

A mérhető reziduális betegség lehetőségei a hematológiai malignitásokban

LÁSZLÓ TAMÁS^{1,2}, KENÉZ LILI ANNA^{1,2}, SZEPESI GABRIELLA^{1,2}, MATÚZ MARCELL^{1,2}, BARNÁ GÁBOR³, BÖDÖR CSABA^{1,2}

Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, ¹HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológiai Kutatócsoport, ²MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológiai Kutatócsoport, ³Áramlási Citometriai Laboratórium, Budapest

Levelezési cím:

Dr. László Tamás, Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26., e-mail: laszlo.tamas@stud.semmelweis.hu; tel.: +36706704706

Közlésre érkezett:

2024. szeptember 9.

Elfogadva:

2024. október 11.

Az elmúlt években az új, innovatív kezelési modalitások térnyerésével a hematológiai malignitások kezelésében korábban nem látott fejlődés volt tapasztalható. Mindezen új terápiák bevezetésével lehetővé vált a daganatsejtek drasztikus és hosszú távú csökkentése (potenciális eliminációja) a szervezetben, melynek objektív véleményezése egy új diagnosztikus modalitás létrejöttét igényelte. Napjainkban az objektív válasz meghatározására leginkább alkalmas módszer a mérhető reziduális betegség (MRD) megítélése, mely a daganatos beteg szervezetében egy adott kezelést követően, jellemzően a betegség klinikai tünetei vagy jelei nélkül, a sejtmorfológia vagy a rutin szűrési módszerek által nem kimutatható rosszindulatú sejtek meglétét jelenti. Az MRD meghatározására számos metodika alkalmazható, a multiparametrikus áramlási citometriától, a real-time kvantitatív PCR (RQ-PCR) alapú megoldásokon át egészen az újabb innovatív módszerekig, mint a digitális PCR (ddPCR) vagy az új generációs szekvenálás (NGS). Jelen kéziratunkban a különböző, MRD mérésére szolgáló módszerek bemutatását, valamint napjainkban történő alkalmazását szeretnénk ismertetni néhány kiemelt hematológiai malignitás példáján keresztül. *Magy Onkol* 68:364-373, 2024

Kulcsszavak: MRD, folyadékbiopszia, új generációs szekvenálás

In recent years, there have been remarkable improvements in the treatment of hematological malignancies with the introduction of novel therapeutic modalities. The advent of these therapies has made it feasible to significantly and permanently decrease (possibly eradicate) tumor cells in the body. Evaluating the effectiveness of these treatments required the development of a new diagnostic method. Currently, the most appropriate approach for assessing the objective response is through the measurement of „measurable residual disease” (MRD). MRD refers to the presence of malignant cells in a patient’s body after receiving treatment, even in the absence of apparent signs or symptoms. Several techniques can be employed to detect MRD, including multiparametric flow cytometry, RQ-PCR as well as more recent approaches including digital PCR or next generation sequencing. This review offers an in-depth overview of the different techniques used to estimate measurable residual disease and their current applications in hematological malignancies.

László T, Kenéz LA, Szepesi G, Matúz M, Barna G, Bödör C. The clinical potential of measurable residual disease in hematological malignancies. *Magy Onkol* 68:364-373, 2024

Keywords: MRD, liquid biopsy, next generation sequencing

BEVEZETÉS

A hematológiai malignitások magas prevalenciájuknak köszönhetően [non-Hodgkin-limfóma 4467 fő/5 év; leukémia 4256 fő/5 év Magyarországon; Globocan 2022] napjainkban is kiemelt népegészségügyi jelentőséggel bírnak. Az elmúlt években a molekuláris vizsgálóeljárások robbanásszerű fejlődésének köszönhetően eddig soha nem látott részletességgel ismerhettük meg az onkohematológiai kórképek genetikai hátterét, ami számos új prognosztikus/prediktív molekuláris biomarker felfedezéséhez, molekuláris támadáspontok meghatározásához, valamint új innovatív terápiás modalitások létrejöttéhez vezetett [1]. Mindezek forradalmasították a hematológiai malignitások kezelését, melynek hatására jelentős javulást értek el számos entitásban.

Az innovatív kezelési módzatok bevezetésének köszönhetően a malignus sejtek drasztikus csökkenését sikerült elérni, miáltal a klasszikus betegségkövetési módszerek, mint például a lép tapintása fizikális vizsgálat során, vagy a vér/csontvélkenet morfológiai értékelése, valamint a különböző képalakító vizsgálatok (például PET-CT) alacsony érzékenységgel következtében háttérbe szorultak a klinikailag remisszióban levő betegek hosszú távú nyomonkövetése során. Mindennek következtében egyre inkább megfogalmazódott az igény egy objektív, a kezelésre adott biológiai válasz minél érzékenyebb meghatározására képes vizsgálat iránt. Napjainkban a kezelésre adott biológiai válasz megítélésére egyezményesen elfogadott objektív módszer a mérhető reziduális betegség (régábbi nevén minimális reziduális betegség; MRD) meghatározása. Bár az elnevezés, valamint a definíció egységes (MRD – mérhető reziduális betegség; kezelést követő reziduális malignus sejtek jelenléte), az MRD meghatározására számos, egymástól érzékenységgel, specificitással és alkalmazhatóságban is különböző eljárás létezik, melyek klinikai gyakorlatba történő ültetése bizonyos hematológiai entitások esetében sokéves múltra tekint vissza, míg más esetekben továbbra is folyamatban lévő vizsgálatok tárgyát képezi.

Jelen összefoglaló közleményünkben részletezzük az MRD meghatározására szolgáló módszerek közti különbségeket, kiemelve azok előnyeit és hátrányait, továbbá kitérünk az MRD klinikai alkalmazhatóságának jelentőségére is a legfontosabb hematológiai entitásokban. Mindemellett ismertetjük a liquid biopszia alapú MRD-követés potenciális szerepét, különös figyelmet fordítva a legújabb, innovatív, új generációs szekvenáláson (NGS) alapuló módszerek potenciális alkalmazhatóságára non-Hodgkin-limfómákban.

MRD MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ LEGFONTOSABB MÓDSZEREK

Az „ideális”, MRD meghatározására szolgáló molekuláris teszt magas érzékenységgel és specificitással képes kimutatni és kvantifikálni a reziduális malignus sejteket, miközben reprodukálható a tesztet végző laboratóriumok, valamint szakemberek között. Az, hogy a módszer képes-e a fentebb említett kritériumokat teljesíteni, nagyban függhet a kezelés

aktuális állásától (kezelés közben vs. kezelést követően), a vizsgált biológiai minta típusától (például perifériás vér, csontvelő, agy-gerincvelői folyadék), valamint a minta minőségétől [2, 3]. A jelenlegi gyakorlatban leginkább alkalmazott módszerek az áramlási citometria, különböző PCR-alapú eljárások, valamint az új generációs szekvenálás [1. táblázat].

A multiparametrikus (multicolor) áramlási citometria (multiparametric flow cytometry, MFC) a leginkább elterjedt, valamint a legtöbb entitásban alkalmazható, MRD meghatározására szolgáló módszer. Alkalmazási területei közül kiemelendő az akut limfoblasztos leukémia (ALL), valamint az akut mieloid leukémia (AML), melyekben az MRD alkalmazása a mindennapi gyakorlat szerves részét képezi [4–6]. Napjainkban az MFC-alapú MRD-detektálás több fenotípusos marker (általában 6–8 antigén) egyidejű felismerésén alapul, továbbá azon a képességen, hogy néhány perc alatt nagyszámú sejtet lehet elemezni, így a kimutatási küszöbértékek nem sokkal maradnak el a molekuláris technikák által biztosított küszöbértékektől [7]. Emellett az MFC-alapú MRD-meghatározásnak számos előnye van, mint a viszonylagos könnyű hozzáférhetőség, viszonylag alacsony fajlagos költség, valamint a rövid „turnaround time”. Bár az MFC széles körben elterjedt, eredményes alkalmazásának számos esetben gátat szabhat a friss minta szükségessége, valamint az elemzéshez nélkülözhetetlen, az MRD MFC-alapú meghatározásában tapasztalt szakember jelenléte. Mindezek áthidalására az elmúlt években számos törekvés történt, melynek következtében jelenleg részletes szakmai irányelvek állnak rendelkezésre [8–10].

