KMT2A* (36%). Как и в случае с М5-вариантом ОМЛ, данная генетическая группа была самой многочисленной в исследовании, чем может объясняться такая высокая доля этих образцов среди всех расходящихся. Тем не менее следует отметить сравнительно низкую сопоставимость результатов ИФТ и ЦМ внутри этой генетической группы (76%), обусловленную высокой гетерогенностью иммунофенотипических и морфологических особенностей ОМЛ с данной генетической aberrацией [27].

В нашем исследовании недостижение ремиссии по данным ЦМ никак не влияло на прогноз заболевания у пациентов, достигших ремиссии по данным ИФТ. Эти результаты полностью согласуются с данными других исследовательских групп об ограниченности применения ЦМ как для оценки достижения ремиссии, так и для мониторинга ответа на терапию при ОМЛ в целом [5, 10, 28]. При этом для проточной цитометрии использование аналогичного ЦМ порогового уровня (5%) для оценки статуса ремиссии оказалось недостаточным [28, 29]. Хотя данная точка наблюдения (окончание индукционной терапии) не является наиболее часто используемой для стратификации детей с ОМЛ [28, 29], пациенты с детектируемой на уровне «уверенного» выявления ($\geq 0,1\%$) МОБ имели очень высокую частоту рецидивов, превышающую таковую у МОБ-негативных пациентов ($< 0,1\%$) как в группе промежуточного, так и в группе высокого риска. Более того, рецидивы у МОБ-положительных пациентов случались значимо чаще, чем у детей, имевших высокое количество опухолевых клеток в КМ по окончании индукционной терапии (МОБ $\geq 5\%$), причем эти различия были наиболее существенными в группе промежуточного риска. Очевидно, что причиной такой разницы в прогнозе заболевания является то, что не вышедшие в ремиссию пациенты получали более интенсивную химиотерапию (блок FLAI вместо HAM), а дети из группы промежуточного риска еще и рестратифицировались в группу высокого риска, что предусматривало проведение ТГСК. В итоге для пациентов промежуточного риска вклад сохранения МОБ $\geq 0,1\%$ в неблагоприятный исход оказался решающим, превосходящим возможные негативные

эффекты от более интенсивной терапии и ТГСК (разница в ВББ). Для детей из группы высокого риска прогноз различался менее существенно, прежде всего потому что и быстро отвечающие пациенты (МОБ < 0,1) все равно имели ОМЛ с крайне неблагоприятными биологическими чертами и демонстрировали достаточно высокую частоту рецидивов и смертей в ремиссии. Можно сказать, что 5% порог МОБ для констатации достижения ремиссии, очевидно, не является адекватным, а интенсификация терапии и ТГСК необходима и пациентам с сохранением МОБ на существенно более низком уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что исследование КМ методами ИФТ и ЦМ на момент окончания индукции у детей с ОМЛ обладает относительно высоким уровнем сопоставимости результатов оценки достижения ремиссии (83,3%). Тем не менее существует достаточно большое число пациентов, у которых ремиссия подтверждается только одним из методов (чаще проточной цитометрией), и эти расхождения имеют как биологиче-

ские, так и исключительно лабораторные причины. Определение ремиссии методом ЦМ слабо влияет на прогноз заболевания, однако и для ИФТ относительно стандартный порог в 5% опухолевых клеток представляется недостаточным. Можно предположить, что изменение терапии необходимо и пациентам с сохранением МОБ $\geq 0,1\%$ на этом этапе лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Mikhailova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3450-0498>

