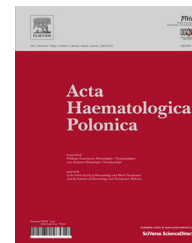




Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Minimalna choroba resztkowa w ostrych białaczkach u dzieci i dorosłych



Minimal residual disease in acute leukemias in children and adults

Ewelina Pukownik¹, Lidia Gil², Jan Styczyński^{1,*}

¹Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Mariusz Wysocki, Bydgoszcz, Polska

²Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Mieczysław Komarnicki, Poznań, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 16.03.2014

Zaakceptowano: 14.07.2014

Dostępne online: 30.07.2014

Słowa kluczowe:

- minimalna choroba resztkowa
- MRD
- ostra białaczka szpikowa
- ostra białaczka limfoblastyczna
- dzieci
- dorośli

Keywords:

- Minimal residual disease
- MRD
- Acute myeloid leukemia
- Acute lymphoblastic leukemia
- Children
- Adults

ABSTRACT

Biological and genetic heterogeneity of acute leukemias is a major cause of therapeutic difficulties. Response to chemotherapy is one of the most important prognostic factors in this group of diseases. In acute lymphoblastic leukemia (ALL), and progressively more in acute myeloid leukemia (AML), the best parameter of that response is the presence of minimal residual disease (MRD). MRD monitoring is performed based on the flow cytometer analysis of leukemic immunophenotypes or detection of gene rearrangement by PCR. Both methods are characterized by high sensitivity and specificity, which clearly distinguishes them from the standard morphologic examination. This review presents the current state of knowledge of the importance and use of MRD in children and adults, in ALL and AML, emphasizing similarities and differences. Current opinions show that the MRD is the most important prognostic factor in ALL and an important factor in AML. Based on current data in children and adults, it seems that in acute lymphoblastic leukemia, presence of MRD is a continuous variable; the older the patient, the higher the risk of MRD and therapy failure. This paper presents also a new insight to the concept of MRD, because of the presence of leukemic stem cells that survive chemotherapy in AML and any of the maturational stages of leukemia-propagating cells in ALL. This idea combines the phenomenon of drug resistance of tumor stem cells and the presence of residual cells undetectable by methods of optical microscopy after applied chemotherapy. The concept of leukemic stem cells explains the occurrence of resistant clones both in ALL and AML. Based on studies of genetic profiles, there is growing evidence to suggest that acute leukemia is a highly heterogeneous disease, which goes hand in hand with the hierarchy of leukemic stem cells

* Adres do korespondencji: Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, ul. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, Polska.
Tel.: +48 52 585 4860; fax: +48 52 585 4867.

Adres email: jstyczynski@cm.umk.pl (J. Styczyński).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2014.07.002>

0001-5814/© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

and leukemia initiating cells. In the light of the current knowledge based on MRD, it seems necessary to review the concept of complete remission in MRD-positive leukemic patients.

© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Ostre białaczki

Ostre białaczki to heterogenna grupa złośliwych nowotworów hematologicznych charakteryzująca się niekontrolowaną proliferacją i zahamowaniem dojrzewania komórek prekursorowych linii białokrwinkowej w szpiku kostnym. Bazując na rozwoju ontogenetycznym układu krwiotwórczego, wyróżnia się dwie grupy ostrych białaczek: szpikowe (AML; *acute myeloid leukemia*) i limfoblastyczne (ALL; *acute lymphoblastic leukemia*).

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO; *World Health Organization*), częstość występowania ostrej białaczki szpikowej szacuje się na około 2,5–3 przypadków/100 tys./rok i wzrasta ona wraz z wiekiem, natomiast ostrej białaczki limfoblastycznej na około 1–4,75 przypadków/100 tys./rok [1]. Ostre białaczki częściej (3:2) rozpoznawane są u płci męskiej. Poszczególne rodzaje białaczek swoją maksymalną częstość występowania wykazują w różnych grupach wiekowych. AML stanowi około 75–80% przypadków ostrych białaczek u dorosłych i 20–25% u dzieci. ALL stanowi natomiast 15–20% ostrych białaczek u dorosłych i ponad 80% u dzieci, z najwyższą częstością występowania w wieku 2–5 lat. Ostra białaczka limfoblastyczna jest najczęstszym nowotworem dziecięcym i obejmuje około 25–30% wszystkich nowotworów u pacjentów w wieku do 15 lat [2].

Minimalna choroba resztkowa

Minimalna choroba resztkowa (MRD; *minimal residual disease*) to obecność populacji komórek białaczkowych, która przetrwała stosowane leczenie, a której liczebność nie wywołuje u chorego objawów klinicznych. MRD jest niewykrywalna przy użyciu mikroskopii optycznej, natomiast rezydualne komórki nowotworowe mogą zostać zidentyfikowane z zastosowaniem metod o wysokiej czułości, np. poprzez ich analizę immunofenotypową lub molekularną [3, 4]. Analiza cytogenetyczna nie ma w chwili obecnej zastosowania do monitorowania MRD jako metoda o bardzo niskiej czułości.

Monitorowanie minimalnej choroby resztkowej jest cennym narzędziem diagnostycznym wykorzystywanym do oszacowania odpowiedzi na leczenie indukcyjne oraz w celu określania właściwego postępowania poremisyjnego, w oparciu o indywidualną ocenę ryzyka wznowy u pacjenta. Jest to także ważny element monitorowania choroby pozwalający na wczesne wykrycie nawrotu białaczki.

