

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-10-16>

Определение минимального количества опухолевых клеток для диагностики и мониторинга лечения нейробластомы у детей

И.Ж. Шубина, Н.А. Бурлака, А.П. Казанцев, Ю.И. Должикова, А.А. Петкевич,
К.И. Киргизов, М.В. Киселевский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Жановна Шубина irinashubina@mail.ru

Диагностика, лечение и выработка тактики проводимой терапии нейробластомы (НБ) у детей являются нерешенными проблемами современной детской онкогематологии. Один из ключевых аспектов мониторинга терапии НБ – обнаружение и контроль минимальной остаточной болезни.

В обзоре рассмотрены современные методы, используемые для обнаружения минимальной остаточной болезни при НБ, такие как иммуноцитохимия, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), проточная цитометрия, методы качественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (обратно-транскриптазная ПЦР, RT-PCR) и количественной ПЦР (QRT-PCR) для оценки мРНК. Специфический маркер НБ, дизиагоглиозид GD2, определяют методом проточной цитометрии или иммуноцитохимии, повышая ее специфичность с помощью флуорохромов. В настоящее время метод FISH является «золотым стандартом» для оценки статуса гена *MYCN* при НБ. Широко используемый метод многопараметровой проточной цитометрии позволяет достичь высокой специфичности анализа при диагностике НБ. Для выявления клеток НБ с помощью RT-PCR предлагаются разные мишени, но в настоящее время единственной признанной мишенью является мРНК тирозингидроксилазы. При этом показано, что QRT-PCR имеет преимущество перед более традиционной качественной RT-PCR, поскольку этот метод позволяет более точно и количественно определить 1 или несколько мРНК в клинических образцах.

Обсуждаются результаты исследований по сравнению чувствительности методов диагностики, таких как RT-PCR, проточная цитометрия, FISH и др. Сравнительные исследования включали многопараметровую проточную цитометрию с различными комбинациями моноклональных антител CD9/CD81/CD56/CD45/GD2, традиционную RT-PCR и количественную – QRT-PCR для обнаружения циркулирующих клеток НБ в образцах от пациентов с онкологией и здоровых добровольцев.

Несмотря на то что каждый из оцениваемых методов имеет свои преимущества, авторы акцентируют внимание на том, что именно многопараметровая проточная цитометрия позволяет быстро и надежно определять минимальную остаточную болезнь или микрометастазы НБ.

Ключевые слова: нейробластома, минимальная остаточная болезнь, микрометастазы, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия

Для цитирования: Шубина И.Ж., Бурлака Н.А., Казанцев А.П. и др. Определение минимального количества опухолевых клеток для диагностики и мониторинга лечения нейробластомы у детей. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):10–6. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-10-16.

Detection of minimal tumor cells for the diagnosis and treatment monitoring of children with neuroblastoma

Irina Zh. Shubina, Natalia A. Burlaka, Anatoly P. Kazantsev, Yulia I. Dolzhikova, Alisa A. Petkevich,
Kiril I. Kirgizov, Mikhail V. Kiselevskiy

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Irina Zhanovna Shubina irinashubina@mail.ru

Diagnosis, treatment and designing an adequate strategy of neuroblastoma (NB) therapy in children is still a complicated tasks for pediatric oncology and hematology. One of the key aspects of NB control is detection and monitoring of minimal residual disease.

The authors make a concise review of the up-to-date methods, such as immunocytochemistry, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), flow cytometry, the methods of qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) to estimate mRNA (RT-PCR and QRT-PCR), which are currently used for minimal residual disease detection in patients with NB. Disialoganglioside GD2, a specific NB marker, is traditionally determined by immunocytochemistry with fluorochromes that enhance its specificity, and by flow cytometry, as well. At present, FISH test is a gold standard for evaluation of the *MYCN* gen status in NB. A widely used multicolor flow cytometry method allows achieving high specificity of the analysis for NB diagnosis. RT-PCR may search for various targets to reveal NB cells, however, at the moment the only accepted immune target is tyrosine hydroxylase mRNA. Moreover, the studies established that quantitative QRT-PCR has more advantages than traditional qualitative RT-PCR, since this method allows a more accurate and quantitative detection of one or several mRNAs in clinical samples.

