

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА

BONE MARROW TRANSPLANTATION

Результаты молекулярного мониторинга в посттрансплантационный период с помощью серийного исследования уровня экспрессии гена *WT1* у больных острыми миелоидными лейкозами

Results of Molecular Monitoring in Posttransplant Period by Means of Series Investigation of *WT1* Gene Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia

Я.В. Гудожникова, Н.Н. Мамаев, И.М. Бархатов, В.А. Катерина, Т.Л. Гиндина, А.И. Шакирова, С.Н. Бондаренко, О.А. Слесарчук, Е.И. Дарская, О.В. Паина, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев

YaV Gudozhnikova, NN Mamaev, IM Barkhatov, VA Katerina, TL Gindina, AI Shakirova, SN Bondarenko, OA Slesarchuk, EI Darskaya, OV Paina, LS Zubarovskaya, BV Afanas'ev

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Цель. Показать значение серийного измерения уровня экспрессии гена *WT1* у больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ), которым выполнена трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Aim. To demonstrate diagnostic and prognostic significance of series measurement of *WT1* expression in patients with acute myeloid leukemia (AML) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).

Материалы и методы. В исследование включено 88 больных ОМЛ в возрасте 2–68 лет (медиана 30 лет). Лиц женского пола было 38 (43 %), мужского — 50 (57 %). Всем пациентам проведена аллоТГСК. Аспираты костного мозга забирались до ТГСК (D0) и после нее (D+30, D+60 и D+100).

Materials & Methods. The clinical trial included 88 AML patients (38 females (43 %) and 50 males (57 %) aged 2–68, median 30 years). All the patients received allo-HSCT. Bone marrow was aspirated before (D0) and after HSCT (D+30, D+60, and D+100).

Результаты. По результатам однофакторного анализа выявлены статистически значимые различия 2-летней общей выживаемости в группах с наличием или отсутствием ремиссии на момент ТГСК ($p < 0,001$) и хронической реакции «трансплантат против хозяина» (хРТПХ) ($p = 0,002$), а также с первичным или вторичным (из МДС) ОМЛ ($p = 0,028$), уровнем экспрессии гена *WT1* $<$ и $>$ 250 копий до ТГСК ($p < 0,001$) во временных точках D+60 ($p = 0,012$) и D+100 ($p < 0,001$). При многофакторном анализе статистическая значимость различий сохранилась у больных с ТГСК, выполненной в ремиссии ($p = 0,041$), и с наличием хРТПХ ($p = 0,03$). По данным однофакторного анализа, статистически значимые различия 2-летней бессобытийной выживаемости (БСВ) были выявлены: а) у больных с аллоТГСК в ремиссии или без таковой ($p < 0,001$); б) при использовании в качестве источника трансплантата ГСК крови, а не костного мозга ($p < 0,026$); в) при нормальном или повышенном уровне экспрессии гена *WT1* на этапе ТГСК ($p < 0,001$) и в контрольной точке D+100 ($p < 0,001$); г) при использовании ГСК от родственного или неродственного донора ($p = 0,006$); д) у больных с хРТПХ ($p = 0,05$). При многофакторном анализе независимое положительное влияние на БСВ сохранилось только у больных с нормальной экспрессией гена *WT1* в D+100

Results. The univariate analysis showed statistically significant differences in 2-year overall survival with respect to the following factors: with and without remission at the moment of HSCT ($p < 0.001$), with and without chronic graft vs. host disease (cGVHD) ($p = 0.002$), primary or secondary (MDS) AML ($p = 0.028$), *WT1* gene expression $<$ and $>$ 250 copies before HSCT ($p < 0.001$) and at time points D+60 ($p = 0.012$), and D+100 ($p < 0.001$). Multivariate analysis revealed similar statistical significance of differences among patients transplanted in remission ($p = 0.041$) and with cGVHD ($p = 0.03$). In univariate analysis statistically significant differences in 2-year event-free survival (EFS) were found: a) in patients with allo-HSCT, either in remission or not ($p < 0.001$); b) using HSC, but not bone marrow, as transplant source ($p < 0.026$); c) with normal or high *WT1* expression at the stage of HSCT ($p < 0.001$) and at time point D+100 ($p < 0.001$); d) using HSC from related or unrelated donor ($p = 0.006$); e) in patients with cGVHD ($p = 0.05$). In multivariate analysis independent positive effect on EFS was observed only in patients with normal *WT1* expression at D+100 ($p = 0.011$) and with cGVHD ($p = 0.038$). Cumulative incidence of posttransplant relapse (PTR) in AML patients with normal or high *WT1* expression at the stage of HSCT within the 2-year follow-up was significantly different (28.2 vs. 58.9 %; $p = 0.002$), also in measurements of this parameter at D+60 and D+100 ($p = 0.015$ and $p < 0.001$, respectively). In 1/4 of patients cytological re-

($p = 0,011$) и при наличии хРТПХ ($p = 0,038$). Кумулятивная частота посттрансплантационных рецидивов (ПТР) у больных ОМЛ, имевших к моменту ТГСК нормальный или повышенный уровень экспрессии гена *WT1* за 2-летний период наблюдения, статистически значимо различалась (28,2 vs 58,9 %; $p = 0,002$), в т. ч. при измерении этого параметра в Д+60 и Д+100 ($p = 0,015$ и $p < 0,001$ соответственно). У $\frac{1}{4}$ пациентов цитологические рецидивы (цПТР) существенно отставали от молекулярных (мПТР) (на 13–489 дней, медиана 35 дней), что объясняется рано начатой превентивной терапией, направленной на предупреждение цПТР в условиях уже документированного мПТР. По нашим данным, ведущую роль в сдерживании цПТР призвана играть РТПХ.

Заключение. Феномен нормализации уровня экспрессии гена *WT1* после аллоТГСК у больных ОМЛ имеет важное диагностическое и прогностическое значение. Внедрение такого подхода в практику работы онкогематологических центров страны следует признать целесообразным.

Ключевые слова: острые миелоидные лейкозы, аллоТГСК, посттрансплантационные рецидивы, диагностика и лечение в условиях молекулярного мониторинга *WT1*, реакция «трансплантат против хозяина».

Получено: 20 января 2018 г.

Принято в печать: 18 апреля 2018 г.

Для переписки: Николай Николаевич Мамаев, д-р мед. наук, профессор, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; тел.: +7(812)233-12-43; e-mail: nikmamaev524@gmail.com

Для цитирования: Гудожникова Я.В., Мамаев Н.Н., Бархатов И.М. и др. Результаты молекулярного мониторинга в посттрансплантационный период с помощью серийного исследования уровня экспрессии гена *WT1* у больных острыми миелоидными лейкозами. Клиническая онкогематология. 2018;11(3):241–51.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-3-241-251

lapses (cPTR) appeared considerably later than molecular relapses (mPTR), i.e. 13–489 days later (median 35 days), which is accounted for by early preventive therapy aimed at cPTR prophylaxis against the background of already recorded mPTR. According to our data, GVHD plays a crucial role in cPTR management.

Conclusion. Phenomenon of *WT1* expression normalization after allo-HSCT in AML patients proves to have a high diagnostic and prognostic significance. Introduction of this approach into clinical practice seems highly advisable for national oncohematological centers.

Keywords: acute myeloid leukemia, allo-HSCT, post-transplant relapse, diagnostics and treatment with molecular monitoring of *WT1* expression, graft vs. host disease.