Wśród technik służących identyfikacji MRD największe znaczenie mają obecnie cytometria przepływowa (FC; *flow cytometry*) oraz reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR;

polymerase chain reaction). Badanie cytometryczne polega na wieloparametrowej analizie antygenowej pozwalającej na określenie immunofenotypu białaczkowego, a tym samym na odróżnienie komórek nowotworowych od zdrowych. Cytometria przepływowa jest metodą znajdującą zastosowanie w większości przypadków ostrych białaczek, zarówno szpikowych, jak i limfoblastycznych. Pozwala na wykrycie 1 komórki białaczkowej w 1000–10 000 komórek prawidłowych. Jest to metoda szybka i znacznie tańsza od technik genetycznych. Utrudnienia w monitorowaniu MRD za pomocą FC spowodowane są obecnością subklonów lub pojawieniem się nowych immunofenotypów w trakcie leczenia [3–5]. PCR jest metodą polegającą na wybiórczym powieleniu określonego fragmentu DNA. Technika ta preferowana jest przede wszystkim do monitorowania MRD u pacjentów z klonalnymi rearanżacjami genów, ze względu na możliwość ich precyzyjnego zidentyfikowania [6]. PCR jest metodą bardziej czułą od FC (10^{-5} – 10^{-6}), jednak czas oczekiwania na wynik jest dłuższy [3].

MRD bada się we krwi obwodowej lub w szpiku. Wydaje się, że czułość metod wykrywania MRD w oparciu o szpik kostny jest około 10-krotnie wyższa.

Do najnowszych metod oceny MRD należy sekwencjonowanie genów nowej generacji [7, 8]. Metoda ta, chociaż bardzo dokładna, stawia duże wymagania techniczne i interpretacyjne.

Czynniki rokownicze w ALL u dzieci i dorosłych

Grupy ryzyka w ALL charakteryzuje się na podstawie zróżnicowanych cech klinicznych i biologicznych, do których zalicza się: wiek, leukocytozę, liczbę blastów, immunofenotyp, czynniki genetyczne, MRD i odpowiedź na leczenie. Czynniki prognostyczne w ALL można podzielić na 3 grupy:

- Związane z pacjentem: wiek, płeć, rasa, współistniejące schorzenia (np. trisomia 21, zespoły zaburzeń odporności).
- Związane z chorobą: leukocytoza blastyczna, zajęcie narządów pozaszpikowych, immunofenotyp komórek białaczkowych, obecność specyficznych zaburzeń genetycznych, lekooporność.
- Związane z leczeniem: wczesna odpowiedź na leczenie (steroidoterapię), czas osiągnięcia remisji, minimalna choroba resztkowa.

Ze względu na wysokie zróżnicowanie ALL zależne od wieku, czynniki prognostyczne w tych grupach wiekowych są odmienne, co przedstawione zostało w tabeli I.

Wiek (niemowlęta lub >10. roku życia), liczba leukocytów >50 G/l, rasa czarna, płeć męska i immunofenotyp T-komórkowy stanowią główne niekorzystne czynniki prognostyczne u dzieci. Istotnym czynnikiem rokowniczym

Tabela I – Niekorzystne czynniki prognostyczne w ALL u dzieci i dorosłych
Table I – Adverse prognostic factors in children and adults with ALL

Czynnik ryzyka Prognostic factors	Dzieci Children	Dorośli Adults
wiek wstępna leukocytoza	<1. rż lub >10. rż >20 G/l	>35. rż B-liniowa >30 G/l T-liniowa >100 G/l
typ białaczki zmiany cytogenetyczne i molekularne	T-komórkowa rearanżacje BCR-ABL, MLL; hipodiploidia	nie ma znaczenia rearanżacja BCR-ABL, MLL; złożony kariotyp (>5 zaburzeń)
odpowiedź na steroidoterapię	zła odpowiedź na prednizolon po 7 dniach terapii	nie stosuje się
czas uzyskania całkowitej remisji MRD po leczeniu indukcyjnym	brak remisji po 4 tyg. leczenia indukującego obecna	brak remisji po 4 tyg. leczenia indukującego obecna (zwłaszcza po konsolidacji)

związanym z pacjentem jest wiek jako zmienna ciągła: im starszy wiek, tym większe ryzyko niepowodzenia terapii [9]. Wyjątkiem są niemowlęta z rearanżacją MLL, zwłaszcza te młodsze niż 6 miesięcy z leukocytozą powyżej 300 G/L w chwili rozpoznania, które mają szczególnie niepomyślne rokowanie [10].

Młodzież i dorośli charakteryzują się większą częstością występowania białaczki biologicznie wysokiego ryzyka (np. BCR-ABL1, MLL-AF4), mniejszą częstością występowania korzystnych podtypów (np. ETV6-RUNX1, hiperdiploidia) oraz znacznie gorszą tolerancją leczenia onkologicznego [11–14]. Młodzież i dorośli wydają się mieć dużo korzystniejsze wyniki wówczas, gdy ich leczenie oparte jest na schematach pediatrycznych, które zapewniają większe dawki leków, wczesną i częstą terapię dokanałową, terapię reindukcyjną i podtrzymującą oraz lepsze dostosowywanie się do zaleceń lekarskich [14]. Ze złym rokowaniem nieodłącznie związany jest też starszy wiek (zwłaszcza powyżej 60 lat) i wysoka liczba leukocytów [14].

W chwili obecnej najistotniejszym wskaźnikiem prognostycznym w ostrych białaczkach limfoblastycznych jest poziom minimalnej choroby resztkowej [14, 15]. Odsetek pacjentów z obecnością MRD określaną po konsolidacji terapii (10–16. tygodnia) rośnie z wiekiem pacjentów. MRD jest więc również zmienną ciągłą, tj. im wyższy wiek pacjenta, tym większe ryzyko obecności MRD i niepowodzenia terapii ALL.

Minimalna choroba resztkowa w ostrych białaczkach limfoblastycznych

Znamiennej informacji prognostycznej, nadrzędnej w stosunku do klasycznych czynników ryzyka, dostarcza monitorowanie MRD, zarówno w pierwszej remisji, jak i po wznowie oraz po transplantacji szpiku kostnego [16–18]. Poziom MRD jest bardzo silnym wskaźnikiem prognostycznym, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych z ALL [5, 19, 20].

