

Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни

Г.А. Цаур¹⁻³, А.М. Попов⁴, Л.Г. Фечина¹, С.А. Румянцев^{4,5}

¹ГБУЗ СО ОДКБ № 1; Россия, 620149, Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32;

²ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

³ФГАОУ ВПО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»; Россия, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19;

⁴ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117998, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

⁵ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru

В статье представлены методические основы и показана прогностическая ценность определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у детей первого года жизни с острыми лейкозами, ассоциированными с перестройками 11q23/MLL. На основании этого сформулирован алгоритм определения МОБ. Показано, что сопоставимость выявления МОБ методами проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени составляет 87,0 %. Конкордантность результатов заметно снижалась на этапе индукции по сравнению с консолидацией/интенсификацией, а также терапией рецидива (78,6; 90,4 и 93,4 % соответственно; $p = 0,002$). В то же время она не зависела от наличия В-линейных предшественников в образце. Сопоставимость результатов качественного выявления МОБ в костном мозге и периферической крови составила 84,5 %. При этом во всех 22 (15,5 %) дискордантных образцах МОБ была выявлена в костном мозге, но не в периферической крови. Несмотря на высокий уровень сопоставимости результатов, наличие МОБ в периферической крови на различных этапах терапии не показало самостоятельной прогностической значимости. В то же время при проведении многофакторного анализа только сохранение МОБ в точке наблюдения 4 в костном мозге являлось независимым прогностически неблагоприятным фактором при лечении острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни по протоколу MLL-Vabu (отношение опасности 7,326; 95 % доверительный интервал 2,378–22,565).

Ключевые слова: перестройки 11q23/MLL, острые лейкозы у детей первого года жизни, минимальная остаточная болезнь

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-62-74

Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias

G.A. Tsaur¹⁻³, A.M. Popov⁴, L.G. Fechina¹, S.A. Romyantsev^{4,5}

¹Regional Children Clinical Hospital No 1; 32 S. Deryabinoy St., Ekaterinburg, 620149, Russia;

²Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Ekaterinburg, 620026, Russia;

³Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yel'tsin; 19 Mira St., Ekaterinburg, 620002, Russia;

⁴Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev,

Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117998, Russia;

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

Hereby we present methodological aspects and prognostic significance of minimal residual disease (MRD) monitoring in infant acute leukemias. Based on our own experience we made algorithm for detection of MRD in this group of patients. We conclude that general concordance between MRD detection by flow cytometry and real-time polymerase chain reaction (PCR) for fusion gene transcripts achieved 87.0 %. Concordance was significantly lower during induction in comparison to consolidation/intensification and relapse treatment (78.6; 90.4 and 93.4 %, correspondingly; $p = 0.002$). It was not dependent on presence of normal B-cell precursors. Concordance between MRD results obtained by qualitative real-time PCR in bone marrow and peripheral blood samples was 84.5 %. Interestingly, all discrepant results (22 samples 15.5 %) were MRD-positive in bone marrow, but negative in peripheral blood. Despite high qualitative concordance rate between MRD detection in bone marrow and peripheral blood samples we could not show prognostic value of MRD monitoring in peripheral blood by fusion gene transcripts. Multivariate analysis revealed that MRD-positivity at time-point 4 in bone marrow was the only significant and independent prognostic factor of unfavorable outcome in the observed group of patients (hazard ratio 7.326; 95 % confidence interval 2.378–22.565).

Key words: 11q23/MLL rearrangements, infant acute leukemias, minimal residual disease

Введение

Острые лейкозы (ОЛ), ассоциированные с перестройками гена *MLL* (myeloid-lymphoid leukemia, mixed-lineage leukemia), расположенного в хромосомном регионе 11q23 [1–3], наиболее часто встречаются у де-

тей первого года жизни, поэтому в рамках данной работы мы остановимся только на этой возрастной группе.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей старше 1 года: неуклонно повышаются общая

и бессобытийная выживаемость (БСВ) пациентов, снижается частота развития рецидивов. В то же время результаты терапии ОЛЛ у детей первого года жизни остаются неудовлетворительными: БСВ редко превышает 45 %, а основной причиной неудачи терапии являются рецидивы [4–14]. На сегодняшний день наиболее эффективным способом прогнозирования развития рецидивов считается определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Для этой цели применяются такие высокочувствительные методы клинической лабораторной диагностики, как многоцветная проточная цитометрия и различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако биологические особенности ОЛ у детей первого года жизни требуют разработки специальных методов выявления МОБ с последующим сравнительным анализом полученных результатов между ними и оценкой вероятности развития рецидивов.