Received: January 20, 2018

Accepted: April 18, 2018

For correspondence: Prof. Nikolai Nikolaevich Mamaev, MD, PhD, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022; Tel.: +7(812)233-12-43; e-mail: nikmamaev524@gmail.com

For citation: Gudozhnikova YaV, Mamaev NN, Barkhatov IM, et al. Results of Molecular Monitoring in Posttransplant Period by Means of Series Investigation of *WT1* Gene Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia. Clinical oncohematology. 2018;11(3):241–51.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-3-241-251

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярное мониторирование, направленное на оценку эффективности терапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), можно по праву считать одним из важных достижений современной онкогематологии [1–6]. До последнего времени с этой целью чаще использовали так называемые специфические сливные маркеры, в частности *AML/ETO*, *CBFB/MYH*, *PML/RAR* и некоторые другие, наличие которых в патологических элементах обнаруживается только у половины больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ). Важным подспорьем в решении этой проблемы стало открытие ряда неспецифических, свойственных многим видам лейкозов и опухолей молекулярных маркеров. Одним из них является ген *WT1*, который был открыт в клетках опухоли почек Вильмса [7, 8], откуда и получил свое необычное название. Как оказалось, этот ген имеет непосредственное отношение к пролиферации и дифференцировке клеток мочеполовой системы. Вместе с тем вскоре было выявлено, что гиперэкспрессия гена *WT1*, локализо-

ванного на коротком плече хромосомы 11, характерна также для острых лейкозов, миелодиспластических синдромов (МДС) и многих солидных опухолей [9–11]. Далее было установлено, что гиперэкспрессия гена *WT1* встречается у 90–95 % больных ОМЛ и МДС [6], а уровень его экспрессии сопряжен с таковым у отмеченных выше специфических, в т. ч. сливных, генов [4, 5, 12]. Помимо этого было показано, что уровень экспрессии гена *WT1* коррелирует с содержанием бластных элементов в тестируемых тканях [5, 12, 13]. Все это и предопределило активное использование результатов исследования экспрессии данного гена в практической гематологии для решения важных задач. К настоящему времени определение уровня экспрессии гена *WT1* применяется для: а) ранней диагностики рецидивов заболевания [14], в т. ч. посттрансплантационных (ПТР) [5, 6, 15–21]; б) определения уровня минимальной остаточной болезни [1, 2, 5, 18–21]; в) оценки эффективности проводимой терапии [14]; г) активного прогнозирования исхода заболевания [4, 6, 22–25].

В ходе проведенных исследований стало ясно, что уровень экспрессии гена *WT1* мало зависит от цито-

химического варианта и цитогенетических особенностей ОМЛ [6], а прогностическая значимость его не так велика. В то же время высокая экспрессия этого гена перед выполнением трансплантации или на различных этапах посттрансплантационного периода неизменно указывала на развитие рецидивов лейкоза и, как правило, была связана с плохим прогнозом [4].

Как показывает анализ литературы, предпочтительными временными точками для взятия проб костного мозга при проведении молекулярного мониторинга являются Д0 (день до трансплантации) и Д+30, Д+60, Д+90 или Д+100 и Д+200 после ее выполнения. При этом наиболее информативными в плане общего прогноза и риска развития рецидивов рассматривались временные точки Д0 и Д+100 [17], а менее информативной оказалась контрольная точка Д+30. Что касается последних данных, то при благоприятном течении посттрансплантационного периода нормализация уровня экспрессии гена *WT1* может иметь место во всех перечисленных точках. Это, естественно, находит свое отражение как в улучшении показателей общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ), так и в снижении кумулятивной частоты посттрансплантационных рецидивов (кчПТР). Напротив, если нормализации уровня экспрессии гена *WT1* к моменту трансплантации или в указанные временные точки после ее выполнения достичь не удавалось, это приводило к ухудшению параметров ОВ, БСВ и к увеличению кчПТР [3, 17, 23, 24]. По данным литературы и нашим собственным представлениям, ПТР могут быть молекулярными (мПТР) или цитологическими (цПТР). При этом диагностика цПТР может существенно отставать во времени от мПТР (*WT1*-эквивалента, доказанного с помощью полимеразной цепной реакции [ПЦР]) [1–3, 17, 24], что при ведении таких больных в клинике нельзя игнорировать.

Наши первые работы по молекулярному мониторингу посттрансплантационного периода у больных ОМЛ и МДС показали следующее. Во-первых, надпороговый уровень экспрессии гена *WT1* является независимым предиктором наличия у больного мПТР и реально ожидаемого цПТР [5, 6]. Во-вторых, уровень экспрессии гена *WT1* отчетливо коррелирует с таковым у ряда специфических сливных генов, но чуть хуже по сравнению с *EVII*. В-третьих, с помощью такого молекулярного подхода открывается реальная основа для оценки эффективности проводимой терапии ОМЛ и МДС, в т. ч. в условиях аллотГСК.

Настоящее исследование с включением большого числа больных ОМЛ, которым выполнена аллотГСК в условиях одного института, было направлено на анализ и обсуждение всех обозначенных выше важных в теоретическом и практическом отношении положений и вопросов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включает 88 больных с первичными ($n = 74$) и вторичными из МДС ($n = 14$) вариантами ОМЛ, которым аллотГСК выполнена в НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой в период с 2011 по 2016 г. Из 88 больных 16 (18 %) были детьми в возрасте 2–14 лет,

Таблица 1. Основные клинические и лабораторные показатели больных острыми миелоидными лейкозами, которым выполнена аллотГСК ($n = 88$)

Показатель	Число больных, n (%)
Возраст, лет	
< 14	16 (18)
14–21	18 (21)
> 21	54 (61)
Пол	
Мужской	50 (57)
Женский	38 (43)
Диагноз	
ОМЛ <i>de novo</i>	74 (84)
Вторичные ОМЛ	14 (16)
Кариотип в дебюте заболевания	
Благоприятный	10 (11)
Промежуточный	51 (58)
Неблагоприятный	19 (22)
Неизвестно	8 (9)
Статус заболевания	
Ремиссия	60 (68)
Нет ремиссии	28 (32)
Содержание бластных клеток в КМ	
< 5 %	60 (68)
5–30 %	17 (19)
> 30 %	11 (13)
Специфический молекулярный маркер	
Есть	42 (48)
Нет	46 (52)
Медиана (диапазон) времени от диагностики до аллотГСК, дни	268 (103–1321)
Тип донора, HLA-совместимость	
Неродственный, совместимый	39 (44)
Неродственный, частично совместимый	17 (19)
Родственный, совместимый	20 (23)
Родственный, частично совместимый (гаплоидентичный)	12 (14)
Совместимость по полу донора и реципиента	
Совместимые	53 (60)
Несовместимые	35 (40)
ABO-совместимость	
Совместимые	35 (40)
Несовместимые	53 (60)
Источник трансплантата	
КМ	43 (49)
ГСК крови	45 (51)
Режим кондиционирования	
Миелоаблативный	37 (42)
Со сниженной интенсивностью доз	51 (58)
Количество трансплантируемых клеток CD34+, $\times 10^6/\text{кг}$	
< 6	57 (65)
≥ 6	31 (35)

аллотГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; ГСК — гемопоэтические стволовые клетки; КМ — костный мозг; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз.

остальные — взрослые пациенты. Основные клинические и лабораторные характеристики больных представлены в табл. 1.

Серийное исследование уровня экспрессии гена *WT1* было осуществлено на аспиратах костного мозга, взятых до трансплантации (Д0) и в контрольных временных точках Д+30, Д+60 и Д+100 после ее вы-

полнения, и проводилось с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве порога для разграничения наблюдений с нормальным и повышенным уровнями экспрессии *WT1* была выбрана предварительно проверенная на костном мозге здоровых доноров величина 250 копий гена *WT1* на 10^4 копий гена *ABL*. Одновременно в тех же аспиратах костного мозга оценивали содержание бластных элементов и исследовали кариотип. На основании полученных

данных рассчитывали общую (ОВ) и бессобытийную выживаемость (БСВ), определяли кЧПТР, принимали во внимание мПТР и цПТР. Кроме того, изучалась посттрансплантационная летальность. Поскольку у $1/3$ наших больных развитие цПТР существенно отставало по времени от мПТР, эти временные расхождения анализировались дополнительно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

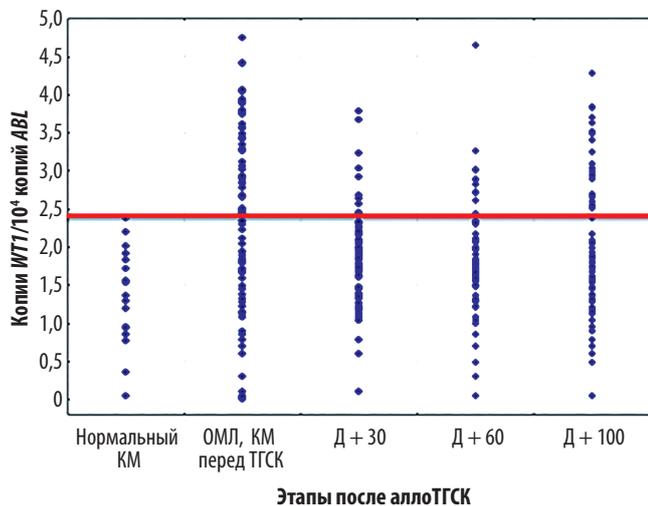


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *WT1* у здоровых доноров и больных ОМЛ до аллотГСК и во временных точках Д+30, Д+60 и Д+100 после нее, позволивший выбрать порог в 250 копий (красная линия), разграничивающий пациентов с нормальным и повышенным уровнями *WT1*

аллотГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; КМ — костный мозг; ОМЛ — острые миелоидные лейкозы.