A PCR-alapú eljárások közül elsősorban két módszer terjedt el MRD detektálására: a real-time kvantitatív PCR (RQ-PCR), valamint a digitális (droplet) PCR (ddPCR). A mindennapi rutindiagnosztikai gyakorlatban elsősorban az RQ-PCR-alapú megoldások preferáltak hozzáférhetőségük, valamint a nagyobb tapasztalatnak köszönhetően. Az RQ-PCR-alapú eljárások között elkülöníthető az RNS-ből kiinduló, reverz transzkripció PCR-t követő real-time kvantitatív PCR, valamint a DNS-ből kiinduló RQ-PCR. Előbbinek érzékenysége transzkripciófüggő és jellemzően patogén fúziós transzkriptumok vizsgálatára alkalmas (például *BCR::ABL1* krónikus mieloid leukémiában; CML), míg utóbbi esetben DNS a kiindulási nukleinsav, melyből génfúziók, átrendeződések, nagyobb deléciók, immunglobulin- és T-sejt-receptor átrendeződések követhetőek személyre szabott primerek és próbák beállítással (például akut limfoblasztos leukémiában; ALL) [11, 12].

A *BCR::ABL1* fúziós transzkriptum RQ-PCR-rel történő követése a molekuláris MRD-monitorozás sarokkövének tekinthető. A módszer ma már több évtizedes múltra tekint vissza, széles körben alkalmazott és alapjaiban határozza meg a CML-ben szenvedő betegek kezelését [11, 13]. A monitorozás során a *BCR::ABL1* fúziós transzkriptum szintjét egy kontroll gén mennyiségéhez viszonyítva nemzetközileg összehasonlítható objektív skálán tudjuk kifejezni, miáltal kiküszöbölhető a laboratóriumok közötti, technikai sajátosságokból adódó variabilitás [14]. Napjainkban az RQ-PCR alkalmazásával

1. TÁBLÁZAT. A betegség kiterjedtségének megítélésére alkalmazott vizsgálati módszerek

Módszer neve	Módszer leírása	Érzékeny-ség	Előnyök	Hátrányok	MRD meg- ítélésére alkalmas
Fizikális vizs-gálat	a szekunder limfoid szervek méretének hozzávetőleges megítélése	nem kvanti-fikálható	könnyen hozzáférhető; alacsony fajlagos költség	alacsony érzékenység	nem
Morfológia	a malignus sejtek mikroszkóp alkalmazásával történő elkülö-nítése, valamint az érintettség kiterjedt voltának megbecsülése	5×10^{-2} [5%]	könnyen hozzáférhető; alacsony fajlagos költség	alacsony érzékenység	nem
Citogenetika (kariotipizálás)	a malignus sejtek kromoszó-maállományának számbeli, strukturális és méretbeli különbségeinek vizsgálata	$1-5 \times 10^{-2}$ (1–5%)	könnyen hozzáférhető; addicionális citogenetikai eltérések detektálhatóak	alacsony érzékenység; csontvelő-aspiráció szűk-ségessége (minimum 20 metafázis)	nem
FISH	gén- vagy kromoszómaeltérések vizsgálatára alkalmas citogene-tikai vizsgálat	1×10^{-2} [1%]	gyors átfutási idő	alacsony érzékenység	nem
PET-CT	reziduális betegség kimutatása radioaktív "tracerek" segítségével történő képalkotóvizsgálat során	nem kvantifi-kálható	könnyen hozzáférhető; térbeli információ/ ki-terjedtség vizsgálatának lehetősége	alacsony érzékenység; sugárterheléssel jár	nem
Áramlási citometria	a sejtek elkülönítése fehérjeala-pú fenotipizálás által	$10^{-4}-10^{-5}$ (0,01–0,001%)	könnyen hozzáférhető; gyors átfutási idő; vi-szonylag alacsony fajla-gos költség; addicionális információt szolgáltat a fehérjeexpresszióról	változó érzékenység; nagy tapasztalattal rendelkező szakember szükséges a kiértékeléséhez; bizonyos esetekben kevésbé standar-dizált; friss minta szüksé-gessége; immunfenotipikus „shifttek” álnegatív ered-ményhez vezethetnek*	igen
qPCR/ddPCR	konszenzus vagy betegspecifi-kus primerek/próbák alkalmazásával történő, nukleinsavala-pú vizsgálat	10^{-5} (0,001%)	objektív; számszerűsít-hető eredmény; nincs szükség friss mintára; standardizálható; magas érzékenység; viszonylag alacsony fajlagos költség	magas laborigény; bizonyos esetekben hosszú átfutási idő	igen
NGS	specifikus molekuláris eltérések vagy mintázatok azonosítása, kvantifikációja, valamint követé-se (IgH, IgK, IgL, TCR, PV, SNV)	$10^{-5}-10^{-6}$ (0,001–0,0001%)	legnagyobb érzékeny-ség; számszerűsíthető eredmény; nincs szükség betegspecifikus prime-rek/ próbák alkalmazá-sára; nincs szükség friss mintára	drága; magas laborigény; magas átfutási idő; jelenleg alacsony standardizáció	igen

FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, PET-CT: pozitronemissziós tomográfia, qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció, ddPCR: digitális droplet polimeráz láncreakció, NGS: új generációs szekvenálás, IgH: immunoglobulin nehézlánc, IgK: immunoglobulin kappa lánc, IgL: immunoglobulin könnyűlánc, TCR: T-sejt-receptor, PV: fázisvariáns, SNV: egynukleotid-variáns

*Abban az esetben, amennyiben LAIP (leukemia associated immunophenotype) fenotípus kerül meghatározásra DfN (different from normal immunophenotype) nélkül

történő MRD-követés egyik legfontosabb alkalmazási területe az ALL-ben történő immunoglobulin- és T-sejt-receptor átrendeződések követése. A klonális immunoglobulin (Ig) és T-sejt-receptor (TCR) génátrendeződések specifikus markerek az MRD molekuláris értékelésére a limfoid malignitásokban,

mivel az átrendeződött Ig/TCR gének hipervariábilis régiói hosszú, specifikus nukleotidszekvenciákat tartalmaznak [15]. Bár az elmúlt időszakban a ddPCR és az NGS megjelenésével több alternatíva is rendelkezésre áll, ALL-ben az Ig/TCR nyomonkövetés gold-standard módszere továbbra is az RQ-PCR

[15, 16]. A módszer rendkívül érzékeny, ugyanakkor széles körű alkalmazásának gátat szabhat a rendkívüli laborigénye. A magas laborigény a személyre szabott primerek/próbák tervezésének szükségességéből, azok beállításából, majd validációjából adódik, mely akár limitált számú beteg esetében is több hetet vehet igénybe. Az RQ-PCR-hez hasonlóan a dd-PCR szintén számos különböző molekuláris eltérés (például *BCR::ABL1* fúziós transzkriptum, klonális átrendeződések, hotspot mutációk) követésére alkalmas, ezáltal voltaképpen metodikai alternatívát képez az RQ-PCR-rel szemben. A ddPCR a kvantitatív PCR technikák egy újabb változatának nevezhető, mely elődjével ellentétben nem standard görbékhez viszonyított „relatív kvantifikációt”, hanem „abszolút kvantifikációt” tesz lehetővé [17]. A módszer alapja a reakciótér több ezer – droplet alapú megoldás esetén – csepre történő felosztása, majd a PCR reakció ezen elkülönülő reakcióterekben történő lezajlása, mely által a Poisson-disztribúciónak megfelelően kiszámítható a cseppekben szétoszlott kópiák száma (abszolút kvantifikáció). A módszer szenzitivitása hasonló a RQ-PCR-éhez, ugyanakkor több tanulmányban is magasabb érzékenységet sikerült kimutatni [18–20].