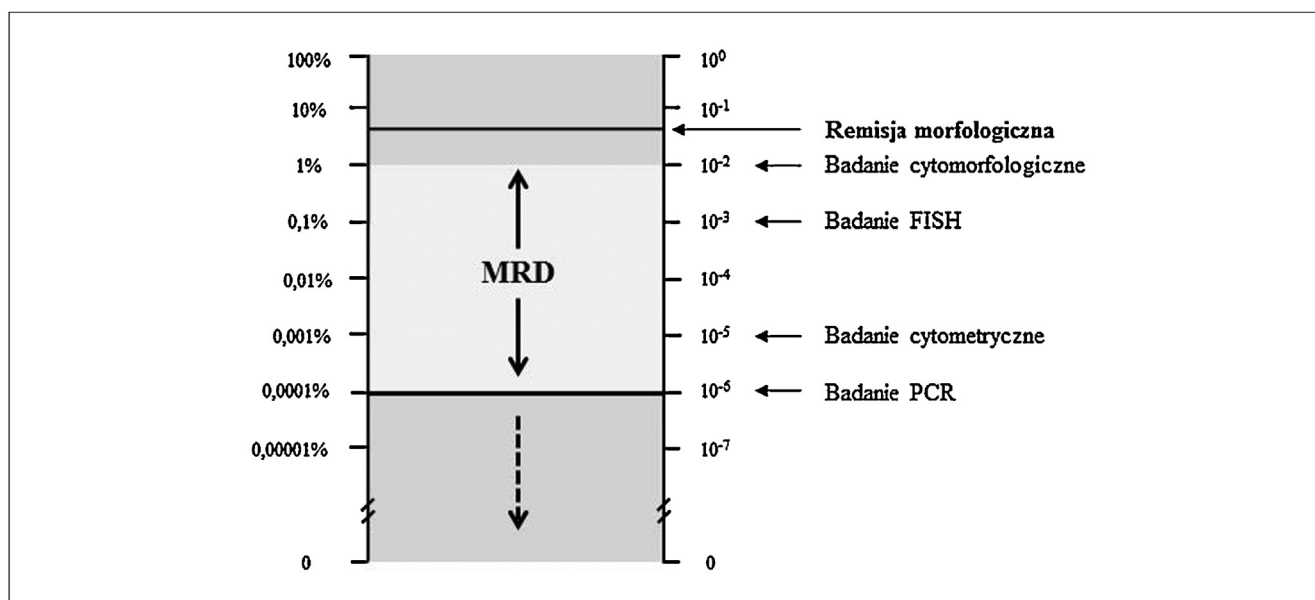
Rutynowo wykonywane oznaczenia cytometryczne i molekularne pozwalają na określenie wielkości MRD w granicach 0,1–0,001% (Ryc. 1). W większości badań MRD określa się jako dodatnią przy obecności 0,01% lub więcej komórek całkowitej populacji badanej. Ryzyko nawrotu choroby jest generalnie proporcjonalne do poziomu MRD, zwłaszcza przy pomiarze w trakcie lub po zakończeniu leczenia indukującego remisję [5, 21].

MRD w ALL u dzieci

Pięcioletni czas przeżycia bez objawów chorobowych u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną dotyczy 76–86% pacjentów [22]. Osiągnięcie takich wyników było możliwe dzięki wprowadzeniu badań MRD i modyfikacji leczenia w oparciu o MRD [23].

Obecnie większość laboratoriów określa MRD u dzieci z ALL w oparciu o klonalne rearanżacje genów kodujących immunoglobuliny (Ig) lub białka receptorowe limfocytów T (TCR) poprzez zastosowanie techniki PCR [21, 24]. Powyższe markery molekularne ma około 90% pacjentów pediatrycznych. Limfoblasty mogą być także rozpoznane na podstawie ich chromosomalnych zmian powstałych w wyniku fuzji genowych, wśród których wyróżniamy: BCR-ABL1, MLL-AFF1, TCF3-PBX1 i ETV6-RUNX1. Najczęściej występujące aberracje cytogenetyczne obserwuje się u około 1/3 lub mniej pacjentów [24]. Technika PCR pozwala na wykrycie 1 komórki białaczkowej w 100 000 badanych komórek, co czyni ją metodą bardziej czułą niż FC [21, 24]. Ma to znaczenie u dzieci z MRD <0,01%, albowiem pomimo dobrze ugruntowanej wiedzy wartość prognostyczna MRD poniżej tego progu pozostaje niejasna. Wykorzystując metodę PCR, wykazano, że pacjenci z MRD 0,001–0,01% mieli wyższe ryzyko nawrotu choroby niż pacjenci z niższą wartością MRD lub całkowicie niewykrywalną chorobą [21].

W ALL u dzieci blasty białaczkowe, poza specyficznymi zmianami genetycznymi, charakteryzują się także unikatowymi kombinacjami markerów komórkowych, co przez użycie odpowiednich przeciwciał monoklonalnych pozwala je wykryć w badaniu cytometrycznym. Niezmiernie ważne jest, aby zdefiniowane w rozpoznaniu markery różnicowały komórki nowotworowe od zdrowych komórek, w tym limfoidalnych komórek progenitorowych [24]. Ocena MRD techniką cytometrii przepływowej u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną może być wykorzystana w około 98% przypadków [25]. Czułość tego badania jest równa około 0,01% [24]. W chwili obecnej cytometryczna analiza MRD w pediatrycznych ALL jest metodą dobrze wystandaryzowaną, co znacząco przyczynia się do poszerzenia możliwości stosowania terapii dostosowanej do grup ryzyka [23, 26]. Pełna standaryzacja metody cytometrycznej jest na chwilę obecną jedynie realna przy wstępnym rozpoznaniu choroby [27].