The review discusses advantages and disadvantages of the main methods currently used for minimal residual disease evaluation of NB cells, such as RT-PCR, flow cytometry, FISH, etc. Comparative studies included multicolor flow cytometry with various combinations of CD9/CD81/CD56/CD45/GD2 monoclonal antibodies, conventional RT-PCR and quantitative QRT-PCR to reveal circulating/disseminated NB cells in the clinical samples of cancer patients and healthy volunteers.

The authors analyze the results of various studies that compared accuracy and sensitivity of diagnostic methods such as RT-PCR, flow cytometry, FISH and some others. Despite the advantages of each method, the authors emphasize that multicolor flow cytometry is the optimal approach for the rapid and reliable detection of minimal residual disease and micrometastases of NB.

Key words: neuroblastoma, minimal residual disease, micrometastases, polymerase chain reaction, flow cytometry

For citation: Shubina I.Zh., Burlaka N.A., Kazantsev A.P. et al. Detection of minimal tumor cells for the diagnosis and treatment monitoring of children with neuroblastoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):10–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-10-16.

Введение

Лечение детей с нейробластомой (НБ) является актуальной проблемой современной детской онкогематологии. Своевременная диагностика часто бывает затруднена, так как симптомы НБ зачастую не имеют специфичности. При этом более чем у 50 % пациентов определяется IV стадия заболевания. Общая выживаемость больных с НБ значительно различается в зависимости от стадии процесса и группы риска. Так, у пациентов с IV стадией общая выживаемость составляет лишь около 20 %. Современное лечение пациентов с НБ основано на дифференцированных подходах к терапии в зависимости от группы риска [1, 2].

Стратификация пациентов на группы риска включает оценку клинических и молекулярно-биологических данных. Степень злокачественности НБ устанавливается при генетических исследованиях на выявление мутаций *MYCN*, делеций хромосом 1p или 11q. Наличие данных мутаций – неблагоприятный фактор прогноза заболевания. Перед началом специфической терапии всегда проводится верификация диагноза; диагноз НБ ставится при гистологическом исследовании биоптата первичной опухоли или метастазов. Кроме того, в последнее десятилетие актуальной проблемой становится определение микрометастазов или же минимальной остаточной болезни (МОБ), которые представляют собой единичные опухолевые клетки или кластеры, включающие не более 9–10 клеток. Согласно Международной системе стадирования нейробластомы (International

Neuroblastoma Staging System, INSS), цитологическое заключение по клеточному составу костного мозга (КМ) остается стандартным методом выявления диссеминированных клеток НБ [3]. Однако чувствительность этого подхода ограничена, поскольку количество опухолевых клеток менее чем 1 на 100 нормальных практически не выявляется при обычной цитологии с использованием световой микроскопии.

С внедрением в практику новых, более чувствительных методов неоднократно предпринимались попытки создания наиболее точных протоколов выявления опухолевых клеток НБ. В 2005 г. разработанный ранее чувствительный и воспроизводимый иммуноцитохимический тест на наличие GD2-антигена с морфологическими и иммуноцитологическими критериями был усовершенствован путем применения оценки генетического профиля с помощью анализа методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) и стандартизации методов окраски и критериев оценки [4].