Az NGS-alapú MRD-meghatározás a hematológia forrongó területe. Bár széles körű alkalmazhatóságát, valamint rendkívüli érzékenységet számos esetben bizonyították, a magas fajlagos költség, a standardizáció és a széles körű tapasztalat hiánya, valamint a magas laborigény következtében az NGS-alapú MRD-meghatározás jelenleg egyetlen entitásban sem képezi a rutin laboratóriumi munkafolyamatok részét. Az NGS-alapú MRD-követésnek számos módzata létezik, legyen szó az immunglobulin-génátrendeződések követéséről perifériás vérből vagy csontvelőből, vagy akár a betegspecifikus mutációs profil követéséről folyadékbiopsziából [21–24]. Bár NGS alkalmazásával akár egyetlen malignus sejt is kimutatható 1 millió egészséges sejt között (10^{-6} érzékenység), az érzékenységet nagyban befolyásolja a szekvenálási mélység, valamint a bevitt DNS mennyisége. A folyadékbiopsziás mintákon alkalmazott NGS-alapú MRD-követési módszereket a Folyadékbiopszia alkalmazása non-Hodgkin-limfómákban című fejezetben tárgyaljuk részletesen.

AZ MRD ALKALMAZHATÓSÁGA KÜLÖNBÖZŐ HEMATOLÓGIAI ENTITÁSOKBAN

Az MRD klinikai gyakorlatba történő ültetése bizonyos malignitásokban, mint például a CML-ben évtizedes múltra tekint vissza, és a CML legfontosabb prognosztikus és prediktív molekuláris biomarkerének tekinthető. Ezzel ellentétben számos olyan entitás ismert, melyekben az MRD prognosztikus szerepe már bizonyított, ugyanakkor még nem képezi a rutin molekuláris laboratóriumi gyakorlat részét. Ilyen a krónikus limfocitás leukémia (CLL), melyben bár az MRD prognosztikus szerepe megkérdőjelezhetetlen, terápiás döntés befolyásolására jelenleg csak klinikai tanulmányok szintjén van lehetőség. Az elmúlt években az MRD klinikai szerepe számos entitásban vált bizonyossá. Az MRD-vel

kapcsolatos klinikai tapasztalatok folyamatos bővülésével a közeljövőben a biomarker klinikai gyakorlatban történő alkalmazása várható számos entitásban (1. ábra).

KRÓNIKUS MIELOID LEUKÉMIA

A CML a hematológiai malignitások mintabetegsége, egyben a modern innovatív kezelési modalitások sikeres alkalmazhatóságának legfontosabb hivatkozási alapja. A kóros *BCR::ABL1* fúziós gént célzó tirozinkináz-gátló (TKI) kezelések bevezetésével az egykoron rendkívül rossz prognózist mutató betegség esetében ma már bizonyos esetekben a kezelés tartós felfüggesztéséről, az úgynevezett terápiamentes remisszió (TFR) eléréséről beszélhetünk [14, 25, 26].

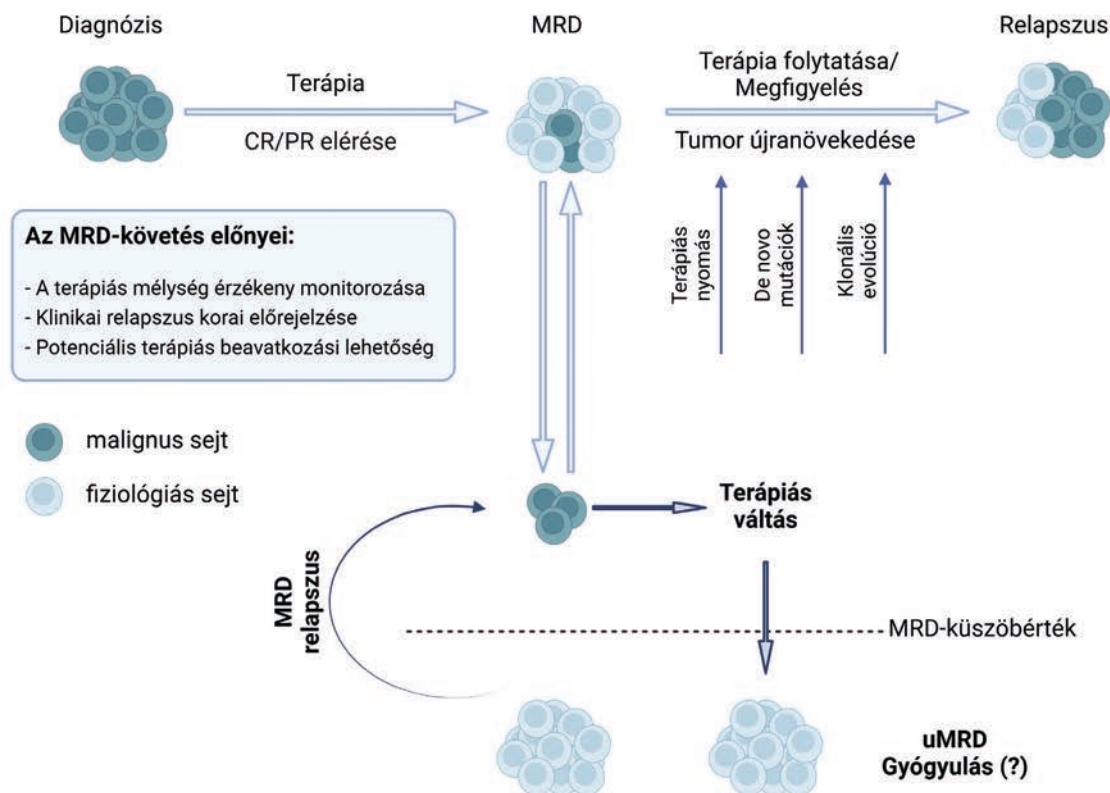
A mindennapi gyakorlatban a CML molekuláris monitorozásának alapját a *BCR::ABL1* fúziós transzkriptum mennyiségi, RQ-PCR-alapú követése jelenti. Technikai szempontból, a fúziós transzkriptum mennyiségi szintjét egy kontroll génhez viszonyítva szükséges megadni, miáltal az eredmények egy nemzetközi skálán kifejezhetővé válnak (*BCR::ABL1*^{IS}). A diagnózis idejében a *BCR::ABL1*^{IS} jellemzően 100%, melyhez viszonyított 3 nagyságrendi csökkenést (0,1%) major molekuláris válasznak nevezzük (MMR – major molecular response; MR3,0). Hasonlóan a 4 nagyságrendi – vagy azt meghaladó – csökkenést mély molekuláris válasznak (DMR – deep molecular response; 0,01%) MR4,0-nak, a 4,5 nagyságrendi csökkenést MR4,5-nek, míg az 5 nagyságrendi csökkenést MR5,0-nak nevezzük (2. ábra).