При использовании метода проточной цитометрии для мониторинга МОБ у детей первого года жизни с ОЛЛ основными сложностями являются особенности иммунофенотипа опухолевых клеток при наличии перестроек гена *MLL*, а также нестабильность экспрессии антигенов во время терапии [15, 16]. Кроме того, чаще всего описываются только алгоритмы оценки МОБ у детей с CD10-позитивными В-линейными ОЛЛ, в то время как у детей первого года жизни преобладают CD10-негативные варианты. Несмотря на то, что при CD10-позитивном и CD10-негативном вариантах ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) применяется одинаковая панель антигенов, отдельные маркеры используются в различных целях (табл. 1). Исходя из этого, нами было сформулировано 2 различных алгоритма анализа данных (рис. 1). Для

успешного определения МОБ нужно также учитывать, что фенотип опухолевых клеток может существенно меняться во время терапии [17, 18].

Еще одним способом мониторинга МОБ, использовавшимся нами, является обнаружение химерных транскриптов с участием *MLL* методами качественной обратнo-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) и/или количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для выявления химерных транскриптов. Этот метод дает хорошую возможность контролировать МОБ у пациентов первого года жизни, так как перестройки 11q23/*MLL* встречаются у большинства из них [4, 5, 10, 19–21], а данный метод молекулярной диагностики является стандартизованным, легко воспроизводимым и относительно быстро выполнимым [22–24]. Более того, ОТ-ПЦР позволяет получать результаты определения МОБ, сопоставимые с результатами выявления перестроек генов *Ig/TCR* [25, 26] и проточной цитометрии [27].

Сравнительная характеристика различных методов определения МОБ приведена в табл. 2.

Актуальность создания системы мониторинга МОБ у детей первого года жизни обусловлена еще и тем, что в нашей стране Л.Г. Фечиной разработан оригинальный отечественный протокол *MLL-Baby* для терапии ОЛЛ у детей этой возрастной группы [30], который предусматривает многократное определение МОБ (рис. 2). Это, в свою очередь, обуславливает необходимость установления роли наличия и величины МОБ в различные точки наблюдения для прогнозирования исходов терапии.

Определение МОБ невозможно без всесторонней оценки инициальных характеристик лейкозных клеток, включая наличие и тип перестройки 11q23/*MLL*, а также иммунофенотипа опухолевых бластов с использованием стандартного цитогенетического исследования, флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), ПЦР, проточной цитометрии. Более того, считается, что целый ряд объективных факторов затрудняют диагностику ОЛ у детей первого года жизни: криптические варианты транслокаций, большое разнообразие перестроек 11q23/*MLL*, существование различных типов химерных транскриптов с участием гена *MLL*, нестабильность иммунофенотипа опухолевых бластов [16, 31–38].

Показано, что клинические особенности ОЛ и чувствительность к терапии зависят не только от наличия перестройки 11q23/*MLL per se*, но и от типа гена-партнера [39, 40], которых на сегодняшний день известно 79 [41]. Наиболее частыми партнерами *MLL* являются гены *AF4*, *MLLT1*, *MLLT3*, *MLLT10*, *MLLT4*, *ELL*, на долю которых суммарно приходится около 85 % всех случаев *MLL*-позитивных ОЛ как у детей, так и у взрослых [31, 41, 42]. За счет оставшихся 15 % и достигается большое разнообразие химерных генов с участием *MLL*, и именно их биологические особенности и клинические характеристики ОЛ, ассоцииро-

Таблица 1. Задачи применения различных антигенов для определения МОБ при CD10-позитивном и CD10-негативном ВП-ОЛЛ

Маркер	CD10-позитивный ВП-ОЛЛ	CD10-негативный ВП-ОЛЛ
CD19	Выделение всех клеток В-линии	Выделение всех клеток В-линии
CD10	Выделение опухолевых клеток	Исключение из анализа нормальных ВП
CD20	Выделение опухолевых клеток, исключение из анализа В-лимфоцитов	Исключение из анализа нормальных ВП и В-лимфоцитов
CD34	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток
CD58	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток
CD38	Дифференцирование опухолевых клеток от нормальных ВП	Дифференцирование опухолевых клеток от периферической крови
CD45	Выделение опухолевых клеток	Выделение опухолевых клеток