Fig. 1. *WT1* expression level in healthy donors and AML patients before allo-HSCT and after it at time points D+30, D+60 and D+100 used for defining the cut-off point of 250 copies (red line) to differentiate patients with normal and high *WT1* expression level

аллотГСК — allogenic hematopoietic stem cell transplantation; КМ — bone marrow; ОМЛ — acute myeloid leukemia.

Исходный уровень экспрессии гена *WT1* у больных ОМЛ варьировал от 0 до 56 884 копий/ 10^4 копий гена *ABL* с медианой 253 копии (рис. 1). У половины больных он был нормализован и соответствовал таковому у здоровых доноров еще до аллотГСК. В то же время у другой половины пациентов уровень экспрессии гена *WT1* был выше порогового уровня, что свидетельствовало в пользу отсутствия у них полноценной ремиссии и наличия остаточной болезни разной степени выраженности.

Как видно из данных, представленных на рис. 1 в логарифмической шкале, соотношение больных с нормальным и повышенным уровнями в контрольных точках Д+30, Д+60 и Д+100 было неодинаковым.

Показатели 2-летней ОВ и БСВ во всей когорте включенных в настоящее исследование больных ОМЛ представлены на рис. 2. Как видно, 2-летняя ОВ составила 55,7 %, а 2-летняя БСВ — 46 %.

Общая и бессобытийная выживаемость после аллотГСК

Согласно лог-ранговым критериям (табл. 2, рис. 3), статистически значимые различия 2-летней ОВ и БСВ после аллотГСК были отмечены у больных с наличием или отсутствием ремиссии на момент трансплантации (73,3 vs 17,9 % и 62,7 vs 10,7 %; $p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) либо хронической реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) (77,8 vs 46,7 % и 58,3 vs 42,2 %; $p = 0,002$ и $p = 0,05$ соответственно).

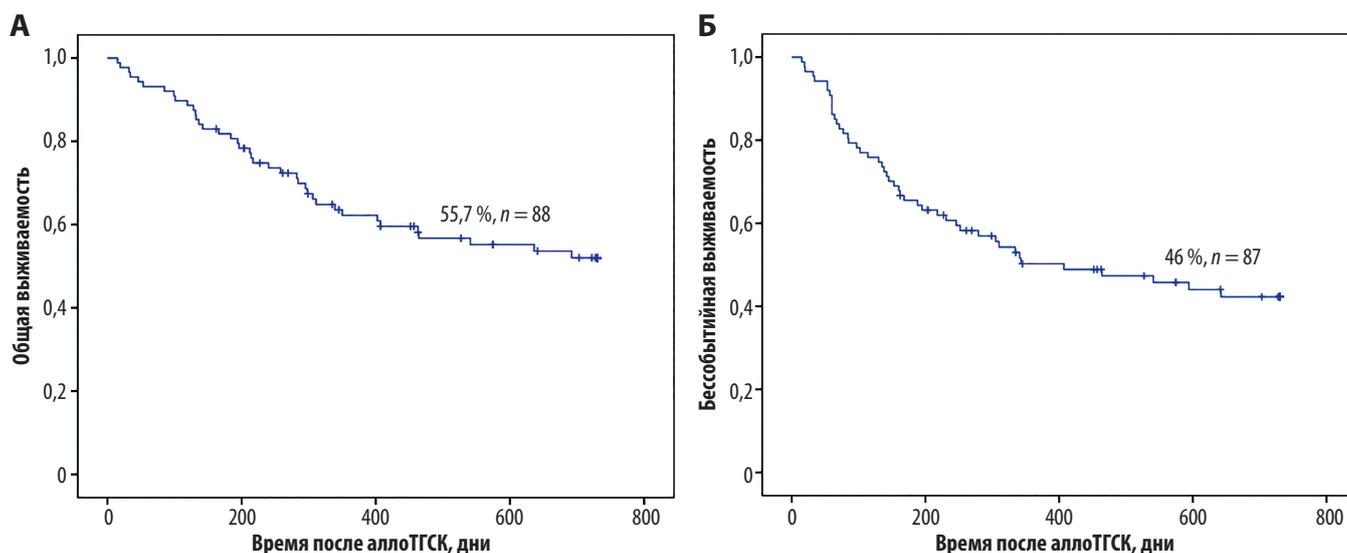


Рис. 2. 2-летняя (А) общая и (Б) бессобытийная выживаемость всей когорты больных ОМЛ, включенных в настоящее исследование и которым выполнена аллотГСК

Fig. 2. 2-year (A) overall and (B) event-free survival of the whole cohort of AML patients within the present trial after allo-HSCT

Таблица 2. Результаты однофакторного анализа предикторов общей и бессобытийной выживаемости

Фактор	ОВ	<i>p</i>	БСВ	<i>p</i>
Возраст (медиана)				
< 30 лет	61,4 %	0,259	43,2 %	0,540
≥ 30 лет	50,0 %		48,8 %	
Пол				
Мужской	56,0 %	0,915	49,0 %	0,516
Женский	55,3 %		42,1 %	
Диагноз				
ОМЛ <i>de novo</i>	59,5 %	0,028	47,9 %	0,290
Вторичный ОМЛ	35,7 %		35,7 %	
Лейкоциты в дебюте заболевания				
< 50 000	50,0 %	0,124	45,9 %	0,905
≥ 50 000	69,2 %		46,2 %	
Кариотип в дебюте заболевания				
Благоприятный	70,0 %	0,183	60,0 %	0,496
Промежуточный	60,8 %		49,0 %	
Неблагоприятный	47,4 %		38,9 %	
Неизвестно	25,0 %		25,0 %	
Статус заболевания				
Ремиссия	73,3 %	< 0,001	62,7 %	< 0,001
Нет ремиссии	17,9 %		10,7 %	
Тип донора				
Родственный	58,9 %	0,246	56,3 %	0,026
Неродственный	50,0 %		32,3 %	
HLA-совместимость				
Частичная	59,3 %	0,191	50,0 %	0,208
Полная	48,3 %		37,9 %	
Совместимость по полу донора и реципиента				
Совместимые	60,4 %	0,619	53,8 %	0,188
Несовместимые	48,6 %		34,3 %	
ABO-совместимость				
Совместимые	48,6 %	0,124	41,2 %	0,240
Несовместимые	60,4 %		49,1 %	
Источник трансплантата				
ГСК крови	62,2 %	0,186	60,0 %	0,006
Костный мозг	48,8 %		31,0 %	
Режим кондиционирования				
Миелоаблативный	59,5 %	0,683	45,9 %	0,916
Со сниженной интенсивностью доз	52,9 %		46,0 %	
Медиана клеток CD34+, ×10⁶/кг				
< 5	50,0 %	0,592	34,9 %	0,166
≥ 5	61,4 %		56,8 %	
Острая РТПХ I–IV степени				
Нет	57,4 %	0,733	50,0 %	0,748
Да	59,5 %		45,9 %	
Хроническая РТПХ				
Нет	46,7 %	0,002	42,2 %	0,050
Да	77,8 %		58,3 %	
Уровень экспрессии гена <i>WT1</i>, копии/10⁴ копий гена <i>ABL</i>				
Перед аллоТГСК, Д0				
< 250	79,5 %	< 0,001	69,8 %	< 0,001
> 250	31,8 %		22,7 %	
После аллоТГСК, Д+30				
< 250	61,2 %	0,328	50,0 %	0,293
> 250	50,0 %		41,7 %	
После аллоТГСК, Д+60				
< 250	66,2 %	0,012	52,3 %	0,084
> 250	35,7 %		38,5 %	

Фактор	ОВ	<i>p</i>	БСВ	<i>p</i>
После аллоТГСК, Д+100				
< 250	75,4 %	< 0,001	63,2 %	< 0,001
> 250	28,6 %		19,0 %	

аллоТГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; БСВ — бессобытийная выживаемость; ГСК — гемопоэтические стволовые клетки; ОВ — общая выживаемость; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; РТПХ — реакция «трансплантат против хозяина».

Кроме того, на показатели 2-летней ОВ оказывал влияние первичный или вторичный тип ОМЛ (59,5 vs 35,7 %; $p = 0,028$), уровень экспрессии гена *WT1* выше или ниже пороговых значений перед аллоТГСК (31,8 vs 79,5 %; $p < 0,001$), а также после нее в контрольных временных точках Д+60 (66,2 vs 35,7 %; $p = 0,012$) и Д+100 (75,4 vs 28,6 %; $p < 0,001$).