Ryc. 1 – Poziomy MRD: czułość i znaczenie kliniczne

Fig. 1 – MRD level: sensitivity and clinical value

Cytometria przepływowa jest metodą rozwijającą. Cous-tan-Smith i wsp. na podstawie różnicy w ekspresji genów komórek białaczkowych i prawidłowych odkryli nowe markery mogące potencjalnie służyć do monitorowania MRD metodą cytometrii przepływowej: CD44, BCL2, HSPB1, CD73, CD24, CD123, CD72, CD86, CD200, CD164, CD97, CD102 oraz CD99 [15].

Zróznicowane cechy genetyczne i biologiczne poszczególnych podtypów białaczek limfoblastycznych w trakcie terapii mogą mieć wpływ na występowanie MRD [5]. U dzieci z ALL linii B-komórkowej MRD jest rzadziej obserwowana wśród pacjentów z ETV6-RUNX1, hiperdiploidią (>50 chromosomów) i TCF3-PBX1. Częściej natomiast obecność MRD można zaobserwować u osób z BCR-ABL1 i delecją IKZF1. Wyjątkowo wysokie wartości MRD występują u dzieci z ALL z wczesnych prekursorów komórek T [5, 14].

MRD ma istotne znaczenie w stratyfikacji leczenia po wznowie ALL. Kwalifikacja pacjentów z obecną MRD (np. >10³) po zakończeniu terapii indukcyjnej do przeszczepienia allogenicznego komórek krwiotwórczych (allo-HSCT; *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) przyczyniła się do istotnej poprawy wyników leczenia [28–30]. Na skuteczność allo-HSCT u pacjentów z ALL istotny wpływ ma stan remisji przed transplantacją. Ocena MRD u dzieci z ALL przed allo-HSCT jest ważnym czynnikiem prognostycznym ryzyka nawrotu choroby po transplantacji. Oznaczenie MRD przed allo-HSCT pozwala na identyfikację pacjentów wymagających zastosowania wzmocnionej chemioterapii oraz tych, którzy mogą być poddani terapii standardowej [31–33].

Kliniczne znaczenie MRD w pediatrycznych ALL jest stosunkowo dobrze określone [34]. Włączenie detekcji MRD do protokołów klinicznych znacznie udoskonaliło ocenę

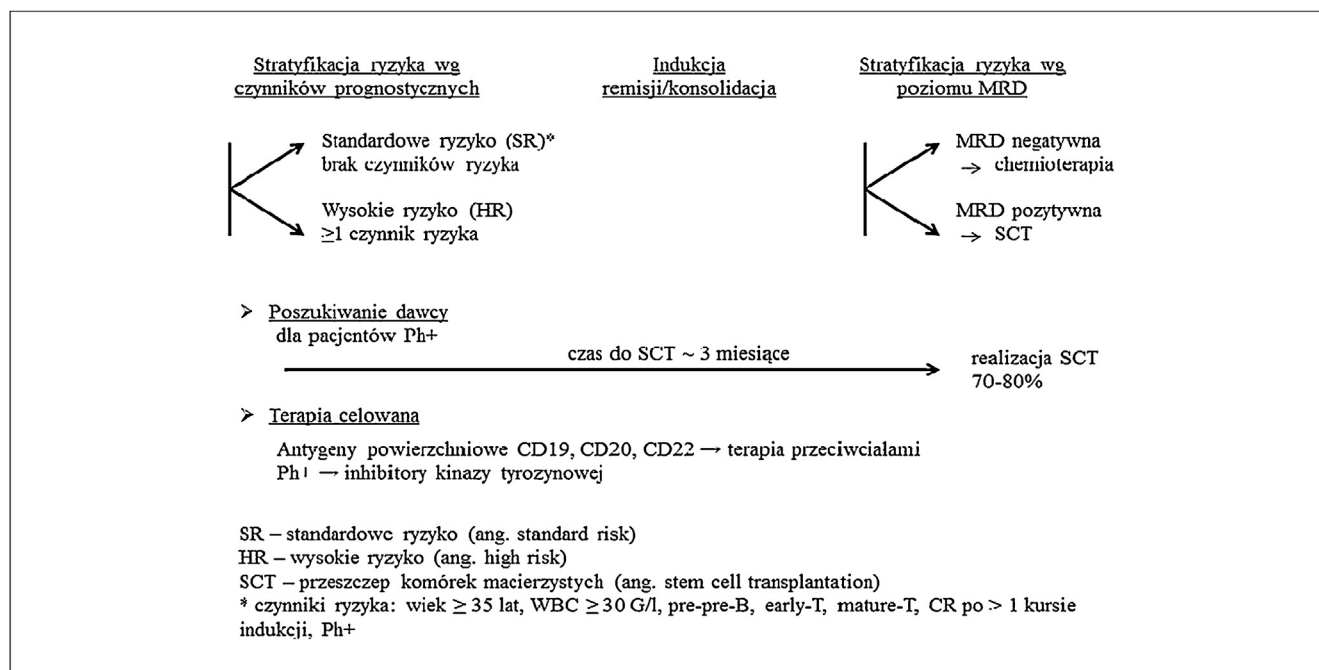
ryzyka nawrotu oraz przyczyniło się do poprawy wyników terapii [21, 23, 35].

MRD w ALL u dorosłych

U dorosłych z ostrą białaczką limfoblastyczną całkowitą remisję uzyskuje się w około 85–90% przypadków [36]. Pomimo tak dobrych wyników, u połowy tych pacjentów ostatecznie następuje nawrót choroby, który jest związany z bardzo niskim odsetkiem wyleczeń <10%. Głównym celem optymalizacji leczenia w ALL u dorosłych jest zmniejszenie częstości występowania nawrotu białaczki [11] (Ryc. 2).