В 2009 г. Международная группа по оценке риска, ассоциированного с нейробластомой (International Neuroblastoma Risk Group, INRG), опубликовала отчет о разработке рекомендаций по диагностике минимального количества опухолевых клеток НБ в образцах КМ и периферической крови [5]. В работе были детально рассмотрены такие современные методы, как иммуноцитохимия, флуоресцентная окраска FISH, проточная цитометрия (ПЦ), методы качественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (обратно-транскриптазная ПЦР, reverse transcription

polymerase chain reaction, RT-PCR) и количественной ПЦР (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, QRT-PCR) для оценки мРНК, которые могут быть использованы в качестве инструментов диагностики минимальной болезни (МБ). При постановке диагноза, на этапах терапии, в особенности перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, перед лечением МОБ и в конце лечения рекомендуется проводить анализ образцов КМ и периферической крови для обнаружения минимального количества опухолевых клеток. В рутинной практике выявление опухолевых клеток в КМ на начальной стадии основывается на результатах цитологического исследования морфологии клеток [3, 5]. Тем не менее авторы настоятельно рекомендуют, чтобы образцы КМ и периферической крови, взятые для постановки диагноза, были также проанализированы с помощью иммуноцитохимии и QRT-PCR для получения исходной информации об экспрессии специфического антигена или мРНК, а также для изучения потенциальной клинической значимости МБ у тех детей, у которых традиционными методами не определяется метастатический процесс. Комбинация методов может дать не только прогноз клинической значимости МБ, но и дополнительную биологически значимую информацию. Например, для определения того, является ли гетерогенность опухоли значимой при мониторинге МОБ, следует использовать несколько независимых методов, например иммуноцитохимию и QRT-PCR, или анализ образцов с использованием нескольких антител, или амплификацию для нескольких целевых мРНК.

В 2017 г. группой специалистов был выработан консенсус по пересмотру критериев оценки ответа на лечение детей с НБ с учетом современных методов визуализации и количественной оценки поражения КМ [6]. Известно, что КМ — наиболее распространенная локализация метастатического поражения, как при постановке диагноза, так и при возникновении рецидива у пациентов с НБ. Кроме того, после проведенной терапии МОБ часто обнаруживается в КМ.

Таким образом, для определения минимального количества диссеминированных опухолевых клеток требуется высокая чувствительность и точная количественная оценка, которая может быть достигнута с помощью современных аналитических методов.

Иммуноцитохимия с флуорохромами

Дизиагоглиозид GD2, преимущественно экспрессирующийся равномерно на поверхности злокачественных клеток НБ и большинства типов меланомы [7], но не на нормальных гемопоэтических клетках [8], считается специфическим маркером для обнаружения МБ и МОБ с помощью иммуноцитохимии и ПЦ [9–11]. Метод иммуноцитохимии

является относительно недорогостоящим, однако он не позволяет проводить многопараметрический анализ. Это ограничение преодолевается путем применения метода иммуноцитохимии с использованием флуорохромов, представляющих собой небольшие химически инертные молекулы, в качестве маркеров для многопараметрического анализа, что повышает специфичность иммуноцитологического анализа. Так, меченные разными флуорохромами антитела против нейробластов и гемопоэтических клеток позволяют дифференцировать опухолевые клетки с помощью флуоресцентного микроскопа. Однако при использовании флуорохромов невозможно определить цитоморфологические особенности.

В отличие от стандартизации, которая была достигнута с помощью иммуноцитохимии [4], цитоморфологические критерии для отличия меченных иммунофлуоресценцией нейробластов от ложноположительных гемопоэтических клеток никогда не определялись и не стандартизировались. Кроме того, флуоресцентным сигналам свойственно быстрое затухание, что не позволяет точно измерить интенсивность и спектр флуоресценции. Такие ограничения затрудняют оценку образцов с флуоресцентной меткой.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Важное значение для определения прогноза заболевания НБ и выбора тактики лечения имеет установление генетических характеристик опухоли, а именно: хромосомных aberrаций, статуса онкогена *MYCN*, делеций локусов 1p36 и 11q, увеличения длинного плеча хромосомы 17. Амплификация гена *MYCN* наблюдается в 20–30 % первичных НБ и коррелирует с клиническим течением НБ и неблагоприятным прогнозом, являясь наиболее критичным прогностическим маркером. Метод FISH в настоящее время считается «золотым стандартом» для оценки статуса гена *MYCN* при НБ.