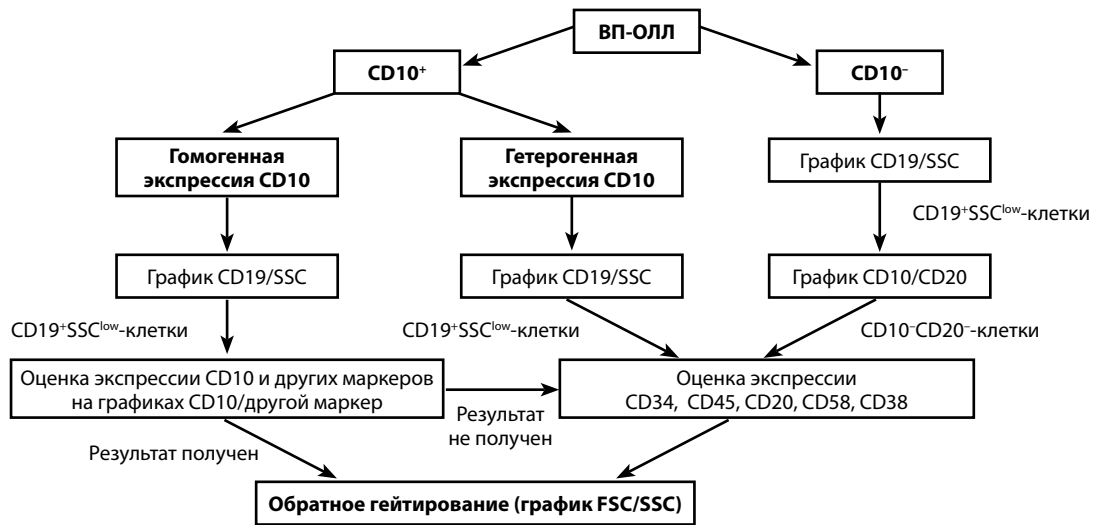


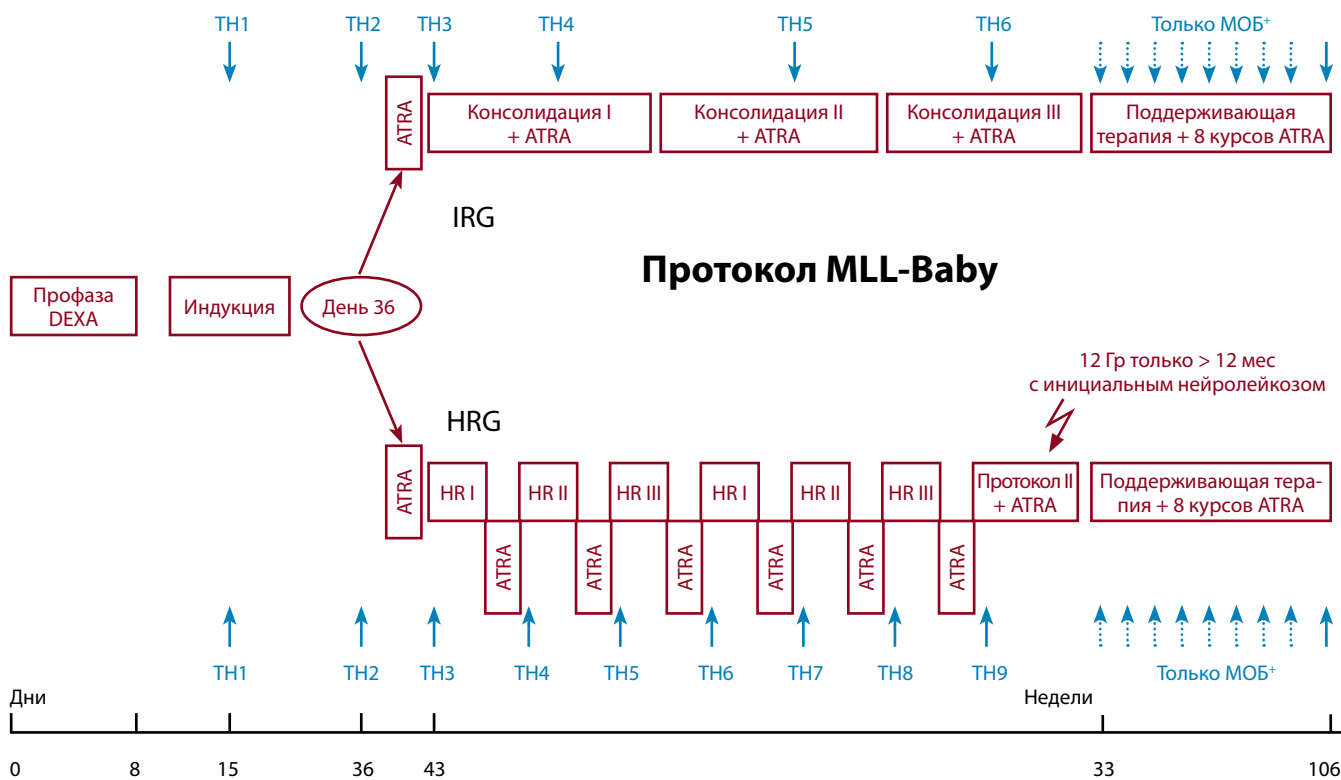
Рис. 1. Алгоритм анализа данных проточной цитометрии для мониторинга МОБ при CD10-позитивном и CD10-негативном вариантах ВП-ОЛЛ