Az elmúlt években a molekuláris monitorozás a CML kezelésének kihagyhatatlan elemévé vált. Elsővonalbeli TKI-kezelés alatt a molekuláris válasz mélységének megítélése a kezelés kezdetétől számított 3., 6., 12. és 18. hónapban prognosztikus jelentőséggel társul. Mindemellett a molekuláris mélység a terápia sikerességének meghatározására szolgál, miáltal a beteg „optimális válasz”, „figyelmeztető jel” és „terápiás kudarc” kategóriákba sorolandók [27–29]. Míg „optimális válasz” esetén hosszú, tartós remisszióra számíthatunk, addig a „terápiás kudarc” vagy „figyelmeztető jel” esetében szükséges a beteg adherenciájának felmérése, esetleges gyógyszer-interakciók kizárása, valamint rezisztenciára irányuló mutációanalízis elvégzése, végső soron a terápiás stratégia módosítása. Ez utóbbi az *ABL1* gén kinázdoménjének mutációanalízisét jelenti, mely támpontot nyújthat a klinikus számára a következő vonalbeli TKI-gátlószert kiválasztásához.

Intézetünkben, a nemzetközi irányelvekkel összhangban közel 20 éve végezzük a CML-ben szenvedő betegek molekuláris nyomon követését, ami megközelítőleg 800 beteg rendszeres molekuláris nyomon követését jelenti, legyen szó *BCR::ABL1* fúziós transzkriptum követéséről és/vagy a TKI-rezisztencia-mutációk Sanger-szekvenálással történő analíziséről [14, 30].

AKUT MIELOID LEUKÉMIA

Az akut mieloid leukémia a mieloid rendszert érintő, kedvezőtlen túléléssel társuló hematológiai malignitás. Bár az intenzív kemo-immunterápiás kezelések az esetek 70%-ában teljes

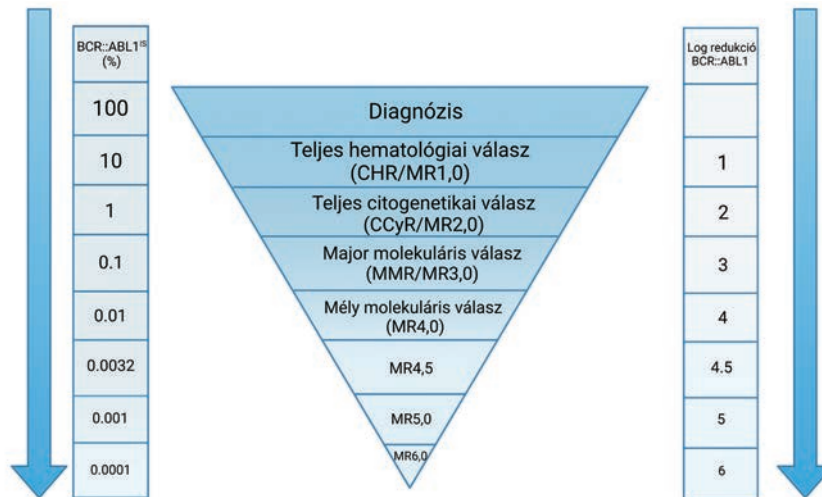


1. ÁBRA. Mérhető reziduális betegség – összefoglaló ábra. Elsővonalbeli (vagy többetvonalbeli) terápiát követően bizonyos esetekben reziduális malignus sejtek maradhatnak a beteg szervezetében. A reziduális sejtek gyakran parciális vagy akár teljes klinikai válasz ellenére maradnak fenn, miáltal a klinikai vizsgálatok során nem detektálható a betegség jelenléte. Amennyiben a terápia folytatása, esetleg terápia követő megfigyelési periódus következik, a reziduális sejtek addicionális genetikai eltérések hatására vagy spontán klonális evolúción mehetnek keresztül, mely végső soron a betegség relapszusát eredményezheti. E reziduális sejtek kimutatása, valamint objektív kvantifikációja jelenti a mérhető reziduális betegség meghatározását. Az MRD meghatározásával képesek vagyunk a reziduális sejtek kimutatására klinikai remisszió mellett, ezáltal terápiás beavatkozást téve lehetővé. A terápiás beavatkozást követően előállhat uMRD állapot (uMRD: undetectable MRD, kimutathatatlan MRD), mely az adott vizsgálati modalitás érzékenységétől függ, ezáltal a sejtek teljes eliminációjáról nem beszélhetünk. uMRD státusz elérését követően továbbra is felmerülhet „molekuláris relapszus”, azaz klinikai tünetek nélkül a reziduális sejtek visszatérése, amely detektálás hiányában a terápiás nyomás és klonális evolúció következtében szintén klinikai relapszushoz vezethet

remissziót eredményeznek, a betegek megközelítőleg 30–80%-ában a betegség relapszusára lehet számítani az első két éven belül [31, 32]. Bár az MRD AML-ben betöltött prognosztikus szerepe intenzív kemoterápiás megközelítés mellett, valamint allogén hematopoetikus őssejt transzplantációt megelőzően évek óta ismert, az elmúlt időszakban számos új, innovatív, célzott, kevésbé toxikus gyógyszer (például IDH1-gátlók, FLT3-gátlók, venetoklax, azacitidin) jelent meg, melyek hatására lehetőség adódhat az MRD-vezérelt terápiás döntéshozatal beiktatására a kezelése során [32–35]. Mindennek tükrében a jelenleg alkalmazott MRD-meghatározási időpontok, valamint alkalmazott küszöbértékek validálására, potenciális újragondolására lehet szükség, melyhez további, nagy esetszámú vizsgálatok szükségesek [32]. Napjainkban a „European Leukemia Net” (ELN) ajánlásai alapján az MRD meghatározása a betegség követése során rutinszerűen javasolt. Az ajánlások szerint az MRD meghatározása történhet

MFC alkalmazásával (LAIP/DfN fenotípusok meghatározása; LAIP – leukemia associated immunophenotype, DfN – different from normal immunophenotype), illetve számos ismert egyéb molekuláris biomarker is rendelkezésre áll, úgymint: *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA* fúziók vagy *NPM1*-mutációk [32, 36–39].

A Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológiai Kutatócsoportja által fejlesztett „mieloid NGS-panel” alkalmazásával intézetünkben lehetőségünk nyílik a gyermek- és felnőttkori AML-ben szenvedő betegek komplex molekuláris hátterének megismerésére, elősegítve a betegek megfelelő prognosztikus csoportba történő besorolását, továbbá terápiás, valamint potenciális MRD-célpontok azonosítását. Intézetünkben a *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA* fúziós transzkriptumok követésére RQ-PCR, míg az *NPM1*-mutációk követésére magas érzékenységű ddPCR-alapú módszer áll rendelkezésre.