Анализ методом FISH позволяет относительно быстро определять гетерогенность амплификации гена *MYCN* в отдельных нейробластах. В клинических образцах НБ метод интерфазной реакции FISH позволяет выявить амплификацию гена *MYCN* даже при небольшом содержании опухолевых клеток [12].

Несмотря на видимые преимущества, анализ FISH является субъективной оценкой полученных изображений, требует дорогостоящего технического оснащения и сложных манипуляций. Многим диагностическим лабораториям не хватает ни опыта, ни средств для проведения данного теста. Даже в идеальных условиях результаты часто трудно интерпретировать, так как это требует тщательного изучения большого количества отдельных клеток высококвалифицированным специалистом. Кроме того, исследования

показали, что, несмотря на свою высокую специфичность, FISH-анализ имеет низкую чувствительность — 58 % [13–15]. Ограничения этого метода требуют изучения возможностей менее технически сложных, недорогих альтернативных подходов с реализацией мультиплексного анализа.

Проточная цитометрия

Широко применяемый в диагностических целях метод ПЦ обладает теми же преимуществами, что и иммуноцитохимия с использованием флуорохромов. Одновременное применение меченных разными флуоресцентными красителями антител против различных субпопуляций опухолевых и нормальных клеток позволяет достичь высокой специфичности анализа. К другим его преимуществам относится быстрая обработка исследуемых образцов — результаты можно получить в течение нескольких часов. Искомая субпопуляция определяется кластером от 10–20 событий (клеток) на точечном графике (Dot plot), при этом результат не зависит от опыта специалиста в цитоморфологии, иммунологии или цитогенетике. Многочисленные исследования по оценке МОБ или микрометастазов при различных онкологических заболеваниях показали эффективность ПЦ, которая позволяет выявлять 1 опухолевую клетку из 10^4 нормальных клеток ($1/10^4$) [16].

В течение многих лет проводились исследования по оценке чувствительности и специфичности ПЦ для мониторинга МОБ при гемобластозах, раке молочной железы, а также при множественной миеломе, в которых была показана практическая значимость оценки МОБ с помощью многопараметрового цитометрического анализа для дальнейшей тактики лечения и прогноза заболевания [17–19].

Для некоторых заболеваний (например, острого лимфобластного лейкоза) метод ПЦ стандартизован как в отношении параметров (4 и более параметра), так и по временным точкам мониторинга МОБ [17, 20, 21].

Полимеразная цепная реакция

Применение метода RT-PCR для амплификации опухоль-специфичной/-ассоциированной мРНК показало его высокую чувствительность и специфичность, позволяя выявить 1 опухолевую клетку из 1×10^6 нормальных. Следует отметить, что, как и при других методах определения опухолевых клеток, выявление опухоль-специфичной/-ассоциированной мРНК свидетельствует о наличии диссеминированных опухолевых клеток, обладающих метастатическим потенциалом [22–24]. Проблема применения данного метода в реальной клинической практике связана с необходимостью выбора специфического генетического нарушения, связанного с опухолью; чаще

можно определять лишь опухоль-ассоциированные нарушения. Одна из основных задач при использовании RT-PCR — идентификация соответствующих целевых мРНК для определения МБ.

Для выявления клеток НБ с помощью RT-PCR предлагаются разные мишени, но в настоящее время единственная признанная мишень — мРНК тирозингидроксилазы, позволяющая идентифицировать 1 клетку НБ в 10^4 – 10^6 нормальных клеток [25, 26]. Однако до сих пор остается неясной клиническая эффективность этого подхода ввиду небольшой выборки, отсутствия контроля качества в исследованиях и единообразия при сборе материала, обработке результатов и их представлении. Преимущество QRT-PCR перед более традиционной качественной RT-PCR состоит в том, что она позволяет точно и количественно определить 1 или несколько мРНК в клинических образцах. Тем не менее определение тирозингидроксилазы в клинике для выявления клеток НБ не позволяет утвердить этот метод для рутинной практики, поскольку наличие экспрессии тирозингидроксилазы в нормальных тканях ограничивает чувствительность этого метода и требует уточняющих процедур для верификации диагноза.