Таблица 2. Характеристика различных методов, применяемых для определения МОБ у пациентов с ОЛЛ (приводится по [28, 29] с дополнениями)

Показатель	Метод		
	определение перестроек генов <i>Ig</i> и <i>TCR</i> методом ПЦР-РВ	определение химерных транскриптов методом ПЦР-РВ	многоцветная проточная цитометрия
Чувствительность	10^{-4} – 10^{-5}	10^{-4} – 10^{-6}	10^{-4} – 10^{-5} (зависит от количества вносимых клеток)
Количественный диапазон	10^{-2} – 10^{-4}	10^{-4} – 10^{-5}	Варьирует в различных исследованиях
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> • Применимость для подавляющего большинства пациентов с ОЛЛ; • высокая чувствительность; высокая степень стандартизации; • доказанная надежность при использовании в качестве стратификационного критерия; • исходный материал (ДНК) стабилен при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> • Высокая чувствительность; • стабильность мишени во время курса терапии; • быстрота; • относительная простота выполнения; • для наиболее частых химерных транскриптов имеется стандартизованная методика 	<ul style="list-style-type: none"> • Применимость для подавляющего большинства пациентов с ОЛЛ; • быстрота; • возможность количественной оценки результата; • источник дополнительной информации о нормальных и опухолевых клетках; • стандартизация в рамках проводимых протоколов терапии
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> • Большая длительность; • возможная нестабильность выбранных маркеров (феномен клональной эволюции); • для проведения теста требуется высокий уровень знаний и опыта 	<ul style="list-style-type: none"> • Применимо только у части пациентов (40–45 %); • полная стандартизация проведена только для <i>BCR-ABL</i>; для остальных химерных генов разработаны только условия проведения ОТ-ПЦР; • существует риск ложнопозитивных результатов вследствие контаминации; • исходный материал (РНК) малостабилен при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> • Изменение иммунофенотипа во время терапии; • В-линейная регенерация может затруднять проведение анализа; • низкая клеточность во время и после индукции может затруднять проведение анализа; • для проведения теста требуется высокий уровень знаний и опыта
Применимость	90–95 %	<ul style="list-style-type: none"> • <i>BCR-ABL</i> (5–8 % детей и 30–35 % взрослых с ВП-ОЛЛ); • <i>TCF3-PBX1</i> (1–2 % детей и взрослых); • перестройки <i>MLL</i> (70–80 % детей младше 1 года; 3–5 % детей старше 1 года; 5–7 % взрослых); • <i>ETV6-RUNX1</i> (20–25 % детей) 	> 95 % (зависит от количества одновременно определяемых маркеров)

ванных с редкими перестройками гена *MLL*, наименее изучены. Традиционно считается, что наиболее неблагоприятной при ОЛЛ является транслокация $t(4;11)/MLL-AF4$, в то время как прогноз для пациентов

с $t(11;19)/MLL-MLL1$ и $t(9;11)/MLL-MLL3$ несколько лучше [40]. С другой стороны, в рамках проспективного исследования Interfant-99 пациенты с любой из вышеперечисленных транслокаций имели сходную



Критерии стратификации:

- HRG – t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 или день 36/43 nonresponder;
- IRG – любые другие перестройки 11q23/MLL или отсутствие перестроек 11q23/MLL в случае достижения клиничко-гематологической ремиссии на 36-й день.

Рис. 2. Схема протокола MLL-Baby с указанием точек наблюдения (ТН), в которые проводилась оценка МОБ

величину БСВ [5]. Наиболее неблагоприятными транслокациями при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) являются t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10 и t(6;11)(q27;q23)/MLL-MLLT4 [39].

Таким образом, оценка МОБ на основе анализа инициальных цитогенетических, молекулярно-генетических и иммунофенотипических свойств опухолевых blastов при ОЛ у детей первого года жизни является актуальным вопросом детской гематологии/онкологии.