2. ÁBRA. Molekuláris válasz mélysége CML-ben. A diagnózis pillanatában a *BCR::ABL1*¹⁵ jellemzően 100%. A 100%-hoz viszonyított 3 nagyságrendi csökkenést (0,1%) nevezzük major molekuláris válasznak (MMR: major molecular response; MR3,0). Teljes hematológiai választ 1 nagyságrendi csökkenés, míg teljes citogenetikai választ a kiindulási értékhez viszonyított 2 nagyságrendi csökkenés jelez. Az MMR-t meghaladó úgynevezett mély molekuláris válaszokról a 3 nagyságrendi csökkenést meghaladó esetekben beszélünk (MR4,0; MR4,5; MR5,0; MR6,0), melyek klinikai szempontból a tartós remisszió, valamint a kezelésmentes túlélés legfontosabb tényezőjét képviselik (IS: international scale)

AKUT LIMFOBLASZTOS LEUKÉMIA

A rizikóadaptált protokollok bevezetésével, valamint a széles körű nemzetközi egyeztetéseken alapuló kemoterápiás irányelvek megfogalmazásával a gyermekkori ALL ma már az esetek hozzávetőlegesen 90%-ában gyógyítható betegséggé szelődött [40, 41]. Bár a felnőttkori ALL túlélési adatai ettől elmaradnak, az elmúlt években a fiatal [40 év alatti] felnőtt ALL-es betegek teljes túlélése is javuló tendenciát mutat, döntően a gyermekkori ALL alapján adaptált kezelési modalitások és az új terápiás megközelítések bevezetésének köszönhetően [4, 42, 43]. A terápiás „fegyvertár” bővülésével a kritikus terápiás időpontokban történő rizikóbecslés kiemelt szerephez jutott. Az elmúlt években számos klinikai vizsgálat alapján az MRD meghatározása a túlélés erős és független prediktorának bizonyult, ezáltal napjainkban a rutin betegellátás kihagyhatatlan elemévé vált kezelés közben, valamint kezelést követően egyaránt [44–48].

Napjainkban az MRD értékelésére használt legtöbb vizsgálat a leukémiás blasztoknak megfelelő fenotípusos (MFC) vagy genomikai eltérésekkel (RQ-PCR/NGS) rendelkező populációk azonosítására és nyomon követésére épül. A klinikai gyakorlatban alkalmazni kívánt optimális MRD-küszöbérték meghatározása forrongó terület [49]. Bár jelenleg a 10^{-4} érzékenységi szintet meghaladó MRD-küszöbérték klinikai alkalmazásáról szóló irodalmi adatok ellentmondásosak, számos 10^{-5} – 10^{-6} érzékenységgű módszer áll rendelkezésre [45, 49–51]. Jelenleg a legtöbb, molekuláris MRD-meghatározással kapcsolatos publikált adat (az MFC mellett) az Ig/TCR követésén alapuló RQ-PCR módszerrel kapcsolatban

került leírásra, miáltal a technológia egy magasan validált, széles körben alkalmazott módszernek számít gyermek- és felnőttkori ALL-ben egyaránt [48, 51–54].

Hazánkban jelenleg az ALL követését rutinszerűen MFC alkalmazásával végzik. A Magyar Gyermekonkológiai Hálózat támogatásával, egy 2022 augusztusában indult kezdeményezés keretein belül intézetünk országos centrumként végzi a gyermekkori ALL-ben szenvedő betegek személyre szabott MRD-követését. A projekt részeként munkacsoportunk az EuroMRD hálózat irányelveinek megfelelően, egy nemzetközileg elismert és széles körben alkalmazott DNS-alapú, NGS-t implementáló, személyre szabott RQ-PCR MRD-követési protokollt tett elérhetővé. A módszer részletes leírását a 3. ábrán foglaljuk össze. Hazánkban jelenleg a hematológusok által felterjesztett, kedvezőtlen prognózisú, primer terápiarezisztens vagy relabált B- és T-sejtes ALL-ben szenvedő gyermekek és fiatal felnőttek részére történik az RQ-PCR-alapú MRD-követés beállítása [55].

KRÓNIKUS LIMFOCITÁS LEUKÉMIA

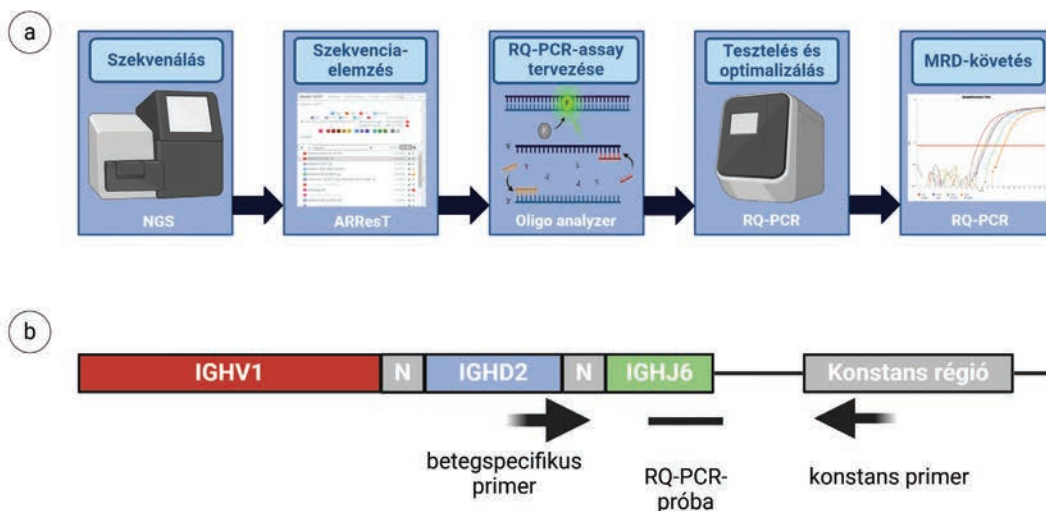
A CLL a nyugati világban leggyakrabban előforduló felnőttkori érett B-sejtes leukémia. Az elmúlt évek gyógyszerfejlesztéseinek köszönhetően a CLL kezelésében forradalmi áttörést sikerült elérni, melynek nyomán egyéb hematológiai entitásokhoz hasonlóan erősödött az igény a klinikai válasz objektív, kvantifikálható felmérése iránt. Az MRD-státusz túlélési kimenetelre gyakorolt prediktív értékét a konvencionális kezelési modalitások összefüggésében számos alkalommal bizonyították [56, 57]. Bár egyéb hematológiai malignitásokkal ellentétben az MRD nem képezi a terápiás irányelvek részét,

a BCL2-gátlószer venetoklax megjelenése a CLL-sejtek eddig soha nem látott, tartós eliminációját tette lehetővé, fokozva az MRD-alapú terápiás döntéshozatal iránti érdeklődést [58–60]. A BCL2-gátlószerekkel végzett tanulmányok alapján az MRD megtartotta prediktív értékét, ezáltal felmerült az MRD új helyettesítő végpontként történő alkalmazásának lehetősége [61–63].