Проточная цитометрия vs иммуноцитохимия vs количественная полимеразная цепная реакция

Поскольку стандартная цитологическая оценка аспиратов КМ является довольно субъективным методом, зависящим от опыта и профессиональной подготовки специалиста, а также обладает относительной чувствительностью (возможно обнаружение 1 опухолевой клетки из 100 нормальных), для выявления МОБ НБ уже более 2 десятилетий ведутся сравнительные исследования чувствительности других диагностических методов, изучается специфичность разных мишеней для оценки МОБ, разрабатываются новые диагностические подходы.

При многопараметровой ПЦ оценивают одновременно несколько маркеров, конъюгированных с различными флуорохромами. Например, J. Nagai и соавт. предложили комбинацию моноклональных антител CD9/CD81/CD56/CD45 для обнаружения циркулирующих клеток НБ [27]. CD9 является маркером, связывающимся с трансмембранным белком с молекулярной массой 24 кДа, который экспрессируется на тромбоцитах, предшественниках В-клеток, активированных и дифференцирующихся В-клетках, активированных Т-клетках, эозинофилах, базофилах, моноцитах, эндотелиальных и эпителиальных клетках и некоторых других типах клеток, при этом антиген CD9 определяется на клетках НБ.

Ранее было показано, что на опухолевых клетках НБ экспрессируется CD81 — маркер трансмембранного

белка с молекулярной массой 26 кДа (ТАРА-1), который участвует в процессах клеточного роста и сигнальной трансдукции. Кроме того, этот маркер экспрессируется на гемопоэтических клетках, а также на эндотелиальных и эпителиальных клетках. Хорошо изучена экспрессия маркера CD56, который также был обнаружен на поверхности клеток НБ. Моноклональные антитела CD56 связываются с гликозилированными изоформами антигена с молекулярной массой 175/220 кДа, который присутствует на поверхности больших гранулярных лимфоцитов, проявляющих киллерную активность, — натуральных киллерных клеток, отдельных субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток. При этом CD45 является маркером общего антигена лейкоцитов, который экспрессирован на всех лейкоцитарных клетках человека, включая лимфоциты, моноциты, гранулоциты, эозинофилы и тимоциты. Однако для специфической диагностики важно, что CD45 не обнаружен на клетках НБ [27].

M.J. Warzynski и соавт. оценивали несколько различных комбинаций маркеров [10]: CD45, CD56, CD81, моноклональные антитела против нейронспецифической энолазы (NSE) и против дизиалоганглиозида GD2. Было обнаружено, что дизиалоганглиозид GD2 экспрессируется на поверхности практически всех клеток НБ, при этом GD2 имеет очень высокую плотность экспрессии ($5-10 \times 10^6$ молекул/клетку). Помимо НБ, GD2 обнаруживается также на клетках других опухолей нейроэктодермального происхождения, таких как меланома, мелкоклеточный рак легкого, глиома. При этом GD2 не определялся на нормальных клетках КМ и периферической крови.