Материалы и методы

Для сравнения методов выявления МОБ – проточной цитометрии и ОТ-ПЦР – в анализ был включен 401 образец костного мозга (КМ), полученный от 65 пациентов первого года жизни с ОЛЛ. МОБ методом проточной цитометрии определяли на приборах FACS Canto, FACS Canto II и FACS Aria (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 4.0–6.1 (Becton Dickinson, США). Результат определения МОБ рассчитывали в виде процентного содержания опухолевых клеток среди всех ядросодержащих клеток КМ. Образцы КМ считали МОБ-позитивными при величине МОБ > 0,01 %. При этом для большинства образцов удалось достичь аналитической чувствительности в 0,001 %. Методические осо-

бенности технологии проточной цитометрии для мониторинга МОБ были описаны нами ранее [17, 43].

Перестройки 11q23/MLL выявляли методами стандартной цитогенетики, FISH, ОТ-ПЦР по ранее описанным протоколам [35, 36, 44]. Для исключения образцов низкого качества из анализа перед проведением ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ выполняли оценку качества РНК с использованием микроструйных чипов RNA 6000 Nano LabChip (Caliper Technologies, США) на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Германия) согласно инструкции производителя. В дальнейшую работу брали образцы, в которых показатель целостности РНК превышал 4,2 [45].

В исследование по оценке прогностической значимости выявления МОБ методом ПЦР-РВ было включено 53 пациента с ОЛЛ и установленным типом перестроек гена MLL, получавших лечение по протоколу MLL-Baby. В исследуемой группе было 20 (37,7 %) мальчиков и 33 (62,3 %) девочки, медиана возраста составила 5,3 (0,03–11,80) месяца. У 25 (47,2 %) пациентов был выявлен химерный транскрипт MLL-AF4, у 10 (18,9 %) – MLL-MLLT3, у 9 (17,0 %) – MLL-MLLT1, у 5 (9,4 %) – MLL-MLLT10, у 4 (7,5 %) – MLL-EPS15. МОБ определяли в 142 парных образцах КМ и периферической крови. Количественную ПЦР-РВ с чувствительностью не ниже 10⁻⁴ проводили согласно реко-

мендациям международного протокола «Европа против рака» [22, 23].

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение SPSS 18.0, Statistica 8.0, R-statistics. При сравнении 2 групп пациентов по количественным признакам использовали критерий Манна–Уитни. Результаты терапии оценивали по кривым БСВ, построенным по методу Каплана–Майера, а также по кумулятивной вероятности развития рецидива. Для сравнения кривых использовали непараметрические log-rank критерий и критерий Грея соответственно. Стандартную ошибку рассчитывали по формуле Гринвуда. Расчет отношения опасности (ОО) с 95 % доверительным интервалом (ДИ) был проведен по методу Кокса в однофакторной и многофакторной моделях. Параметры сравнивали с использованием теста Вальда. Все различия считали достоверными при $p < 0,05$. Информированное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур было получено во всех случаях.

Результаты

Качественная сопоставимость результатов проточной цитометрии и ОТ-ПЦР в 401 образце КМ составила 87,0 %. При этом в 50 образцах МОБ была обнаружена только в ходе ПЦР, и лишь в 2 – только при проточной цитометрии. Сопоставимость результатов была достоверно ниже в образцах, взятых на этапе индукционной терапии ($n = 131$; 78,6 %) по сравнению с образцами этапов консолидации/интенсификации ($n = 209$; 90,4 %) и терапии рецидива ($n = 61$; 93,4 %) ($p = 0,002$). В то же время не выявлено значимых различий между 3 точками наблюдения (15-й, 36-й и 43-й дни) во время индукционной терапии ($p = 0,098$) (рис. 3).

Образцы пациентов с наличием химерного транскрипта *MLL-MLLT3* имели наименьшие показатели сопоставимости данных проточной цитометрии и ОТ-ПЦР по сравнению с теми, у которых выявлялись *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-EPS15* ($p < 0,001$) (рис. 4). Наличие в образце нормальных ВП не влияло на сопоставимость результатов обнаружения МОБ ($p = 0,838$).