Kashpor S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5220-7412>

Konyukhova T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6271-7435>

Dubrovina M.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8228-4876>

Voronin K.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7578-9657>

Kalinina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5626>

Zerkalenskova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9634-5828>

Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>

Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

- Reinhardt D., Antoniou E., Waack K. Pediatric Acute Myeloid Leukemia-Past, Present, and Future. *J Clin Med* 2022; 11 (3): 504.
- Tomizawa D., Tsujimoto S.I. Risk-Stratified Therapy for Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* 2023; 15 (16): 4171.
- Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B., Dworzak M.N., Adachi S., de Bont E., et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2012; 120 (16): 3187–205.
- Obszanski P., Kozłowska A., Wancowiat J., Twardowska J., Lejman M., Zawitkowska J. Molecular-Targeted Therapy of Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Molecules* 2022; 27 (12): 3911.
- Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X., Pounds S.B., Shurtleff S.A., Wang K.Y., et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30 (29): 3625–32.
- Schuurhuis G.J., Heuser M., Freeman S., Bene M.C., Buccisano F., Cloos J., et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 2018; 131 (12): 1275–91.
- Segerink W.H., de Haas V., Kaspers G.J.L. Measurable residual disease in pediatric acute myeloid leukemia: a systematic review. *Expert Rev Anticancer Ther* 2021; 21 (4): 451–9.
- Grimwade D., Vyas P., Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2010; 22 (6): 656–63.
- Conneely S.E., Stevens A.M. Acute Myeloid Leukemia in Children: Emerging Paradigms in Genetics and New Approaches to Therapy. *Curr Oncol Rep* 2021; 23 (2): 16.
- Loken M.R., Alonzo T.A., Pardo L., Gerbing R.B., Raimondi S.C., Hirsch B.A., et al. 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. *Blood* 2012; 120 (8): 1581–8.
- Buldini B., Maurer-Granofszky M., Varotto E., Dworzak M.N. Flow-Cytometric Monitoring of Minimal Residual Disease in Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia: Recent Advances and Future Strategies. *Front Pediatr* 2019; 7: 412.
- van Weelderen R.E., Klein K., Harrison C.J., Jiang Y., Abrahamsson J., Arad-Cohen N., et al. Measurable Residual Disease and Fusion Partner Independently Predict Survival and Relapse Risk in Childhood

- KMT2A-Rearranged Acute Myeloid Leukemia: A Study by the International Berlin–Frankfurt–Munster Study Group. *J Clin Oncol* 2023; 41 (16): 2963–74.
13. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53 (282): 457–81.
 14. Pokhrel A., Dyba T., Hakulinen T. A Greenwood formula for standard error of the age-standardised relative survival ratio. *Eur J Cancer* 2008; 44 (3): 441–7.
 15. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50 (3): 163–70.
 16. Prentice R.L., Kalbfleisch J.D., Peterson A.V. Jr, Flournoy N., Farewell V.T., Breslow N.E. The analysis of failure times in the presence of competing risks. *Biometrics* 1978; 34 (4): 541–54.
 17. Gray R.J. A Class of K-Sample Tests for Comparing the Cumulative Incidence of a Competing Risk. *Ann Stat* 1988; 16 (3): 1141–54.
 18. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33 (4): 451–8.
 19. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103 (3): 460–2.
 20. Matarraz S., Almeida J., Flores-Montero J., Lecrevisse Q., Guerri V., Lopez A., et al. Introduction to the diagnosis and classification of monocytic-lineage leukemias by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2017; 92 (3): 218–27.
 21. Varotto E., Munaretto E., Stefanachi F., Della Torre F., Buldini B. Diagnostic challenges in acute monoblastic/monocytic leukemia in children. *Front Pediatr* 2022; 10: 911093.
 22. Khoury J.D., Solary E., Abla O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J.F., et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36 (7): 1703–19.
 23. Boztug H., Schumich A., Potschger U., Muhlegger N., Kolenova A., Reinhardt K., et al. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84 (6): 370–8.
 24. Zangrando A., Cavagnero F., Scarparo P., Varotto E., Francescato S., Tregnago C., et al. CD56, HLA-DR, and CD45 recognize a subtype of childhood AML harboring CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript. *Cytometry A* 2021; 99 (8): 844–50.
 25. Brouwer N., Matarraz S., Nierkens S., Hofmans M., Novakova M., da Costa E.S., et al. Immunophenotypic Analysis of Acute Megakaryoblastic Leukemia: A Euro-Flow Study. *Cancers (Basel)* 2022; 14 (6): 1583.
 26. Bloomfield C.D., Brunning R.D. FAB M7: acute megakaryoblastic leukemia--beyond morphology. *Ann Intern Med* 1985; 103 (3): 450–2.
 27. Liu L.P., Zhang A.L., Ruan M., Chang L.X., Liu F., Chen X., et al. Prognostic stratification of molecularly and clinically distinct subgroup in children with acute monocytic leukemia. *Cancer Med* 2020; 9 (11): 3647–55.
 28. Buldini B., Rizzati F., Masetti R., Fagioli F., Menna G., Micalizzi C., et al. 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. *Br J Haematol* 2017; 177 (1): 116–26.
 29. Rubnitz J.E., Inaba H., Dahl G., Ribeiro R.C., Bowman W.P., Taub J., et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol* 2010; 11 (6): 543–52.