В сравнительном исследовании K. Swerts и соавт. [11] по обнаружению минимального остаточного количества клеток НБ определяли экспрессию различных комбинаций маркеров CD9, CD81, CD56, CD45 методом ПЦ и выявляли специфический маркер НБ GD2 с помощью иммуноцитохимии. Чувствительность ПЦ оценивали в модельных экспериментах с использованием различных соотношений нормальных и опухолевых клеток. Авторы обнаружили высокую степень корреляции результатов выявления клеток НБ обоими методами ($\chi^2 = 6,4$; $p = 0,011$). Несмотря на то что при анализе одинакового количества клеток ПЦ оказалась в 10 раз менее чувствительной, чем иммуноцитохимия, авторы считают ПЦ достаточно чувствительным методом для скрининга клинического материала с возможностью обнаружения 1 опухолевой клетки из 10^4-10^5 нормальных мононуклеарных клеток. Кроме того, ПЦ, являясь простым, быстрым и относительно недорогим методом, позволяет выявить остаточные опухолевые клетки в GD2-негативных образцах первичной опухоли.

В своей работе R. Esser и соавт. [28] изучали возможность применения ПЦ, чтобы восполнить ограничения диагностики НБ методом ПЦР, поскольку определение тирозингидроксилазы может давать ложноположительные результаты, так как этот маркер определяется также в нормальных тканях. Было проанализировано 857 образцов опухолевой ткани, аспирата КМ, стволовых клеток периферической крови, полученных от 65 пациентов с НБ методом традиционной RT-PCR, и 666 образцов — методом QRT-PCR. Помимо материала, полученного от пациентов с НБ, было проанализировано 84 образца от пациентов с другими заболеваниями и 354 образца от здоровых доноров в качестве контроля. Для сравнения точности получаемых результатов было проанализировано 132 образца методом многопараметровой ПЦ для выявления клеток НБ. Статистический анализ с помощью коэффициента каппа Коэна показал достаточно высокую степень корреляции результатов, полученных традиционной RT-PCR и QRT-PCR, RT-PCR и ПЦ, и среднюю степень корреляции между QRT-PCR и ПЦ. При этом ПЦР выявила экспрессию тирозингидроксилазы в исследуемых образцах от некоторых пациентов с саркомой Юинга, нефробластомой и рабдомиосаркомой, но в образцах материала здоровых доноров экспрессия тирозингидроксилазы не обнаружена. Фенотип клеток НБ оценивали как CD45⁻/CD9⁺/CD81⁺/CD56⁺/ch14:18⁺/GD2⁺, при этом точность детекции ПЦ достигала 0,002 % клеток НБ. В результате тщательного обсуждения полученных данных авторы пришли к заключению, что для выявления клеток НБ одного метода RT-PCR недостаточно, так как ложноположительные результаты, полученные в образцах материала от пациентов с другими заболеваниями, накладывают определенные ограничения на применение одного только этого метода. В данном случае дополнительным методом, позволяющим выявить остаточное количество клеток НБ, была ПЦ.

K.S. Tsang и соавт. [29], проводя сравнительное исследование по диагностике НБ в аспиратах КМ, костномозговых аутотрансплантатах и стволовых клетках периферической крови 27 детей, применяли многопараметровую цитометрию для выявления клеток с фенотипом CD45⁻/CD56⁺/CD81⁺ и RT-PCR для детекции тирозингидроксилазы. Авторы считают, что наличие опухолевого поражения КМ можно успешно определять с помощью полуколичественной RT-PCR, однако этот метод требует строгой стандартизации, калибровки и валидации. Применение ПЦ с моноклональными антителами CD45-FITC/CD81-PE/CD56-PECy5 позволило авторам автоматизировать количественную оценку клеток НБ в большом пуле гетерогенных клеток, рекомендуя данный метод в качестве простого, быстрого и воспроизводимого исследования

для выявления микрометастазов и скрытой диссеминации опухолевых клеток. Комбинация качественной RT-PCR по выявлению тирозингидроксилазы и QRT-PCR рассматривается в качестве эффективного подхода для оценки регрессии опухоли и мониторинга МОБ пациентов с НБ во время лечения.