Opracowane w ciągu ostatniej dekady metody pozwalają na ocenę ilościową resztkowych komórek białaczkowych z coraz większą czułością i precyzją. W ostrych białaczkach limfoblastycznych u dorosłych większość doświadczeń i stosunkowo wysoki poziom standaryzacji zostały zgromadzone na podstawie oceny rearanżacji genów TCR i IG, badanych z wykorzystaniem metod molekularnych (grupa ESG-MRD-ALL) [37]. Monitorowanie MRD na podstawie powyższych aberracji genetycznych umożliwia szczegółową ocenę odpowiedzi na leczenie w ALL u dorosłych. Wyniki MRD uzyskane po indukcji remisji oraz po I konsolidacji pozwalają na identyfikację nowej podgrupy pacjentów z brakiem remisji molekularnej, czyli takich z wysokim ryzykiem nawrotu choroby, wymagających wczesnej intensyfikacji leczenia. Chorzy ci zazwyczaj są oporni na konwencjonalne leki i są kandydatami do terapii celowanej i allogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych [36].

Szeroko stosowane do monitorowania MRD są też geny fuzyjne, takie jak: BCR-ABL1, MLL-AFF1, TCF3-PBX1,



Ryc. 2 – Strategia terapii u dorosłych z ALL z uwzględnieniem minimalnej choroby resztkowej (wg [9])
 Fig. 2 – Strategy of therapy in adult ALL, with the use of minimal residual disease (acc. to [9])

ETV6-RUNX1, obecne u około 40% dorosłych z ALL. Wśród ostatnio zidentyfikowanych nieprawidłowości, które w zasadzie mogą być wykorzystywane do monitorowania MRD, są geny fuzyjne obejmujące CRLF2 (np. IGH@-CRLF2 i P2RY8-CRLF2) występujące u około 6% dorosłych z ALL [5, 38].

Dorośli pacjenci z ALL, podobnie jak dzieci, mają komórki nowotworowe charakteryzujące się niepowtarzalnymi kombinacjami immunofenotypowymi, które mogą zostać zidentyfikowane w badaniu cytometrycznym u ponad 95% chorych [11, 39]. Określenie immunofenotypu komórek białaczkowych pozwala na monitorowanie MRD, natomiast jednoczesne wykrycie u tych pacjentów specyficznych antygenów powierzchniowych, takich jak np. CD19, CD20 lub CD22, umożliwia zastosowanie leczenia przeciwciałami monoklonalnymi. Pacjenci z ALL linii B-komórkowej z obecnym antygenem CD20 mogą być leczeni przeciwciałami anti-CD20 (rytuksymab) [11].

Poziom MRD u pacjentów Ph- równy 0,1% lub więcej po leczeniu indukcyjnym stanowi niezależny czynnik nawrotu choroby [40]. W tej samej grupie chorych prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia wolnego od białaczki jest istotnie wyższe u pacjentów z MRD <0,1%, aniżeli u tych z wyższą wartością MRD (57% vs 17%). U pacjentów dorosłych z ALL Ph+, nieobecność MRD, uzyskana po chemioterapii z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej, jest przed HSCT korzystnym czynnikiem prognostycznym przeżycia w tej grupie chorych [5].

Wczesna ocena MRD u dorosłych z ALL jest silnym i niezależnym czynnikiem prognostycznym w dużym stopniu wspomagającym podejmowanie decyzji terapeutycznych bądź ich modyfikację [36]. Badanie MRD jest uwzględnione w aktualnie obowiązujących protokołach leczenia PALG (Polish Adult Leukemia Group) dla ALL.

Czynniki rokownicze w ostrej białaczce mieloblastycznej u dzieci i dorosłych

Wysoka heterogenność ostrych białaczek szpikowych sprawia, że ta grupa chorób znacznie różni się między sobą przebiegiem klinicznym i rokowaniem. Czynniki ryzyka AML u dorosłych obejmują: wiek >55-60 lat, wtórny charakter choroby, aberracje cytogenetyczno-molekularne, brak remisji po leczeniu indukującym. Współcześnie, aberracje cytogenetyczno-molekularne mają największe znaczenie rokownicze (Tab. II) [41, 42]. Osoby powyżej 60. roku życia [41] mają więcej chorób współistniejących, częściej są w gorszym stanie ogólnym w chwili rozpoznania i gorzej tolerują agresywną chemioterapię [43]. Wyższa oporność na leczenie występująca u starszych dorosłych wynika również z ekspresji białek oporności wielolekowej [44].

Minimalna choroba resztkowa w ostrych białaczkach szpikowych

Nowym kierunkiem w strategii leczenia AML jest wykrywanie resztkowych komórek białaczkowych innymi metodami, bardziej czułymi i mniej subiektywnymi niż ocena morfologiczna.

Obiecującą techniką w monitorowaniu MRD jest PCR. Metoda ta jednak znajduje zastosowanie tylko u części pacjentów mających określone aberracje genetyczne. Ograniczona jest zatem do specyficznych podtypów AML [6]. Szeroko wykorzystywana w ostrej białaczce limfoblastycznej rearanżacja genów immunoglobulin i receptorów limfocytów T jest bardzo rzadka w AML [16]. Obecnie oznaczanie MRD

Tabela II – Niekorzystne czynniki prognostyczne w AML u dzieci i dorosłych
Table II – Adverse prognostic factors in children and adults with AML

Czynnik ryzyka Prognostic factors	Dzieci Children	Dorośli Adults
wiek	>10. roku życia	>55.–60. roku życia
wstępna leukocytoza	>100 G/l	nie ma znaczenia
typ białaczki	AML M0; AML M7	nie ma znaczenia
zmiany cytogenetyczne i molekularne	inv(3)(q21;q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1; t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214. t(v;11)(v;q23); rearanżacje MLL. -5/del(5q); 7/abnl(17p); złożony kariotyp >3 zaburzenia	poprzedzający zespół mielodysplastyczny lub mieloproliferacyjny, poprzedzająca chemio- lub radioterapia
wtórne		
odpowiedź na leczenie	późna remisja	brak remisji po leczeniu indukującym
MRD	brak kryteriów	w APL: obecna

rutynowo wykonuje się głównie w ostrej białaczce promielocytowej (APL; *acute promyelocytic leukemia*).