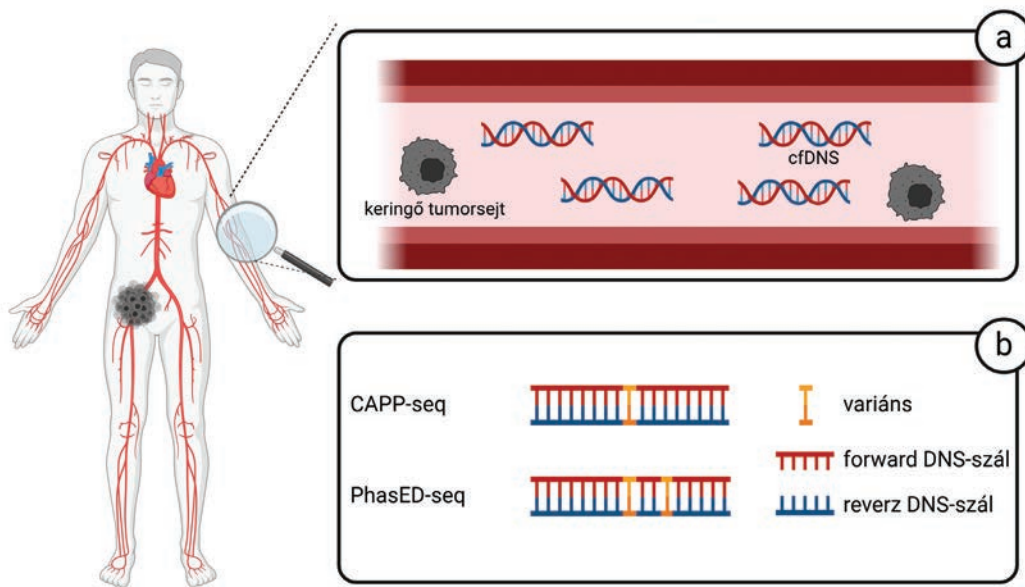
Napjainkban három módszer áll rendelkezésünkre az MRD mérésére CLL-ben: MFC, RQ-PCR valamint az NGS. Míg az RQ-PCR alkalmazása nem terjedt el, az Európai CLL Kutatási Konzorcium ('European Research Initiative on CLL', ERIC) által létrehozott, harmonizált és folyamatosan optimalizált CLL-specifikus MFC-panel létrejöttének köszönhetően napjainkban az áramlási citometria tekinthető a leginkább elterjedt módszernek [10, 64–67]. Az ultraszenzitív (akár 1:1,000,000 CLL-sejt/fiziológiás sejt), immunoglobulin meghatározására és követésére képes NGS-alapú MRD-meghatározás ma már több klinikai tanulmány részét képezi [63, 68]. Bár a 10^{-4} érzékenységet meghaladó MRD-meghatározás egyre népszerűbb a klinikai vizsgálatok szintjén, potenciális helye a klinikai gyakorlatban továbbra is aktív vita tárgyát képezi. Intézetünkben 2022 óta kutatási projekt keretén belül érhető el az NGS-alapú MRD-meghatározás venetoklax-obi-nutuzumab kombinációs elsővonalbeli kezelésben részesülő, CLL-ben szenvedő betegek számára.

FOLYADÉKBIOPSZIA ALKALMAZÁSA NON-HODGKIN-LIMFÓMÁKBAN

A non-Hodgkin-limfómák a hematológiai malignitások heterogén csoportját képviselik, melyek spektruma az agresszív, kemo-immunterápiára jól reagáló, potenciálisan gyógyítható formáktól az indolens, hosszú remissziós időszakokkal jellemezhető gyógyíthatatlan formákig terjed [69]. Napjainkban a kezelésre adott válasz megítélésére, valamint a betegség nyomon követésére elsősorban radiológiai módszereket alkalmaznak, mint a komputertomográfiát (CT), valamint a fluorodezoxiglükóz-18 (FDG) pozitronemissziós tomográfiát (PET-CT). A képkötő vizsgálatoknak azonban számos hátránya van: a vizsgálattal járó sugárterhelés mellett, a válasz értékelése szubjektív lehet, a képkötés felbontása kis tumortömeg esetében (<1 cm átmérő) szuboptimális, továbbá a lokális kezelés okozta hatások gyakran nehezen megkülönböztethetőek a recidíva kialakulásától [70]. Minderre megoldást jelenthetnek a minimálinvazív, folyadékbiopszián (különböző testfolyadékokban található nukleinsavak izolálása és molekuláris biológiai vizsgálata) alapuló, jellemzően NGS-alapú megoldások [71]. A folyadékbiopsziának számos alkalmazási területe van: ismert biomarker (terápiás célpont, rezisztenciamutató) azonosítása és nyomon követése; Ig/TCR génátrendeződések nyomon követése (IG-HTS, immunoglobulin high-throughput sequencing; TCR-HTS, T-cell receptor



3. ÁBRA. Személyre szabott, RQ-PCR-alapú MRD-követés ALL-ben. a) A munkafolyamat öt fontosabb részből tevődik össze: szekvenálás, szekvencaelemzés, primertervezés, tesztelés/optimalizálás, valamint MRD-követés. Az első fázisban „konszenzus primereket” felhasználva NGS alkalmazásával meghatározzuk a beteg Ig/TCR szekvenciáját. A szekvenálás eredményét immuninformatikai – ARResT – analízis során értékeljük, ezáltal meghatározható a klónok száma, valamint a különböző klónok szekvenciája. Az ezt követő lépésben a megismert szekvenciákra betegspecifikus primereket tervezünk, melyeket a megfelelő próbával/reverz primerrel párosítunk. Az immunoglobulin-alapú követés során alkalmazott primerek/próbák elhelyezkedése/működése a b) ábrán látható. Az ekképpen összeállított személyre szabott primer/próba kombinációt ezt követően tesztelni, valamint optimalizálni szükséges, mely által meghatározásra kerülnek a követhető klónok, valamint a módszer érzékenysége. Az optimalizálással az MRD-követés beállítása befejeződött és a laboratórium készen áll a személyre szabott MRD-mérésekre. b) V1-D2-J6 átrendeződést mutató immunoglobulin. Az alkalmazott reverz primer az Ig konstans régiójához kötődik, ezt konszenzus/nem személyre szabott primernek nevezzük. Hasonlóan a fluoreszcensen jelölt próba sem beteg-, hanem J-gén-specifikus, azaz bizonyos J-gén-átrendeződések esetében különböző próbák alkalmazhatóak. Ami a vizsgálatot betegspecifikussá teszi, az a forward primer szekvenciája, amelyet az Ig legspecifikusabb CDR3 (cluster of differentiation 3) régiójára tervezünk



4. ÁBRA. Innovatív folyadékbiopsziás megközelítések: CAPP-Seq/PhasED-Seq. a) A folyadékbiopszia alatt a tumorból (aktív/passzív módon) felszabaduló nukleinsavak vizsgálatát értjük, mely lehet DNS (cfDNS – cell free DNA, nem feltétlenül daganateredetű, ctDNS – circulating tumor DNA, a cfDNS tumoros frakcióját jelöli), RNS, mikro-RNS (miRNS), vagy akár messenger RNS molekula. A folyadékbiopsziás vizsgálatokat a vér plazmafrakciójából végezzük, a sejtes elemek centrifugálás során történő szeparációját követően, mely speciális folyadékbiopsziás mintavételi csövek alkalmazását előfeltételezi. b) A CAPP-Seq vizsgálat alapját a genetikai profil ctDNS-frakció alapján történő felállítása, majd ezt követően a ctDNS-szintek kvantifikációja képezi. Ezzel szemben a PhasED-Seq a PV-k (fázisvariánsok) egy ctDNS-fragmentumon belüli detektálásán alapul. Fázisvariánsnak két, egymáshoz közel álló variáns együttes detektálását nevezzük

high-throughput sequencing]; ctDNS-quantification multigén NGS-panellekkel (CAPP-seq), vagy ultranagy érzékenységű technológiákkal (PhasED-seq). Jelen közleményünkben utóbbi két innovatív felhasználási területre koncentrálnak (4. ábra).

A CAPP-seq [cancer personalized profiling by deep sequencing] az elmúlt években megjelent, nagy áteresztőképességű, átfogó vizsgálati modalitás, mely alapja a genetikai profil keringő tumor-DNS-frakció alapján történő felállítása, majd ezt követően a ctDNS-szintek kvantifikációja (mértékegység: hGE/ml plazma: haploid genom ekvivalens/ml plazma) [23]. A módszer általános jellegéből fakadóan széles spektrumon alkalmazható, a szolid daganatoktól egészen a hematológiai malignitásokig. Az elmúlt évek tanulmányait követően mind szolid, mind hematológiai malignitásokban sikerült megerősíteni azt a feltételezést, miszerint a kezelést követő ctDNS-szint prognosztikus jelentőséggel bír. Diehl és mtsai. tanulmánya alapján, kolorektális karcinómában a sebészeti beavatkozást követően a kimutathatatlan ctDNS-szint hosszú betegségmentes időszakokkal korrelált [72]. Hasonló megállapításra jutott az Ash Alizadeh által vezetett stanfordi munkacsoport diffúz nagy B-sejtes limfómában (DLBCL). Kezelést követő ctDNS-analízis során a progressziómentes túlélésben szignifikáns különbség volt tapasztalható ($p=0,0003$) azon DLBCL-betegek közt, akiknél kimutatható, illetve kimutathatatlan ctDNS-mennyiséget észleltek [73]. A CAPP-Seq mind az orvosi képző eljárások felbontá-

sánál, mind az IG-HTS alapú molekuláris módszerekkel érzékenyebben képes kimutatni a tumorvolumen, emellett a módszer jellegéből adódóan specifikusabb, mint a jelenleg alkalmazásban levő vizsgálati modalitások, miáltal ideális MRD-monitorozási módszer lehet a jövőben [23, 70, 73].