Заключение

Таким образом, учитывая значимость задачи обнаружения минимального количества злокачественных кле-

ток НБ, которые не всегда можно выявить с помощью стандартных морфологических исследований крови и КМ, наряду с применением RT-PCR, ПЦ, FISH ведется поиск более чувствительных современных методов диагностики, а также оптимизация существующих методик. Несмотря на то что каждый из оцениваемых методов имеет свои преимущества, авторы акцентируют внимание на том, что именно многопараметровая ПЦ позволяет быстро и надежно определять единичные опухолевые клетки или микрометастазы НБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Maris J.M., Hogarty M.D., Bagatell R., Cohn S.L. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369(9579):2106–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60983-0.
2. Matthay K.K., Maris J.M., Schleiermacher G. et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16078. DOI: 10.1038/nrdp.2016.78.
3. Monclair T., Brodeur G.M., Ambros P.F. et al. INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):298–303. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6876.
4. Swerts K., Ambros P.F., Brouzes C. et al. Standardization of the Immunocytochemical Detection of Neuroblastoma Cells in Bone Marrow. *J Histochem Cytochem* 2005;53(12):1433–40. DOI: 10.1369/jhc.5C6661.2005.
5. Beiske K., Burchill S.A., Cheung I.Y. et al. Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer* 2009;100(10):1627–37. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605029.
6. Park J.R., Bagatell R., Cohn S.L. et al. Revisions to the International Neuroblastoma Response Criteria: A Consensus Statement From the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *J Clin Oncol* 2017;35(22):2580–7. DOI: 10.1200/JCO.2016.72.0177.
7. Wu Z., Schwartz E., Seeger R.C., Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res* 1986;46(1):440–3.
8. Cheung N.K., Van Hoff D.D., Strandjord S.E., Coccia P.F. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 1986;4:363–9.
9. Popov A., Druy A., Shorikov E. et al. Prognostic value of initial bone marrow disease detection by multiparameter flow cytometry in children with neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145(2):535–42. DOI: 10.1007/s00432-018-02831-w.
10. Warzynski M.J., Graham D.M., Axtell R.A. et al. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients. *Cytometry* 2002;50(6):298–304. DOI: 10.1002/cyto.10159.
11. Swerts K., De Moerloose B.D., Dhooze C. et al. Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;61(1):9–19. DOI: 10.1002/cyto.b.20019.
12. Строганова А.М., Карсладзе А.И. Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(1):32–43. [Stroganova A.M., Karseladze A.I. Neuroblastoma: morphological pattern, molecular genetic features, and prognostic factors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(1):32–43. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.132-43.
13. Somasundaram D.B., Aravindan S., Yu Z. et al. Droplet digital PCR as an alternative to FISH for MYCN amplification detection in human neuroblastoma FFPE samples. *BMC Cancer* 2019;19(1):106. DOI: 10.1186/s12885-019-5306-0.
14. Mandelia A., Agarwala S., Sharma A. et al. Assessment of fine needle aspiration cytology samples for molecular genetic analysis in neuroblastoma. *Pediatr Surg Int* 2013;29(11):1131–8. DOI: 10.1007/s00383-013-3370-0.
15. Villamyn E., Piqueras M., Mackintosh C. et al. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch* 2008;453(1):47–55. DOI: 10.1007/s00428-008-0633-6.
16. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52–8. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0006.
17. Гривцова Л.Ю., Лунин В.В., Семенова А.А. и др. Минимальная остаточная болезнь при плазмноклеточной (множественной) миеломе: проточно-цитометрические подходы. *Онкогематология* 2020;15(1):40–50. [Grivtsova L.Yu., Lunin V.V., Semenova A.A. et al. Minimal residual disease in plasma cell(multiple) myeloma: flow cytometric approaches. *Onkogematologia = Oncohematology* 2020;15(1):40–50. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-1-40-50.
18. Кузнецов С.А., Шубина И.Ж., Мамедова Л.Т. и др. Методы идентификации микрометастазов при злокачественных новообразованиях. *Онкогематология* 2016;11(1):75–9. [Kuznetsov S.A., Shubina I.Zh., Mamedova L.T. et al. Micrometastases identification in malignant tumors. *Onkogematologia = Oncohematology* 2016;11(1):75–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-75-79.
19. Rawstron A.C., Child J.A., de Tute R.M. et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013;31(20):2540–7. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.2119.
20. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Иммунологическая оценка гемодилюции костного мозга при лабораторных исследованиях (на основании теста М. Локен). *Медицинский алфавит* 2015;4(18):67–70. [Grivtsova L.Yu., Tupitsyn N.N. Immunological evaluation of bone marrow hemodilution in laboratory studies (based on the test M. Loken). *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet* 2015;4(18):67–70. (In Russ.)].