W odróżnieniu od PCR, cytometria przepływowa ma potencjalnie znacznie szersze zastosowanie, analiza immunofenotypowa MRD może zostać bowiem wykonana u ponad 80% pacjentów [45, 46]. Pomimo dobrze ugruntowanej wiedzy na temat przydatności immunofenotypowania do diagnostyki, klasyfikacji, określania czynników ryzyka oraz monitorowania MRD w ostrych białaczkach limfoblastycznych, ilość danych na ten temat w ostrych białaczkach szpikowych jest bardzo ograniczona [4]. Do monitorowania MRD w AML z wykorzystaniem FC niezbędne jest w momencie diagnozowania pacjenta zdefiniowanie ekspresji aberrantnych markerów, powszechnie określanych jako immunofenotypy białaczkowe (LAIP; *leukemia associated immunophenotypes*). Zawierają one kombinację 4–5 białek powierzchniowych, które występują w znikomej ilości bądź są całkowicie nieobecne na komórkach krwi i szpiku osoby zdrowej [4, 46]. Kluczową ich cechą jest to, że poza ekspresją zróżnicowanych markerów mieloidalnych zawierają one także kompleksy niecharakterystyczne dla tej linii, co tworzy kompozycję białek normalnie reprezentujących odrębne etapy dojrzewania [6].

Najbardziej znane zaburzenia antygenowe występujące w AML objawiają się poprzez: [4]

- asynchronizm ekspresji antygenów (jednoczesne występowanie wczesnych i późnych markerów na jednej komórce, np. koekspresja antygenów CD34 i CD15)
- „nieściśłość” liniową (np. ekspresja markerów limfoidalnych, takich jak CD2, CD3, CD5, CD7, CD10 i CD19, na blastach mieloidalnych)
- nadekspresję antygenową (ponadnormalny wzrost ekspresji pewnego określonego antygenu na jednej komórce)
- aberrantne właściwości rozpraszania światła (mieloidalne blasty z nieprawidłowym tzn. niecharakterystycznym dla komórek zdrowych usytuowaniem na wykresie zależności wielkości od ziarnistości)
- nieobecność liniowo-specyficznych antygenów (np. brak spodziewanej na blastach mieloidalnych ekspresji CD13 i CD33)

MRD w AML u dzieci

Ukierunkowana terapia uwzględniająca ryzyko oraz zoptymalizowane leczenie wspomagające znacznie poprawiły

wyniki wyleczalności dzieci z ostrą białaczką szpikową. Pięcioletni czas przeżycia wolny od choroby osiąga aktualnie 50–60% dzieci AML [16]. Obecnie u około 35% chorych można monitorować MRD za pomocą PCR, opierając się na zmianach genetycznych RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11 oraz MLL-AF9. Ponadto w APL MRD jest monitorowana w oparciu o rearanżację PML-RARα [6, 24]. Ten typ białaczki, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych, wiąże się z dobrym przeżyciem, sięgającym 75–90% [22]. Monitorowanie MRD u pacjentów z APL, zarówno w pierwszej remisji, jak i po wznowie molekularnej, w połączeniu z chemioterapią zapewnia ewidentne zmniejszenie ilości nawrotów w tym typie białaczki, a tym samym służy jako wzór zindywidualizowanego podejścia do każdego z pacjentów [47–49].

Mutacje NPM1 i FLT3-ITD występują odpowiednio u około 8% i 15% dzieci z AML i mogą być również potencjalnymi markerami wykorzystywanymi do detekcji MRD techniką PCR [13]. W podgrupie pacjentów z zaburzeniami MLL ocena MRD polegająca na wykrywaniu genów fuzyjnych na poziomie DNA jest obecnie najlepszą metodą, która zastąpiła wykrywanie obecności transkryptów fuzyjnych MLL [50, 51].

LAIP są identyfikowane u większości dzieci z ostrymi białaczkami, jednak w 40% przypadków osiąga się czułość nie wyższą niż 1:1000, co wynika z częściowego pokrycia się fenotypu komórek białaczkowych z normalnymi komórkami progenitorowymi szpiku kostnego [24]. Analiza MRD bazująca na metodzie FC znajduje szerokie zastosowanie i jest silnym czynnikiem prognostycznym, stosowanym do oceny odpowiedzi na leczenie [52, 53]. Jednak u części pacjentów, pomimo wykrycia choroby resztkowej, następuje długotrwała remisja, a z drugiej strony, nawet w przypadku braku MRD może wystąpić nawrót choroby. Takie zróżnicowanie wynika prawdopodobnie z heterogenności biologicznej, jak i czułości zastosowanej metody. Według Lokena i wsp., połączenie FC z badaniami genetycznymi mogłoby przyczynić się do bardziej precyzyjnej oceny ryzyka w prowadzeniu klinicznym wszystkich pacjentów z AML [52]. Campana i wsp. wykazali natomiast brak zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą cytometrii przepływowej i PCR, jednak nie ustalili powodu braku tej zgodności [24]. Brak spójności w wynikach i wnioskach wysuwanych na ich podstawie przez różne ośrodki badawcze świadczy o konieczności wystandaryzowania metod służących ocenie MRD.