A multigén NGS-panellek történő ctDNS-meghatározást követően, a 2021-ben megjelenő ultraszenzitív fázisvariáns-szekvenálás (PhasED-seq) tovább bővítette a molekuláris diagnosztikai palettát. A PhasED-seq az úgynevezett „fázisvariánsok” (PV: phased variant) szekvenálásán alapul, mely voltaképpen azonos DNS-fragmentumon (gyakorlati szempontból azonos szekvenálási „readen”) található két variáns együttes jelenlétének detektálását jelenti. A módszer alkalmazásával számottevően csökkenthető a duplex szekvenálásból adódó „háttérhíbarata”, ezáltal potenciálisan korábban nem látott MRD-mélység érhető el [24]. Bár a módszer rendkívül ígéretes, alkalmazásának gátat szabhat az entitás biológiai jellemzőiből adódó PV-k gyakorisága. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján a PV-k igen heterogén előfordulási sűrűséget mutatnak a különböző daganattípusokban, és elsősorban a B-sejtes limfómák „sztereotipikus” genomikus pozícióiban figyelhetők meg (például a fiziológiás vagy atípusos szomatikus hipermutációnak köszönhetően) [24]. Bár jelenleg kevés adat áll rendelkezésünkre, 213 B-sejtes limfómában szenvedő beteg összesen 678 mintáján végzett vizsgálat alapján a kimutathatatlan ctDNS-koncentrációval rendelkező betegek

között további 25%-ban sikerült PV-kezelést azonosítani PhasED-seq alkalmazásával [24]. DLBCL-ben szenvedő betegek kezelését követően végzett fázisszekvenálás szignifikáns különbséget mutatott az eseménymentes túlélés tekintetében a PV-kezelést hordozó, valamint „PV-negatív” betegek között [24]. Bár jelenleg kevés adat áll rendelkezésünkre, jelen tudásunk alapján a PhasED-seq egy ígéretes módszer lehet a jövőben, azonban további vizsgálatok szükségesek a potenciális alkalmazási területek (PV-sűrűség) meghatározására. Munkacsoportunk elsőként alkalmazta a módszert follikuláris limfómában [74]. Az előzetes eredmények alapján a módszer alkalmas a keringő tumor-DNS vizsgálatára follikuláris limfómában, ugyanakkor a DLBCL-hez viszonyítva alacsonyabb ctDNS-értékekre számíthatunk. Az eredményeink alapján a ctDNS kimutatása a kezelés során erős összefüggést mutat a kezelésre adott válasszal, és a betegség ctDNS-sel történő sorozatos monitorozása előre jelezheti a klinikai relapszus kialakulását [74].

ÖSSZEFOGLALÁS, JÖVŐBELI LEHETŐSÉGEK

Az elmúlt években a mérhető reziduális betegség a hematológiai malignitások kiemelten fontos biomarkerévé vált. Bár napjainkban az áramlási citometria, valamint a konvencionális nukleinsav-alapú MRD-modalitások, mint az RQ-PCR vagy ddPCR képezik az MRD meghatározásának aranystandardját, az NGS előretörésével reális esély kínálkozott eddig soha nem látott „molekuláris mélységek” elérésére. A folyékony „liquid” frakció analízisével párhuzamosan megjelenő CAPP-,

valamint PhasED-seq eljárások következtében ma már az eddig felsoroltaknál jóval specifikusabb eljárások is elérhetőek, melyek non-invazív voltukból kifolyólag ideális vizsgálati modalitásoknak tűnnek. Az elmúlt években tapasztalható technológiai fejlődés ellenére az MRD klinikai alkalmazásának kérdésköre a jelenkori modern hematológia egyik nagy kihívása. A különböző entitásokban alkalmazott MRD-küszöbértékek meghatározása, a metodikai különbségekből fakadó differenciák, a folyadékbiopszia előretörése, valamint mindezek klinikai gyakorlatban történő prognosztikus vagy prediktív felhasználása a legtöbb entitás esetében jelenleg nem egyértelmű, és további, nagy esetszámú, multicentrikus vizsgálatokat tesz szükségessé. Mindezek ellenére elmondható, hogy az MRD meghatározása a mai modern hematológia megkerülhetetlen elemévé vált, mely várhatóan a mindennapi rutin klinikai betegellátásban is egyre nagyobb szerephez fog jutni a jövőben.

Anyagi támogatás: A közlemény megírásához kapcsolódó munkát támogatta a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K21_137948), az Elixir Hungary, valamint a Nemzeti Orvosbiológiai Alapítvány Nemzeti Tudósképző Akadémia Programja a Kulturális és Innovációs Minisztérium pénzügyi hozzájárulásával. A munka a Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-2024-114 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

IRODALOM

- Király AP, Alpár D, Fésüs V, et al: Az onkokematológia molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereinek alapjai. *Magy Onkol* 60:88-98, 2016
- Chen X, Wood BL: Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev* 31:63-75, 2017
- Kriegsmann K, Manta C, Schwab R, et al: Comparison of bone marrow and peripheral blood aberrant plasma cell assessment by NGF in patients with MM. *Blood Adv* 7:379-383, 2023
- Saygin C, Cannova J, Stock W, et al: Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: methods and clinical context in adult patients. *Haematologica* 107:2783-2793, 2022
- Pierce E, Mautner B, Mort J, et al: MRD in ALL: optimization and innovations. *Curr Hematol Malig Rep* 17:69-81, 2022
- Falini B, Dillon R: Criteria for diagnosis and molecular monitoring of NPM1-mutated AML. *Blood Cancer Discov* 5:8-20, 2024
- Urushihara R, Takezako N, Yoroidaka T, et al: Eight-color multiparameter flow cytometry (EuroFlow-NGF) is as sensitive as next-generation sequencing in detecting minimal/measurable residual disease in autografts of patients with multiple myeloma. *EJHaem* 4:184-191, 2023
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al: EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26:1908-1975, 2012
- Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al: 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 72B:S14-S22, 2007
- Rawstron AC, 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* 27:142-149, 2013
- Soverini S, De Benedittis C, Mancini M, et al: Best practices in chronic myeloid leukemia monitoring and management. *Oncologist* 21:626-633, 2016