21. Rawstron A.C., Böttcher S., Letestu R. et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* 2013;27(1):142–9. DOI: 10.1038/leu.2012.216.
22. Taback B., Hoon D.S.B. Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum: clinical utility. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:1–8. DOI: 10.1196/annals.1318.002.
23. Zeerleder S. The struggle to detect circulating DNA. *Crit Care* 2006;10(3):142. DOI: 10.1186/cc4932.
24. O'Driscoll L. Extracellular nucleic acids and their potential as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. *Anticancer Res* 2007;27(3A):1257–65. PMID: 17593617.
25. Ootsuka S., Asami S., Sasaki T. et al. Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull* 2008;31(6):1071–4. DOI: 10.1248/bpb.31.1071.
26. Träger C., Vernby A., Kullman A. et al. mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* 2008;123(12):2849–55. DOI: 10.1002/ijc.23846.
27. Nagai J., Ishida Y., Koga N. et al. A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma cells in peripheral blood using flow cytometry. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22(1):20–6. DOI: 10.1097/00043426-200001000-00004.
28. Esser R., Glienke W., Bochennek K. et al. Detection of neuroblastoma cells during clinical follow up: advanced flow cytometry and rt-PCR for tyrosine hydroxylase using both conventional and real-time PCR. *Klin Padiatr* 2011;223(6):326–31. DOI: 10.1055/s-0031-1287842.
29. Tsang K.S., Li C.K., Tsoi W.C. et al. Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 2003;97(11):2887–97. DOI: 10.1002/cncr.11389.

Вклад авторов

И.Ж. Шубина: концепция статьи, сбор и интерпретация данных, написание текста рукописи, подготовка статьи;

Н.А. Бурлака: сбор, анализ данных и подготовка текста статьи;

А.П. Казанцев: анализ и интерпретация данных;

Ю.И. Должикова, А.А. Петкевич: сбор данных и подготовка текста статьи;

К.И. Киргизов: анализ и интерпретация данных, внесение принципиальных дополнений;

М.В. Киселевский: дизайн статьи, анализ и интерпретация данных, внесение принципиальных дополнений.

Author contribution

I.Zh. Shubina: concept of the article, data collection and interpretation, writing the text of the manuscript, preparation of the article;

N.A. Burlaka: collection, analysis of the data and text preparation;

A.P. Kazantsev: data analysis and interpretation;

Yu.I. Dolzhikova, A.A. Petkevich: data collection and text preparation;

K.I. Kirgizov: analysis and interpretation of the data, text preparation;

M.V. Kiselevskiy: article design, data analysis and interpretation, final revision.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <http://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

Н.А. Бурлака / N.A. Burlaka: <https://orcid.org/0000-0002-3289-223X>

А.П. Казанцев / A.P. Kazantsev: <https://orcid.org/0000-0001-7309-1650>

Ю.И. Должикова / Yu.I. Dolzhikova: <http://orcid.org/0000-0003-2138-7323>

А.А. Петкевич / A.A. Petkevich: <http://orcid.org/0000-0001-7722-9821>

К.И. Киргизов / K.I. Kirgizov: <https://orcid.org/0000-0002-2945-284X>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <http://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 08.08.2021. Принята к публикации: 27.08.2021.

Article submitted: 08.08.2021. Accepted for publication: 27.08.2021.