Tabela III – Podobieństwa i różnice w MRD w ALL i AML u dzieci i dorosłych
Table III – Similarities and differences in MRD in ALL and AML in children and adults

MRD	Dzieci Children	Dorośli Adults
ALL	<ul style="list-style-type: none"> • najsilniejszy czynnik rokowniczy • wskaźnik do intensyfikacji terapii i HSCT • element większości protokołów leczniczych • wystandaryzowane procedury oznaczania MRD techniką FC • FC równie dobre jak PCR • można stosować u 98% pacjentów 	<ul style="list-style-type: none"> • czynnik rokowniczy • wskaźnik do intensyfikacji terapii i HSCT • element wielu protokołów leczniczych • odsetek pacjentów z obecną MRD po konsolidacji rośnie z wiekiem • brak standaryzacji
AML	<ul style="list-style-type: none"> • znaczenie w APL • FC jest metodą obiecującą • PCR – około 35% dzieci ma specyficzne aberracje genetyczne służące detekcji MRD • brak zgodności pomiędzy FC i PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • znaczenie w APL • brak danych (brak standaryzacji FC i PCR)

MRD w AML u dorosłych

U dorosłych pacjentów z ostrą białaczką szpikową częstość uzyskiwania całkowitej remisji oscyluje wokół 50–80%. Pomimo takich rezultatów, zaledwie 20–30% przypadków ma szanse przeżycia 5 lat od ustalenia diagnozy [54, 55].

Pomimo że w pediatrycznych AML ocena MRD została w niektórych protokołach dodana do konwencjonalnej stratyfikacji ryzyka, u dorosłych systematyczne jej stosowanie nie jest jeszcze osiągnięte (z wyjątkiem APL). Leczenie oparte na monitorowaniu MRD u chorych będących w remisji morfologicznej jest raczej rzadkością niż normą [55]. Zainteresowanie oceną MRD jako narzędziem prognostycznym u dorosłych z AML stopniowo jednak wzrasta [45]. Obecność MRD, w przeciwieństwie do cytogenetycznych czynników rokowniczych, reprezentuje zbiorowy wynik końcowy wszystkich mechanizmów komórkowych, które pozwalają na określenie odpowiedzi pacjenta na zastosowaną terapię [54].

Markery molekularne, choć zapewniają wysoką czułość, mogą być stosowane tylko u części pacjentów, zarówno w diagnostyce, jak i w ocenie rokowania [28]. Nie wszystkie markery w AML nadają się do monitorowania MRD. Najbardziej znane i stosowane to FLT3 oraz PML-RAR w APL. Nie jest jednoznaczne znaczenie NPM1 w monitorowaniu MRD: jest to marker korzystnego rokowania, jednak jego obecność po zakończeniu leczenia może wskazywać na zwiększone ryzyko nawrotu. Brak też odpowiedniej standaryzacji i niezbędnych wartości punktów granicznych w technikach genetycznych [54].

Immunofenotypowanie oparte na badaniu cytometrycznym może obejmować większą część przypadków AML, jednakże w tej metodzie brakuje jeszcze wystandaryzowanych procedur. Problemem w normalizacji tej techniki jest przede wszystkim wysoce zróżnicowana ekspresja aberrantnych immunofenotypów [45]. W sferze badań naukowych pozostaje badanie obecności białaczkowych komórek macierzystych jako markera MDR.

MRD jako koncepcja białaczkowych komórek macierzystych

Aktualne poglądy pokazują, że MRD staje się najważniejszym czynnikiem rokowniczym w ALL oraz ważnym czynnikiem

w AML. Obecność MRD w AML może być tłumaczona jako obecność białaczkowych komórek macierzystych (LCS; *leukemic stem cells*), które przetrwały chemioterapię. Natomiast w ALL obecność MRD może być efektem obecności wczesnych stadiów rozwoju klonu komórek białaczkowych, które przetrwały chemioterapię, co wynika z faktu, że ALL może rozwijać się w każdym stadium różnicowania białaczkowych komórek prekursorowych limfocytów B [56]. Tym samym koncepcja ta łączy oporność nowotworowych komórek macierzystych na cytostatyki [57, 58] oraz obecność komórek rezydualnych, niewykrywanych metodami mikroskopii optycznej, po zastosowanej chemioterapii [59].

Koncepcja białaczkowych komórek macierzystych tłumaczy występowanie klonów opornych [60]. W oparciu o badania profili genetycznych istnieje coraz więcej dowodów sugerujących, że ostre białaczki są chorobami wysoce heterogennymi [61]. Idzie to w parze z hierarchią białaczkowych komórek macierzystych i komórek inicjujących białaczkę.

Obecnie pojawia się również pytanie czy określenie „remisja całkowita” może być stosowane w odniesieniu do chorych „MRD-dodatnich”? Należy podkreślić, że pacjent w „remisji całkowitej”, u którego stwierdza się obecność MRD, ma przecież duże ryzyko nawrotu choroby.

Podsumowanie

Niewątpliwie aktualnie najsilniejszym czynnikiem rokowniczym terapii przeciwbiałaczkowej jest odpowiedź na początkową terapię. W tych kategoriach najlepszym parametrem tej odpowiedzi jest obecność minimalnej choroby resztkowej. Pod względem terapeutycznym MRD dostarcza najbardziej racjonalnej informacji o odpowiedzi na leczenie, jak również przed i po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Aktualny stan wiedzy w zakresie znaczenia i wykorzystania MRD jest zróżnicowany pomiędzy dziećmi i dorosłymi, pomiędzy ALL i AML. Najistotniejsze różnice przedstawiono w tabeli III.

Monitorowanie MRD znacznie częściej wykorzystywane jest u pacjentów z ALL, w tym szczególnie u dzieci [62]. Zgromadzone doświadczenie przyczyniło się do ustalenia niezbędnych procedur, m.in. punktów granicznych, punktów czasowych itp. Ponadto cechy biologiczne i genetyczne limfoblastów, pomimo stosunkowo wysokiej heterogenności

ALL, poprzez zastosowanie FC i PCR, pozwalają na ocenę MRD u prawie wszystkich pacjentów. U dorosłych z ALL MRD jest elementem wielu protokołów leczniczych, jednakże standaryzacja metod służących jej ocenie nie jest tak dobrze rozwinięta jak w pediatrii. W AML znaczenie MRD stopniowo wzrasta. Trudności w dokładnej ocenie choroby resztkowej w tym typie białaczki wynikają głównie z jej znacznej odmienności biologicznej, cytogenetycznej oraz zróżnicowanych mechanizmów oporności. Obecnie rutynowo monitoruje się poziom MRD w APL u dzieci i dorosłych. Ponadto 1/3 dzieci ma specyficzne aberracje genetyczne służące ocenie MRD techniką PCR. Obiecującą metodą jest jednak cytometria przepływowa, ze względu na fakt możliwości określenia fenotypu każdej z badanych populacji komórek białaczkowych. Wydaje się, że ocena MRD wkrótce stanie się jednym z najważniejszych parametrów badanych u każdego pacjenta z ostrą białaczką.