На показатели 2-летней БСВ оказывали влияние тип донора (родственный или неродственный: 56,3 vs 32,3 %; $p = 0,026$), источник трансплантата (костный мозг или периферическая кровь: 31 vs 60 %; $p = 0,006$), уровень экспрессии гена *WT1* выше или ниже порогового значения перед аллоТГСК (22,7 vs 69,8 %; $p < 0,001$) и после трансплантации в контрольной временной точке Д+100 (63,2 vs 19 %; $p < 0,001$) (рис. 4). В то же время статистически значимых различий в показателях ОВ и БСВ у пациентов старше и моложе 30 лет с разным лейкоцитозом и кариотипом в дебюте заболевания, а также в зависимости от использованного режима кондиционирования не обнаружено.

Результаты многофакторного анализа представлены в табл. 3 и 4. Независимым прогностически благоприятным предиктором ОВ и БСВ оказалась хроническая РТПХ ($p = 0,03$ и $p = 0,038$ соответственно). Кроме того, на показатели БСВ положительное влияние оказывал нормальный уровень экспрессии гена *WT1* в контрольной точке Д+100 ($p = 0,011$).

Кумулятивная частота ПТР ОМЛ

кЧПТР у больных ОМЛ с повышенным и нормальным уровнями экспрессии гена *WT1* до трансплантации в Д0, а также в контрольных точках Д+60 и Д+100 после аллоТГСК статистически значимо различались ($p < 0,001$, $p = 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно), что хорошо иллюстрирует рис. 5. В свете этих данных не представляются неожиданными также существенные статистически значимые различия 2-летней ОВ и БСВ в группах больных ОМЛ, которым трансплантация проводилась в полной молекулярной ремиссии (клинико-гематологическая ремиссия при *WT1* < 250 копий/10⁴ копий гена *ABL*), полной цитологической ремиссии (клинико-гематологическая ремиссия при *WT1* > 250 копий/10⁴ копий гена *ABL*) и при доказанном цПТР (рис. 6).

Обобщающие данные, касающиеся отношения рисков рецидивов в зависимости от уровня экспрессии гена *WT1*, измеренного до аллоТГСК и в контрольных временных точках Д+30, Д+60 и Д+100 после ее выполнения, представлены в табл. 5. Наиболее информативной точкой для измерения уровня экспрессии интересующего нас гена и диагностики рецидивов оказался Д+100. Информативность определения уровня экспрессии гена *WT1* также существенна, но ниже предыдущей в Д0 и Д+60, а минимальна в Д+30.

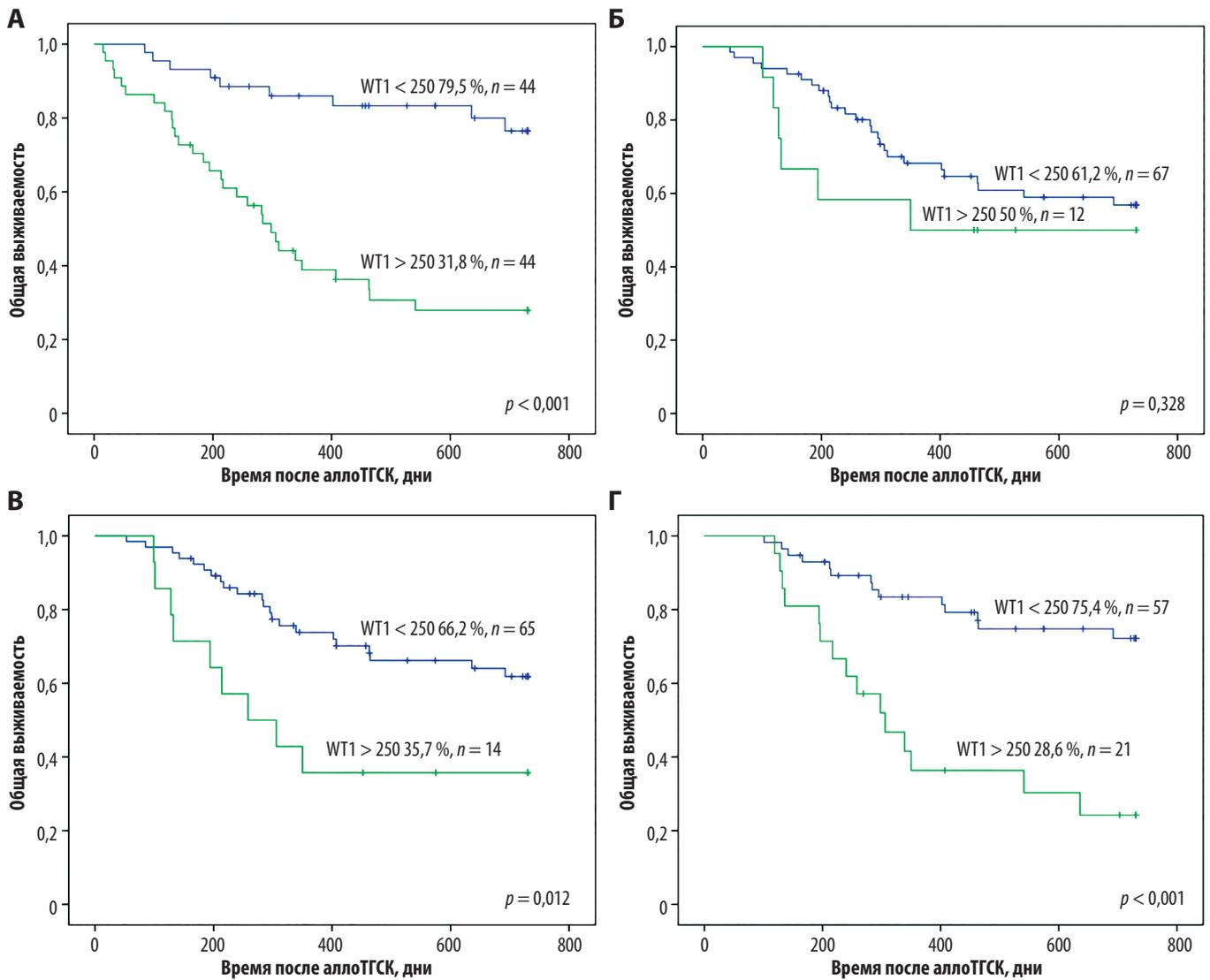


Рис. 3. Общая 2-летняя выживаемость в группах больных ОМЛ с нормальным (< 250 копий/ 10^4 копий гена *ABL*) и повышенным (> 250 копий) уровнями экспрессии гена *WT1* (А) до трансплантации в Д0 и во временных точках (Б) Д+30, (В) Д+60 и (Г) Д+100 после аллотГСК

Fig. 3. 2-year overall survival of AML patients with normal (< 250 copies/ 10^4 *ABL* copies) and high (> 250 copies) *WT1* expression levels (А) before transplantation at D0 and at time points (Б) D+30, (В) D+60 and (Г) D+100 after allo-HSCT