Несмотря на то, что прямое количественное сопоставление результатов определения МОБ двумя данными методами невозможно, кинетика величины МОБ во время терапии сходна для проточной цитометрии и ПЦР-РВ (рис. 5). Вследствие этого у пациентов, у которых определяется химерный транскрипт с вовлечением *MLL*, возможно одновременное применение данных методов. Во время индукционной терапии и в начале консолидации/интенсификации, когда

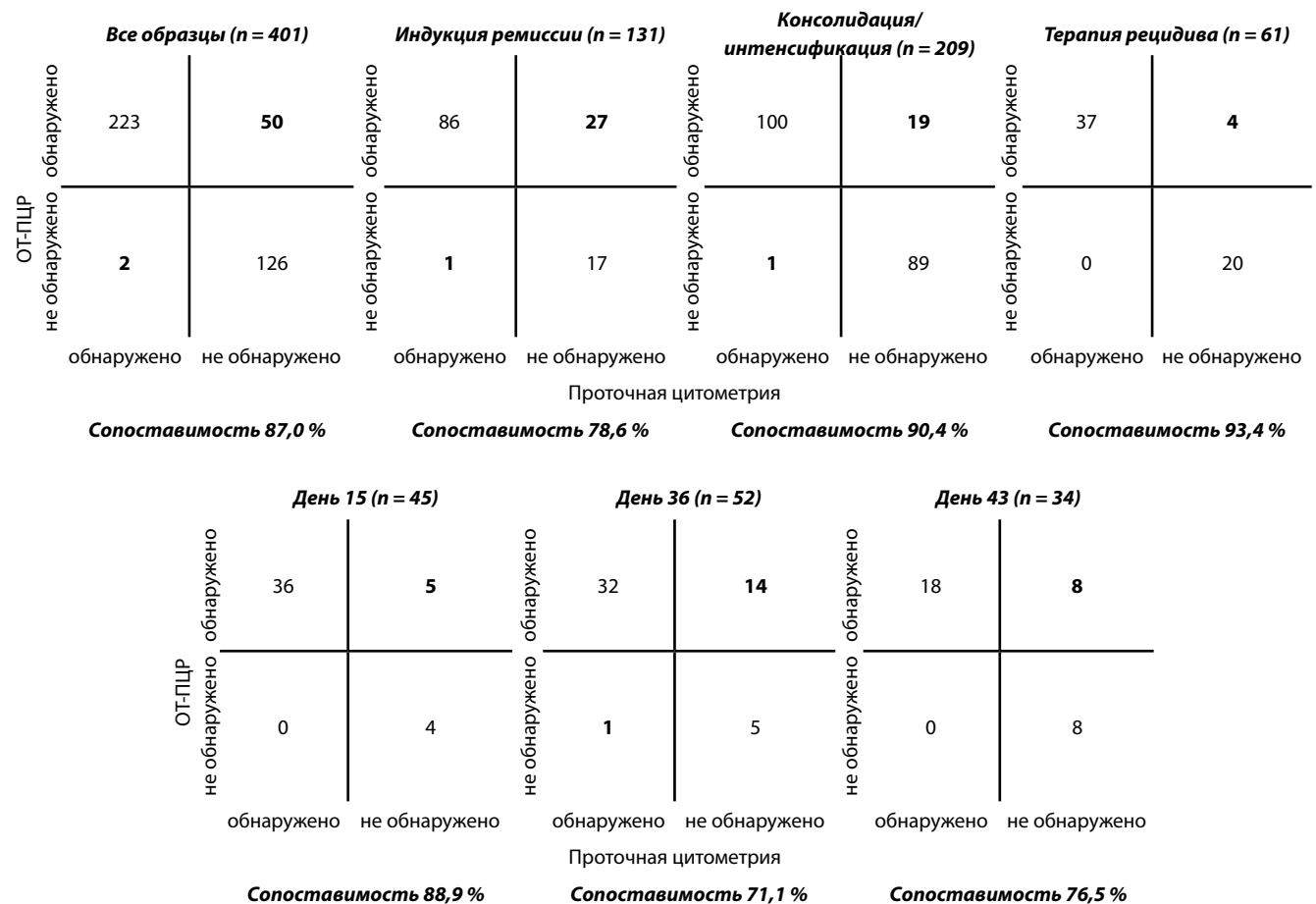


Рис. 3. Сопоставимость выявления МОБ на разных этапах терапии

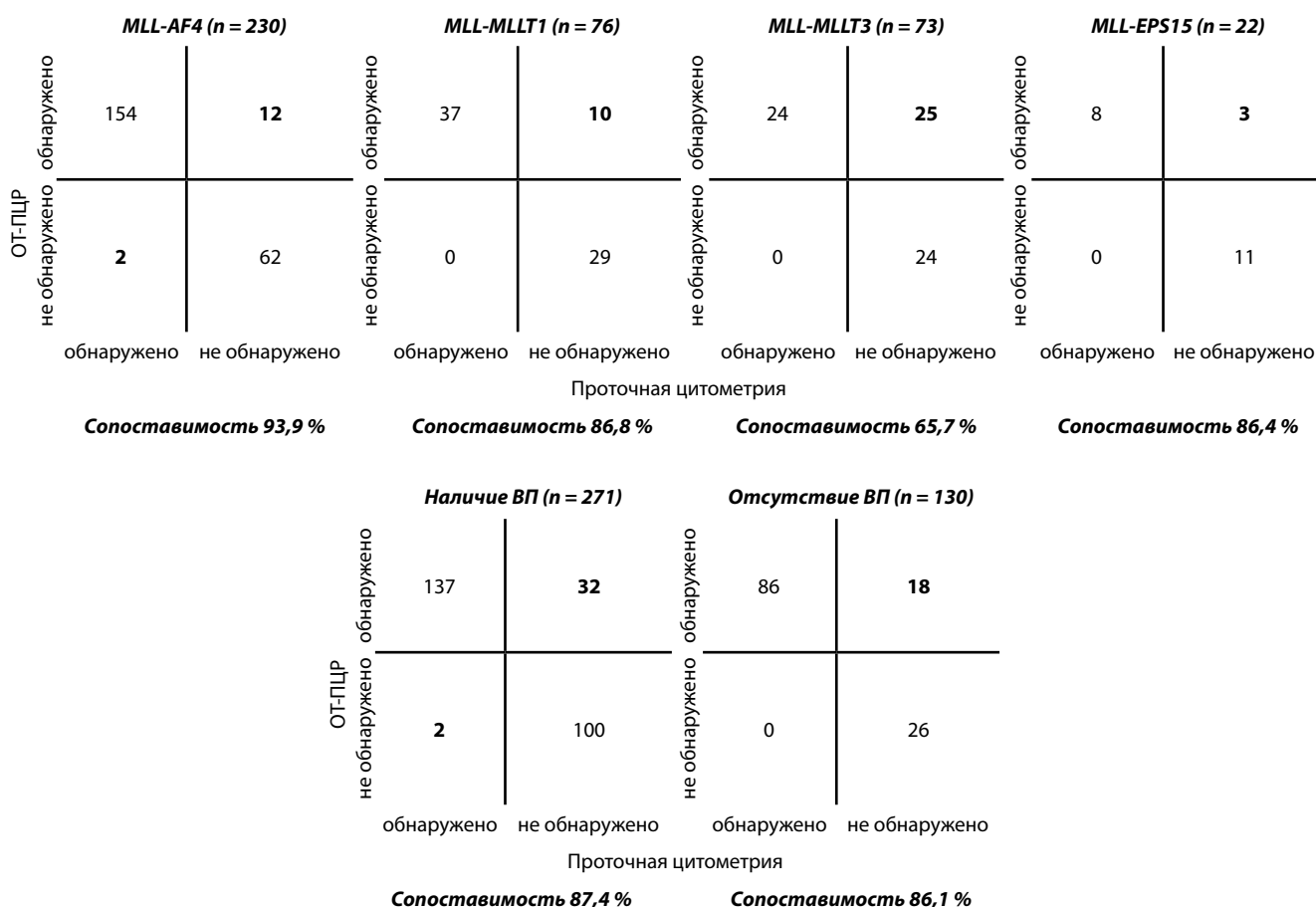


Рис. 4. Сопоставимость выявления МОБ у пациентов с различными типами химерных транскриптов, а также в зависимости от наличия нормальных ВП