- van der Velden VHJ, Dombrink I, Alten J, et al: Analysis of measurable residual disease by IG/TR gene rearrangements: quality assurance and updated EuroMRD guidelines. *Leukemia* 38:1315-1322, 2024
- Alkian M, Gale RP, Appertley JF, et al: Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomol Detect Quantif* 11:4-20, 2017
- Kiss R, Jenei A, Demeter J, Bödör Cs: Molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége krónikus myeloid leukaemiában. *Orvosképzés* 3:535-550, 2021
- Nunes V, Cazzaniga G, Biondi A: An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Mol Diagn* 17:953-963, 2017
- Svaton M, Skotnicova A, Reznickova L, et al: NGS better discriminates true MRD positivity for the risk stratification of childhood ALL treated on an MRD-based protocol. *Blood* 141:529-533, 2023
- Quan PL, Sauzade M, Brouzes E: dPCR: a technology review. *Sensors (Basel)* 18:1271, 2018
- Galimberti S, Balducci S, Guerrini F, et al: Digital droplet PCR in hematologic malignancies: a new useful molecular tool. *Diagnostics* 12:1305, 2022
- Della Starza I, Nunes V, Cavalli M, et al: Comparative analysis between RQ-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 174:541-549, 2016
- Drandi D, Kubickova-Besse L, Ferrero S, et al: Minimal residual disease detection by droplet digital PCR in multiple myeloma, mantle cell lymphoma, and follicular lymphoma: a comparison with real-time PCR. *J Mol Diagn* 17:652-660, 2015
- Monter A, Nomdedéu JF: ClonoSEQ assay for the detection of lymphoid malignancies. *Expert Rev Mol Diagn* 19:571-578, 2019
- Ching T, Duncan ME, Newman-Eerkes T, et al: Analytical evaluation of the clonoSEQ assay for establishing measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. *BMC Cancer* 20:612, 2020
- Newman AM, Bratman SV, To J, et al: An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20:548-554, 2014

24. Kurtz DM, Soo J, Co Ting Keh L, et al: Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 39:1537-1547, 2021
25. Cortes J, Rea D, Lipton JH: Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 94:346-357, 2019
26. Batár P: Krónikus myeloid leukémia: Múlt, jelen, jövő. *Hematol Transzfuziol* 56:17-23, 2023
27. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, et al: Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 28:iv41-iv51, 2017
28. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al: European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 34:966-984, 2020
29. Shah NP, Bhatia R, Altman JK, et al: Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 22:43-69, 2024
30. Kiss R, Király AP, Gaál-Weisinger J, et al: A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. *Magy Onkol* 61:57-66, 2017
31. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, et al: Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol* 29:2758-2765, 2011
32. Tiong IS, Loo S: Targeting measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML): moving beyond prognostication. *Int J Mol Sci* 24:4790, 2023
33. Buckley SA, Wood BL, Othus M, et al: Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica* 102:865-873, 2017
34. Short NJ, Fu C, Berry DA, et al: Association of hematologic response and assay sensitivity on the prognostic impact of measurable residual disease in acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Leukemia* 36:2817-2826, 2022
35. Kayser S, Levis MJ: Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 196:316-328, 2022
36. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al: Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 131:1275-1291, 2018
37. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, et al: 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 138:2753-2767, 2021
38. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al: Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 140:1345-1377, 2022
39. Kövy P, Örfi Z, Bors A, et al: Nucleophosmin1 and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 as measurable residual disease markers in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 16:e0253386, 2021
40. Pui CH, Evans WE: A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 50:185-196, 2013
41. Alpár D, Egyed B, Krizsán Sz, et al: A gyermekkori akut leukaemiák korszerű molekuláris diagnosztikája és kezelése. *Orvosképzés* 3:507-522, 2021
42. Stock W, Luger SM, Advani AS, et al: A pediatric regimen for older adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia: results of CALGB 10403. *Blood* 133:1548-1559, 2019
43. Wieduwilt MJ, Stock W, Advani A, et al: Superior survival with pediatric-style chemotherapy compared to myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in older adolescents and young adults with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: analysis from CALGB 10403 and the CIBMTR. *Leukemia* 35:2076-2085, 2021
44. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 111:5477-5485, 2008
45. Vora A, Goulden N, Wade R, et al: Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 14:199-209, 2013
46. Bartram J, Wade R, Vora A, et al: Excellent outcome of minimal residual disease-defined low-risk patients is sustained with more than 10 years follow-up: results of UK paediatric acute lymphoblastic leukaemia trials 1997-2003. *Arch Dis Child* 101:449-454, 2016
47. Bassan R, Brüggemann M, Radcliffe HS, et al: A systematic literature review and meta-analysis of minimal residual disease as a prognostic indicator in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 104:2028-2039, 2019
48. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, et al: Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 125:3996-4009, 2015
49. Zhang J, Oak J: Challenges of detecting measurable/minimal disease in acute leukemia. *Semin Diagn Pathol* 40:216-220, 2023
50. Wood B, Wu D, Crossley B, et al: Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. *Blood* 131:1350-1359, 2018
51. Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, et al: High-sensitivity next-generation sequencing MRD assessment in ALL identifies patients at very low risk of relapse. *Blood Adv* 6:4006-4014, 2022
52. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al: Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22:771-782, 2008
53. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, et al: Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* 22:989-997, 2008
54. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, et al: Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: study ALL10 from the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol* 34:2591-2601, 2016
55. Kenéz LA: Beszámoló a EuroMRD hálózat éves konferenciájáról. *Hematol Transzfuziol* 56:199-200, 2023
56. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, et al: Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood* 128:2770-2773, 2016
57. Thompson PA, Srivastava J, Peterson C, et al: Minimal residual disease undetectable by next-generation sequencing predicts improved outcome in CLL after chemoimmunotherapy. *Blood* 134:1951-1959, 2019
58. Al-Sawaf O, Robrecht S, Zhang C, et al: S145: Venetoclax-obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukemia: 6-year results of the randomized CLL14 study. *HemaSphere* 7:e064430a, 2023
59. Kater A, Harrup R, Kipps TJ, et al: S201: Final 7-year follow up and retreatment substudy analysis of Murano: venetoclax-rituximab (Venr)-treated patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (R/R CLL). *HemaSphere* 7:e492813f, 2023
60. Fürstenau M, De Silva N, Eichhorst B, et al: Minimal residual disease assessment in CLL: ready for use in clinical routine? *Hemasphere* 3:e287, 2019
61. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst BF, et al: Enduring undetectable MRD and updated outcomes in relapsed/refractory CLL after fixed-duration venetoclax-rituximab. *Blood* 140:839-850, 2022
62. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M, et al: Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 21:1188-1200, 2020
63. Al-Sawaf O, Zhang C, Lu T, et al: Minimal residual disease dynamics after venetoclax-obinutuzumab treatment: extended off-treatment follow-up from the randomized CLL14 study. *J Clin Oncol* 39:4049-4060, 2021
64. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al: A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia* 30:929-936, 2016
65. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, et al: Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom* 94:121-128, 2018
66. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al: International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 21:956-964, 2007
67. Takács F, Kardos I, Czeti Á, et al: A minimális reziduális betegség vizsgálata krónikus limfoid leukémiában. *Hematol Transzfuziol* 53:17-22, 2020
68. Niemann CU, Munir T, Moreno C, et al: Residual disease kinetics among patients with high-risk factors treated with first-line fixed-duration ibrutinib plus venetoclax (Ibr+Ven) versus chlorambucil plus obinutuzumab (Clb+O): The Glow study. *Blood* 140:228-230, 2022
69. László T, Csacsovszky O, Bödör Cs: Új megközelítések a B-sejtes lymphomák kezelésében. *Klin Onkol* 11:139-148, 2024
70. Bratman SV, Newman AM, Alizadeh AA, et al: Potential clinical utility of ultra-sensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. *Expert Rev Mol Diagn* 15:715-719, 2015
71. Nagy Á, Bártai B, Kiss L, et al: Folyadékbiopszia-vizsgálatok alkalmazási lehetőségei az onkohematológiában. *Hematol Transzfuziol* 53:144-156, 2020
72. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al: Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14:985-990, 2008
73. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, et al: Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 8:364ra155, 2016
74. Nagy Á, Bártai B, Hogan G, et al: Phased variants allow robust profiling of circulating tumor DNA in untreated follicular lymphomas. *Blood* 142:1626, 2023