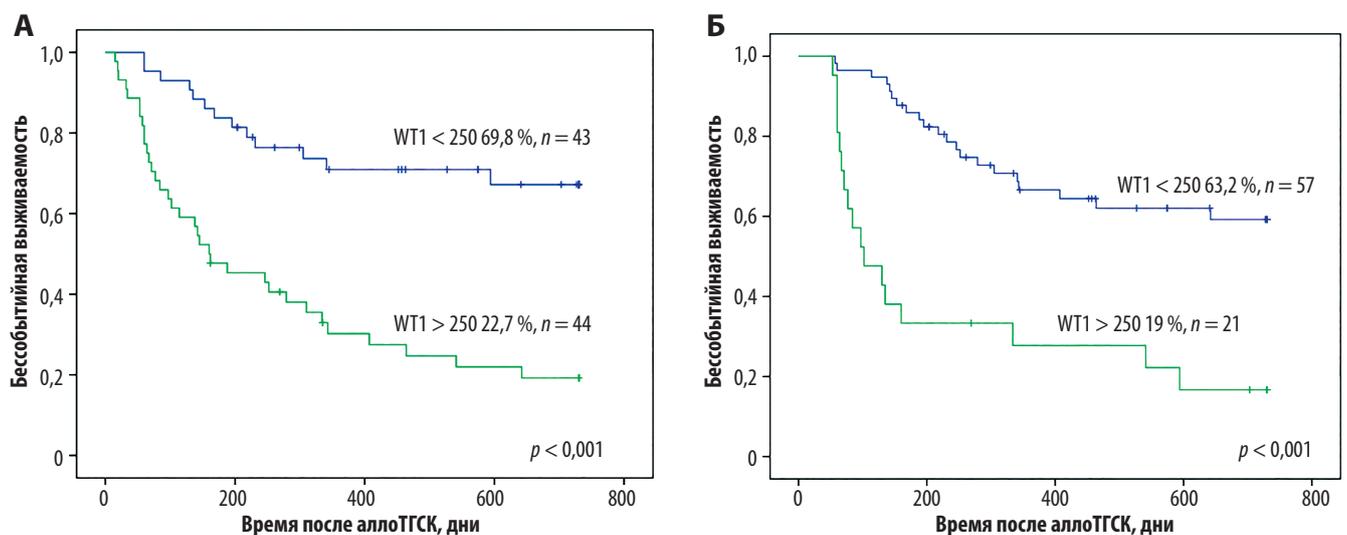


Рис. 4. Бессобытийная 2-летняя выживаемость в группах больных ОМЛ с нормальным (< 250 копий/ 10^4 копий гена *ABL*) и повышенным (> 250 копий) уровнями экспрессии гена *WT1* (А) до трансплантации в Д0 и (Б) во временной точке Д+100 после аллотГСК

Fig. 4. 2-year event-free survival of AML patients with normal (< 250 copies/ 10^4 *ABL* copies) and high (> 250 copies) *WT1* expression levels (А) before transplantation at D0 and (Б) at time point D+100 after allo-HSCT

Таблица 3. Результаты многофакторного анализа прогностического значения основных клинических и лабораторных признаков, влияющих на 2-летнюю общую выживаемость больных ОМЛ, которым выполнена аллотГСК

Фактор	Однофакторный анализ, <i>p</i>	Многофакторный анализ		
		ОР	95% ДИ	<i>p</i>
Вторичный ОМЛ vs ОМЛ <i>de novo</i>	0,028	2,267	0,830–6,193	0,110
Отсутствие ремиссии на момент аллотГСК	< 0,001	0,353	0,130–0,957	0,041
Хроническая РТПХ	0,002	0,339	0,127–0,900	0,030
Гиперэкспрессия гена <i>WT1</i> перед аллотГСК, Д0	< 0,001	2,859	0,925–8,837	0,068
Гиперэкспрессия гена <i>WT1</i> после аллотГСК, Д+60	0,012	2,056	0,760–5,560	0,156
Гиперэкспрессия гена <i>WT1</i> после аллотГСК, Д+100	< 0,001	1,986	0,732–5,387	0,178

95% ДИ — 95%-й доверительный интервал; аллотГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; ОР — отношение рисков; РТПХ — реакция «трансплантат против хозяина».

Таблица 4. Результаты многофакторного анализа прогностического значения основных клинических и лабораторных признаков, влияющих на 2-летнюю бессобытийную выживаемость больных ОМЛ, которым выполнена аллотГСК

Фактор	Однофакторный анализ, <i>p</i>	Многофакторный анализ		
		ОР	95% ДИ	<i>p</i>
Отсутствие ремиссии на момент аллотГСК	< 0,001	0,452	0,190–1,076	0,073
Хроническая РТПХ	0,050	0,464	0,224–0,959	0,038
Гиперэкспрессия гена <i>WT1</i> перед аллотГСК, Д0	< 0,001	2,297	0,931–5,670	0,071
Гиперэкспрессия гена <i>WT1</i> после аллотГСК, Д+100	< 0,001	2,456	1,231–4,901	0,011
Неродственный донор	0,026	1,246	0,485–3,201	0,647
Источник трансплантата: ГСК крови vs КМ	0,006	0,525	0,216–1,276	0,156

95% ДИ — 95%-й доверительный интервал; аллотГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; ГСК — гемопоэтические стволовые клетки; КМ — костный мозг; ОР — отношение рисков; РТПХ — реакция «трансплантат против хозяина».

Таблица 5. Отношение рисков рецидива в зависимости от уровня экспрессии гена *WT1* перед аллотГСК и во временных точках Д+30, Д+60, Д+100 после ее выполнения

Уровень экспрессии гена <i>WT1</i> , копии/10 ⁴ копий гена <i>ABL</i>	Ремиссия, <i>n</i>	Рецидив, <i>n</i>	Отношение рисков
Перед аллотГСК, Д0			
< 250	43 (97,7 %)	1 (2,3 %)	68,2
> 250	17 (38,6 %)	27 (61,4 %)	
После аллотГСК, Д+30			
< 250	66 (98,5 %)	1 (1,5 %)	1,70
> 250	12 (100 %)	0	
После аллотГСК, Д+60			
< 250	64 (98,5 %)	1 (1,5 %)	17,45
> 250	11 (78,5 %)	3 (21,5 %)	
После аллотГСК, Д+100			
< 250	57 (100 %)	0	125,95
> 250	10 (47,6 %)	11 (52,4 %)	

Феномен отставания обнаружения цПТР и мПТР во времени

Согласно нашим данным, мПТР, определяемые на основании надпорогового повышения уровня экспрессии гена *WT1* и представляющие собой молекулярные эквиваленты цПТР, были зарегистрированы у 57 (66,2 %) из 86 больных ОМЛ, которым выполнена аллотГСК. В то же время цПТР имели место лишь у 33 (38,4 %) из 86 пациентов. У 11 (33,3 %) из 33 больных появление мПТР и цПТР совпадало по времени. В то же время у 22 пациентов цПТР обнаруживались существенно позже, чем мПТР. По нашим данным, интервал от времени выявления сначала мПТР, а затем цПТР варьировал от 13 до 489 дней с медианой 35 дней (табл. 6).

Дополнительный анализ данных показал, что большинство этих больных после установления мПТР получали превентивную, сдерживающую ожидаемый цПТР терапию. В основном отменялись стандартно назначаемые для профилактики РТПХ иммунодепрессанты и, наоборот, в лечебные протоколы включались гипометилирующие препараты, а также инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ). В результате таких модификаций эффективно справиться с ожидаемым цитологическим рецидивом заболевания практически не удалось, хотя и увеличение интервала между мПТР и цПТР все же имело место у многих пациентов (см. табл. 6). При этом в качестве основной сдерживающей составляющей развития цПТР могли выступать не только ИДЛ, но и гипометилирующие агенты. По-видимому, в меньшей степени за этот феномен ответственны некоторые прогностически благоприятные цитогенетические и молекулярные особенности изученных лейкозов. В качестве иллюстрации этого положения приводим краткую выписку из истории болезни одной из наших пациенток.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Больная, 13 лет (№ 3, см. табл. 6); кариотип без хромосомных нарушений, а при молекулярном исследовании выявлена прогностически благоприятная мутация гена *NPM1*. Серийные измерения уровня экспрессии гена *WT1*, сопряженные с параллельным определением уровня экспрессии гена *NPM1* и содержания бластных элементов в костном мозге, показали следующее. При обнаружении у больной повышенной экспрессии гена *WT1*, несмотря на от-