Wkład autorów/Authors' contributions

EP – zebranie piśmiennictwa, napisanie artykułu; LG – krytyczna rewizja artykułu, pisanie artykułu, akceptacja artykułu; JS – koncepcja pracy, pisanie artykułu, zebranie piśmiennictwa, akceptacja artykułu.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 17–30. Lyon: IARC; 2008. p. 167–178.
- [2] Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30:1663–1669.
- [3] Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, et al. Incidence, sensitivity and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008;129:934–945.
- [4] Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;131:16–26.
- [5] Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;7–12.
- [6] Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro RC, et al. Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9:281–285.
- [7] Thol F, Kölling B, Damm F, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:689–695.
- [8] Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 2013 Dec 17. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.375> [Epub ahead of print].
- [9] Styczyński J, Wysocki M. In vitro drug resistance profiles of adult acute lymphoblastic leukemia: possible explanation for difference in outcome to similar therapeutic regimens. *Leuk Lymphoma* 2002;43:301–307.
- [10] Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007;370(9583):240–250.
- [11] Hoelzer D. Monitoring and managing minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013;290–293.
- [12] Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood* 2012;120:4470–4481.
- [13] Jaworska-Posadzy A, Styczyński J, Kubicka M, et al. Prognostic value of persistent peripheral blood and bone marrow lymphoblast on day 15 of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia as detected by flow cytometry. *Anticancer Res* 2011;31:1453–1458.
- [14] Inaba H, Greaves M, Mullighan ChG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2013;381:1943–1955.
- [15] Coustan-Smith E, Song G, Clark Ch, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117:6267–6276.
- [16] Boeckx N, Willemsse MJ, Szczepanski T, et al. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:368–375.
- [17] Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *European Organization for Research and Treatment of Cancer: Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med* 1998;27(339):591–598.
- [18] Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;115:3206–3214.
- [19] Morley AA, Latham S, Brisco MJ, et al. Sensitive and specific measurement of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Diagn* 2009;11:201–210.
- [20] Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351(9102):550–554.
- [21] Stow P, Key L, Chen X, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115:4657–4663.
- [22] Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551–565.

- [23] Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:359-369.
- [24] Campana D, Coustan-Smith E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. *Korean J Hematol* 2012;47:245-254.
- [25] Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360:2041-2730.
- [26] Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:331-340.
- [27] Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26:1986-2010.
- [28] Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001;358:1239-1241.
- [29] Eckert C, von Stackelberg A, Seeger K, et al. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. *Eur J Cancer* 2013;49:1346-1355.
- [30] Eckert C, Henze G, Seeger K, et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. *J Clin Oncol* 2013;31:2736-2742.
- [31] Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92:4072-4079.
- [32] Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 2002;16:1668-1672.
- [33] Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27:377-384.
- [34] van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352(9142):1731-1738.
- [35] Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011;118:2077-2084.
- [36] Gökbuğut N, Kneba M, Raff T, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* 2012;120:1868-1876.
- [37] van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604-611.
- [38] Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood* 2011;117:2129-2136.
- [39] Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:347-358.
- [40] Hołowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study. *Br J Haematol* 2008;142:227-237.
- [41] Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendation from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-474.
- [42] Patel JP, Levine RL. How do novel molecular genetic markers influence treatment decisions in acute myeloid leukemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:28-34.
- [43] Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009;113:4179-4187.
- [44] Styczyński J. Drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2007;8:59-75.
- [45] Feller N, van der Velden VHJ, Brooimans RA, et al. Defining consensus leukemia-associated immunophenotypes for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia in a multicenter setting. *Blood Cancer Journal* 2013;3:e129.
- [46] Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2009;21:582-588.
- [47] Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, et al., Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood* 1997;90:1014-1021.
- [48] Diverio D, Rossi V, Avvisati G, et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. *Blood* 1998;92:784-789.
- [49] Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:3650-3658.
- [50] Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 2006;20:451-457.
- [51] Van der Velden VH, Corral L, Valsecchi MG, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23:1073-1079.
- [52] Loken MR, Alonzo TA, Pardo L, 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;120:1581-1588.
- [53] Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30:3625-3632.
- [54] Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119:332-341.

- [55] Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:35-42.
- [56] Le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* 2008;14:47-58.
- [57] Styczyński J, Drewa T. Leukemic stem cells: from metabolic pathways and signaling to a new concept of drug resistance targeting. *Acta Biochim Pol* 2007;54:717-726.
- [58] Drewa T, Styczynski J, Szczepanek J. Is the cancer stem cell population "a player" in multi-drug resistance? *Acta Pol Pharm* 2008;65:493-500.
- [59] Styczyński J, Piątkowska M, Jaworska-Posadzy A, et al. Comparison of prognostic value of in vitro drug resistance and bone marrow residual disease on day 15 of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 2012;32:5495-5500.
- [60] Styczynski J, Wysocki M. Ex vivo drug resistance in childhood acute myeloid leukemia on relapse is not higher than at first diagnosis. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:195-199.
- [61] Szczepanek J, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, et al. Gene expression signatures and ex vivo drug sensitivity profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Appl Genet* 2012;53:83-91.
- [62] Dębski R, Sędek Ł, Jaworska-Posadzy A, et al. Monitorowanie i walidacja minimalnej choroby resztkowej metodą cytometrii przepływowej w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci. *Post Nauk Med* 2014;27:225-230.