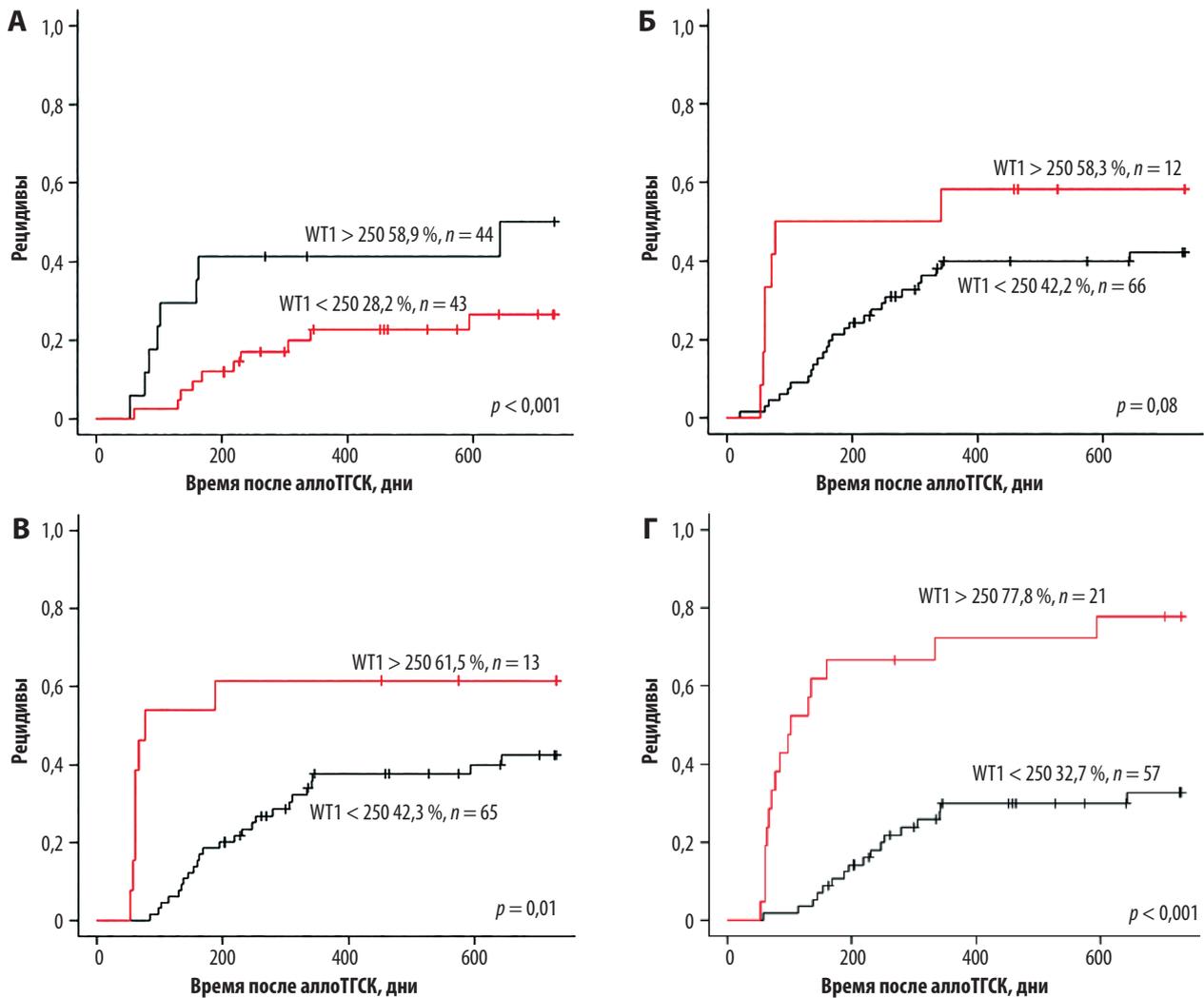


Рис. 5. Кумулятивная 2-летняя частота посттрансплантационных рецидивов в группах больных ОМЛ с нормальным (< 250 копий/ 10^4 копий гена *ABL*) и повышенным (> 250 копий) уровнями экспрессии гена *WT1* (А) до трансплантации в Д0 и во временных точках (Б) Д+30, (В) Д+60 и (Г) Д+100 после аллотГСК

Fig. 5. 2-year cumulative incidence of posttransplant relapse in AML patients with normal (< 250 copies/ 10^4 *ABL* copies) and high (> 250 copies) *WT1* expression levels (A) before transplantation at D0 and at time points (B) D+30, (B) D+60 and (Г) D+100 after allo-HSCT

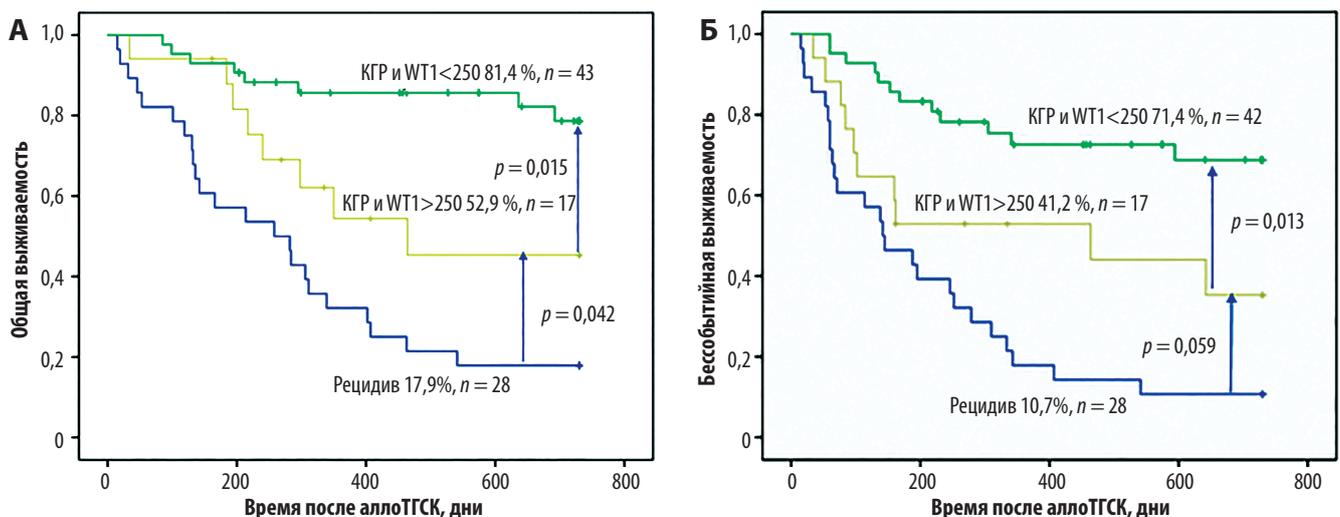


Рис. 6. 2-летняя (А) общая и (Б) бессобытийная выживаемость в группах больных ОМЛ с аллотГСК в полной молекулярной ремиссии (КГР при *WT1* < 250 копий/ 10^4 копий гена *ABL*), полной цитологической ремиссии (КГР при *WT1* > 250 копий) или при рецидиве КГР — клинико-гематологическая ремиссия.

Fig. 6. 2-year (A) overall and (B) event-free survival of AML patients who received allo-HSCT in complete molecular remission (clinical and hematological remission with *WT1* < 250 copies/ 10^4 *ABL* copies), complete cytological remission (clinical and hematological remission with *WT1* > 250 copies) or in relapse КГР — clinical and hematological remission.

Таблица 6. Характеристика больных ОМЛ с удлиненным интервалом между временем выявления мПТР и цПТР, установленным методом количественной ПЦР в реальном времени

Пациент №	Возраст (лет), пол	FAB-вариант ОМЛ	Цитогенетика; молекулярная биология	Дата диагностики мПТР/цПТР	Интервал между мПТР и цПТР, дни	Число курсов ИДЛ/ГА
1	48, Ж	M0	46,XX[20]; б/м	29.09.15/01.02.17	491	7/5
2	23, М	M4	46,XY[20]; б/м	18.12.13/20.04.15	488	—
3	13, Ж	M2	46,XX[20]; мутация гена <i>NPM1</i>	23.04.15/29.02.16	312	0/3
4	30, Ж	M4	46,XX[20]; б/м	19.01.15/02.09.15	226	1/4
5	37, М	M5	46,XY, t(3;12)(q26;p13)[11]/45,XY, idem, -7[2]/46,XY, idem, +mar[7]; <i>EVI1+</i>	31.03.14/17.06.14	135	0/3
6	50, Ж	M2	46,XX, del(5)(q15q33)[2]/44,XX, -5?, t(12,14)(?p13;q11), der(16)add(?q24), -21[2]/46,XX[16]	17.09.14/18.02.15	123	1/1
7	33, Ж	M1	46,XX, del(5)(q13q33); б/м	8.12.14/04.02.15	58	2/0
8	35, Ж	M1	46,XX; б/м	19.04.12/06.06.12	48	—
9	26, Ж	M1	47,XX, der(11)add(q15), del(q23), +21; <i>EVI1+</i>	13.01.14/20.02.14	38	1/1
10	33, М	M4	46,XY, del(7)(q11), del(9)(q22q24), t(11;17)(q23;q21); б/м	06.01.12/13.02.12	38	—
11	41, М	M5	46,XY, t(6;12)(q12;p12), der(12)t(6;12)t(1;12)(p34;q24), add(18)(q23); <i>MLL, FLT3/ITD, NPM1</i>	05.07.16/10.08.16	36	0/1
14	19, Ж	M5	46,XX, t(9;11)(p12;q23); <i>MLL</i>	14.03.17/14.04.17	31	1/5
15	55, Ж	M4	46,XX; б/м	06.09.12/04.10.12	28	0/1
16	19, М	M4	47,XY, dup(2)(q23q37), t(10;11)(p13;q21), +21; <i>FLT3/ITD</i>	30.05.15/24.06.15	25	—
17	15, Ж	M2	49,XX, +X, +4, t(8;21)(q22;q22), +15; <i>RUNX1/RUNX</i>	05.06.14/30.06.14	25	0/1
18	30, М	M2	46,XY, add(1)(p36), t(8;21)(q22;q22), add(17)(q25)[3]/46,XY[17]; б/м	12.11.12/05.12.12	23	—
19	27, М	M2	46,XY[20]; б/м	29.09.15/12.10.15	13	0/4
20	39, М	M0	46,XY[20]; б/м	22.01.15/16.02.15	25	—
21	47, М	M2	46,XY[20]; б/м	01.03.16/16.03.16	15	—

б/м — без специфических молекулярных маркеров; ГА — гипометилирующие агенты; ИДЛ — инфузии донорских (CD3+) лимфоцитов; мПТР — молекулярный посттрансплантационный рецидив; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; цПТР — цитологический посттрансплантационный рецидив.

Таблица 7. Отношение рисков 2-летней смертности в зависимости от уровня экспрессии гена *WT1* перед аллотГСК в Д0 и в контрольных временных точках Д+30, Д+60, Д+100 после ее выполнения

Уровень экспрессии гена <i>WT1</i> , копии/10 ⁴ копий гена <i>ABL</i>	Живы, <i>n</i>		Умерли, <i>n</i>		Отношение рисков	<i>p</i>
	Перед аллотГСК, Д0	Д+30	Д+60	Д+100		
< 250	35 (79,5 %)	26 (61,2 %)	9 (20,5 %)	22 (33,9 %)	8,30	< 0,001
> 250	14 (31,8 %)	6 (50,0 %)	30 (68,2 %)	9 (64,3 %)		
< 250	41 (61,2 %)	26 (38,8 %)	1,58	0,050	3,50	0,070
> 250	6 (50,0 %)	6 (50,0 %)	8,20	< 0,001		
< 250	43 (75,4 %)	14 (25,6 %)	8,20	< 0,001	8,20	< 0,001
> 250	6 (27,3 %)	16 (72,7 %)	6 (27,3 %)	16 (72,7 %)		

мену иммунодепрессантов и подключение к терапии азациитидина и ИДЛ в эскалирующем режиме, новые всплески подъема уровня экспрессии гена *WT1* продолжали иметь место. Это не сопровождалось ни соответствующим повышением числа бластных клеток в костном мозге, ни адекватным падением донорского химеризма. В то же время экспрессия специфического

гена *NPM1* была стойко снижена, что, с одной стороны, указывало на высокую чувствительность этих лейкозных клеток к проведенной терапии, а с другой — на меньшую чувствительность к ней экспрессирующих *WT1* лейкозных бластных элементов.

Трансплантационная летальность в группах больных с исходно нормальным или повышенным уровнем экспрессии гена *WT1*

Ввиду высокой кЧПТР у больных с изначально повышенным уровнем экспрессии гена *WT1*, особенно в отсутствие хронической РТПХ, посттрансплантационная летальность достигала 68 % (30 из 44 пациентов). Следует отметить, что большинство больных умерли от рецидивов. По нашим данным, наиболее информативными точками в предсказании плохого исхода заболевания были повышенные уровни экспрессии гена *WT1* до трансплантации и в контрольной точке Д+100 после нее (табл. 7). Напротив, в группе больных с исходно нормальным уровнем экспрессии гена *WT1* за тот же период наблюдения смерть наступила только у 9 (20 %) из 44 пациентов. Различие между показателями летальности оказалось статистически значимым ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило большую прогностическую значимость серийного количественного измерения уровня экспрессии гена

WT1 как в плане ОВ и БСВ, так и в отношении кцПТР. Как оказалось, снижение числа копий этого гена ниже порогового уровня было прогностически значимо в отношении повышения показателей ОВ и БСВ как до аллотГСК, так и во временных контрольных точках Д+60 и Д+100 после нее, что согласуется с данными литературы [17]. Наоборот, значимое повышение экспрессии этого гена перед трансплантацией в Д0, а также в выбранных временных точках после аллотГСК было чревато скорым развитием цПТР [17, 23]. Следовательно, высокий уровень экспрессии гена *WT1*, за который ответственны прежде всего незрелые бластные элементы, можно рассматривать как молекулярный эквивалент цПТР. Поэтому неудивительно, что наличие нормального уровня экспрессии гена *WT1* на этапе трансплантации в основных контрольных точках (Д+60 и Д+100) оказалось прогностически высокозначимым как в отношении ОВ и БСВ, так и частоты возникновения цПТР.

В тесной связи с этими представлениями рассматриваются накапливающиеся данные [1, 4, 6, 23] по существенному отставанию цитологических рецидивов ОМЛ от молекулярных, определяемых методом количественной *WT1*-ПЦР. Впервые на этот интересный феномен обратили внимание итальянские основоположники [1] этого уникального молекулярного подхода в диагностике рецидивов лейкозов и оценке минимальной остаточной болезни. У некоторых из их пациентов обнаруживалось существенное удлинение интервалов между мПТР и следующим за ним цПТР. Чуть позже такой же феномен наблюдали в посттрансплантационный период после аллотГСК у больных ОМЛ [4, 17, 23, 24]. В частности, по данным С. Messina и соавт. [23], этот интервал у больных ОМЛ варьировал от 20 до 360 дней с медианой 158 дней. Высказано предположение, что в основе этого феномена может лежать не только терапия, но и реакция «трансплантат против лейкоза», правомочность которого была недавно доказана [26].

Что касается наших наблюдений в этой области, то одной из первопричин удлинения интервала мПТР–цПТР могла быть сама ТГСК и индуцированная ею хроническая РТПХ. Одним из аргументов в пользу этой концепции могут быть представленные здесь данные многофакторного анализа, указывающие на положительное влияние хронической РТПХ как на ОВ, так и БСВ (рис. 7). По аналогии с процитированной работой одним из пусковых механизмов развития этой реакции могли быть ИДЛ. Между тем в нашей работе ИДЛ с лечебной целью использовались только у 7 из 21 больного (см. табл. 5). Другим важным моментом, ответственным за удлинение интервала мПТР–цПТР, могли быть гипометилирующие препараты, которые назначались приблизительно половине этих пациентов. Наконец, не стоит упускать из виду цитогенетические и молекулярные особенности самого лейкоза. В настоящей работе это было продемонстрировано на примере истории болезни одной больной с нормальным кариотипом и наличием в опухолевых элементах прогностически благоприятной мутации гена *MPN1*, что, естественно, нуждается в дополнительном изучении.

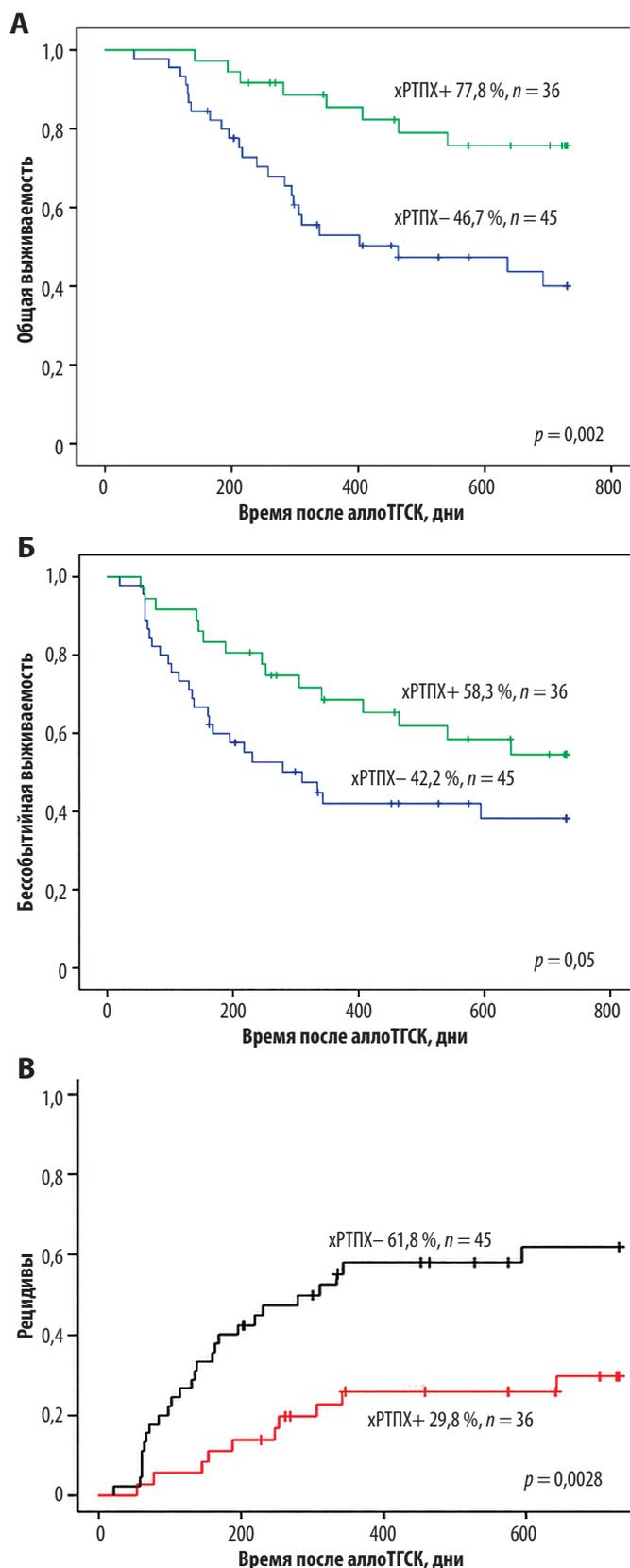


Рис. 7. 2-летняя (А) общая и (Б) бессобытийная выживаемость, а также (В) кумулятивная частота посттрансплантационных рецидивов в группах больных ОМЛ с наличием или отсутствием хронической реакции «трансплантат против хозяина» (xРТПХ)

Fig. 7. 2-year (A) overall and (B) event-free survival as well as (C) cumulative incidence of posttransplant relapse in AML patients with and without chronic graft vs. host disease (xRTPH)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом представленные в работе данные открывают новые возможности использования посттрансплантационного молекулярного мониторинга у больных ОМЛ, которым выполнена аллотГСК. Поскольку такой подход основан на количественном измерении в реальном времени уровня экспрессии панспецифического гена с помощью *WT1*-ПЦР, он очень удобен в работе. Как и в других аналогично проведенных исследованиях, нами была показана большая диагностическая и прогностическая ценность серийного измерения уровня экспрессии гена *WT1*, направленного на своевременное выявление и превентивное лечение ПТР. Что же касается оптимальной контрольной точки для выполнения этого молекулярного исследования, то больше всего подходит $D+100$.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Поскольку статья содержит материалы подготавливаемой к защите кандидатской диссертации Я.В. Гудожниковой, проведенной в рамках госзадания, она частично финансировалась из бюджета.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Н.Н. Мамаев.

Сбор и обработка данных: Я.В. Гудожникова, И.М. Бархатов, В.А. Катерина, А.И. Шакирова, Т.Л. Гиндина, С.Н. Бондаренко, О.А. Слесарчук, Е.И. Дарская, О.В. Паина.

Анализ и интерпретация данных: Н.Н. Мамаев, Я.В. Гудожникова, Т.Л. Гиндина.

Административная поддержка: Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. 2002;16(10):2115–21. doi: 10.1038/sj.leu.2402675.
- Cilloni D, Gottardi E, Fava M, et al. Usefulness of quantitative assessment of the WT1 gene transcript as a marker for minimal residual disease detection. *Blood*. 2003;102(2):773–4. doi: 10.1182/blood-2003-03-0980.
- Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood*. 2003;101(5):1698–704. doi: 10.1182/blood-2002-06-1831.
- Zhao X-S, Jin S, Zhu H-H, et al. Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011;47(4):499–507. doi: 10.1038/bmt.2011.121.
- Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Бархатов И.М. и др. Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена *WT1* после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых

клеток. *Клиническая онкогематология*. 2015;8(3):309–20. doi: 10.21320/2500-2139-2015-8-3-309-320.

[Mamaev NN, Gorbunova AV, Barkhatov IM, et al. Molecular Monitoring of WT1 Gene Expression Level in Acute Myeloid Leukemias after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Oncohematology*. 2015;8(3):309–20. doi: 10.21320/2500-2139-2015-8-3-309-320. (In Russ)]

6. Мамаев Н.Н., Гудожникова Я.В., Горбунова А.В. Гиперэкспрессия гена *WT1* при злокачественных опухолях системы крови: теоретические и клинические аспекты (обзор литературы). *Клиническая онкогематология*. 2016;9(3):257–64. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-257-264.

[Mamaev NN, Gudozhnikova YaV, Gorbunova AV. WT1 Gene Overexpression in Oncohematological Disorders: Theoretical and Clinical Aspects (Literature Review). *Clinical oncohematology*. 2016;9(3):257–64. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-257-264. (In Russ)]

7. Call KM, Gieser T, Ito CI, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor gene locus. *Cell*. 1990;60(3):509–20. doi: 10.1016/0092-8674(90)90601-a.

8. Rose EA, Glaser T, Jones C, et al. Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell*. 1990;60(3):495–508. doi: 10.1016/0092-8674(90)90600-j.

9. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (*WT1*) in human leukemias. *Leukemia*. 1992;6(5):405–9.

10. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, et al. *WT1* as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1994;84(9):3071–9.

11. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms' tumor gene (*WT1*) in human leukemia. *Blood*. 1997;88(4):1405–12.

12. Cilloni D, Gottardi E, Messa F, et al. Significant correlation between the degree of *WT1* expression and the International Scoring System score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2003;21(10):1988–95. doi: 10.1200/jco.2003.10.503.

13. Alonso-Domingues JM, Tenorio M, Velasco D, et al. Correlation of *WT1* expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. *Cancer Genet*. 2012;205(4):190–1. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.02.008.

14. Cilloni D, Messa F, Arruga F, et al. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of *WT1* transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica*. 2008;93(6):921–4. doi: 10.3324/haematol.12165.

15. Ogawa H, Ikegame K, Kawakami M, Tamaki H. *WT1* gene transcript assay for relapse in acute myeloid leukemia after transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(9):1747–53. doi: 10.1080/10428190410001687503.

16. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, et al. Leukemia relapse after allogeneic transplant for acute myeloid leukemia: predictive role of *WT1* expression. *Br J Haematol*. 2013;160(4):503–9. doi: 10.1111/bjh.12181.

17. Nomdedeu J, Esquirol A, Carricondo M, et al. Bone marrow *WT1* levels in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplasia: Clinically relevant time-points and 100 copies threshold value. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;24(1):55–63. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.09.001.

18. Cilloni D, Saglio G, Gottardi E, et al. *WT1* as universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*. 2004;112(1–2):79–84. doi: 10.1159/000077562.

19. Candoni A, Toffoletti E, Galina R, et al. Monitoring of minimal residual disease by quantitative *WT1* gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transpl*. 2011;25(2):308–16. doi: 10.1111/j.1399-0012.2010.01251.x.

20. Kwon M, Martinez-Laperche C, Infante M, et al. Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' Tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: Correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1235–42. doi: 10.1016/j.bbmt.2012.01.012.

21. Polak J, Hajkova H, Haskovec C, et al. Quantitative monitoring of *WT1* expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia – a useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma*. 2013;60(01):74–82. doi: 10.4149/neo_2013_011.

22. Lapillone H, Renneville A, Auvrignon A, et al. High *WT1* expression after induction therapy predicts high risk or relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(10):1507–15. doi: 10.1200/jco.2005.03.5303.

23. Messina C, Sala E, Carrabba M, et al. Early post-allogeneic transplantation *WT1* transcript positivity predicts AML relapse. 40th EBMT Meeting. 30 March – 2 April; Milan, Italy; 2014: Abstract P239.

24. Mear J-B, Salaun V, Dina N, et al. *WT1* and flow cytometry minimal residual disease follow-up after allogeneic transplantation in practice. 40th EBMT Meeting. 30 March – 2 April; Milan, Italy; 2014: Abstract P655.

25. Capelli D, Attolico I, Saraceli F, et al. Early cumulative incidence of relapse in 80 acute myeloid leukemia patients after chemotherapy and transplant post-consolidation treatment prognostic role of post-induction *WT1*. 40th EBMT Meeting. 30 March – 2 April; Milan, Italy; 2014: Abstract P287.

26. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: A comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tumor 1 expression. *Leuk Res*. 2015;39(2):138–43. doi: 10.1016/j.leukres.2014.11.011.