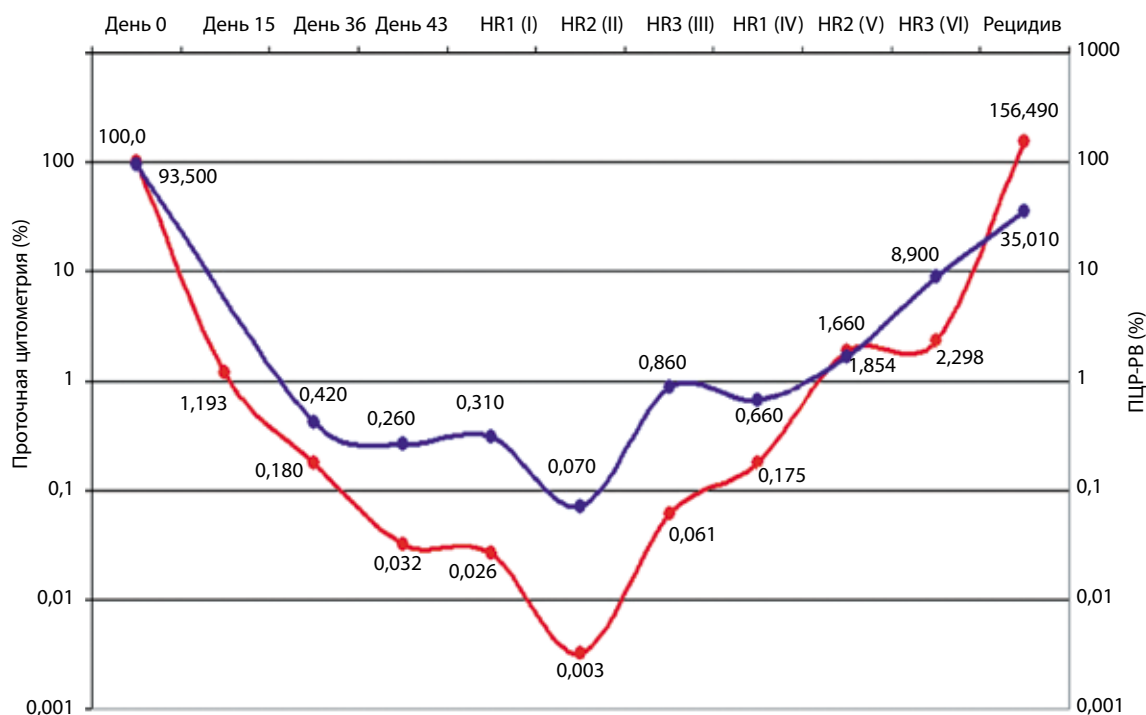


Рис. 5. Динамика выявления МОБ методами проточной цитометрии (синяя кривая) и ПЦР-РВ (красная кривая) у пациентки с наличием химерного транскрипта MLL-AF4

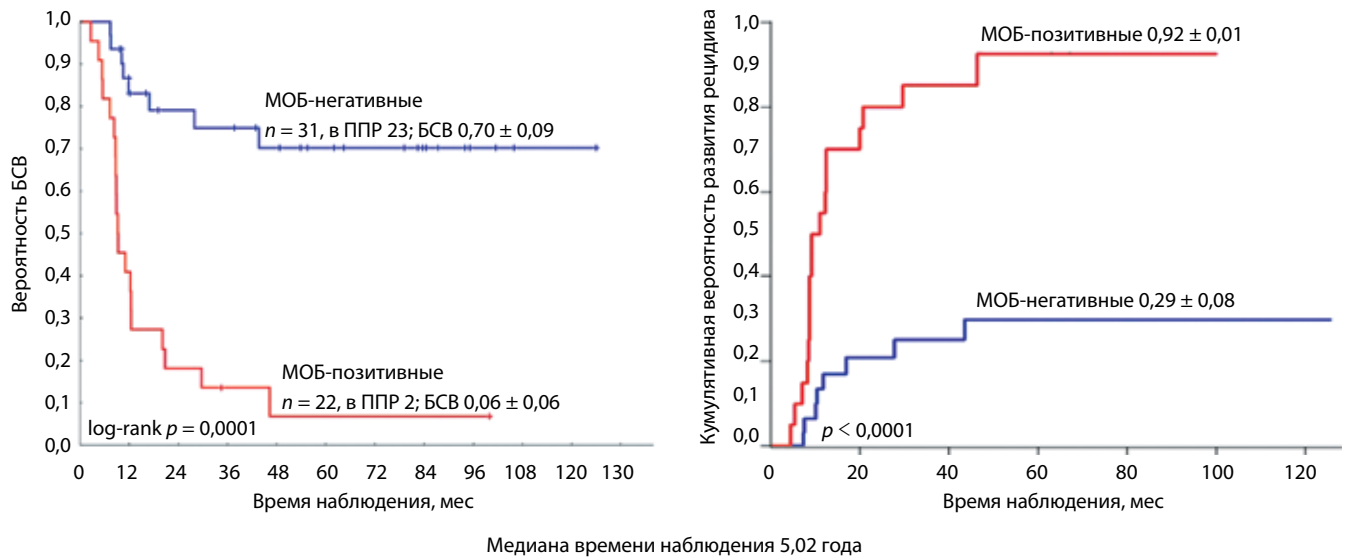


Рис. 6. БСВ и кумулятивная вероятность развития рецидива у МОБ-положительных и МОБ-отрицательных пациентов в зависимости от выявления МОБ в точке наблюдения 4 в КМ. Здесь и на рис. 7: ППР – полная продолжительная ремиссия

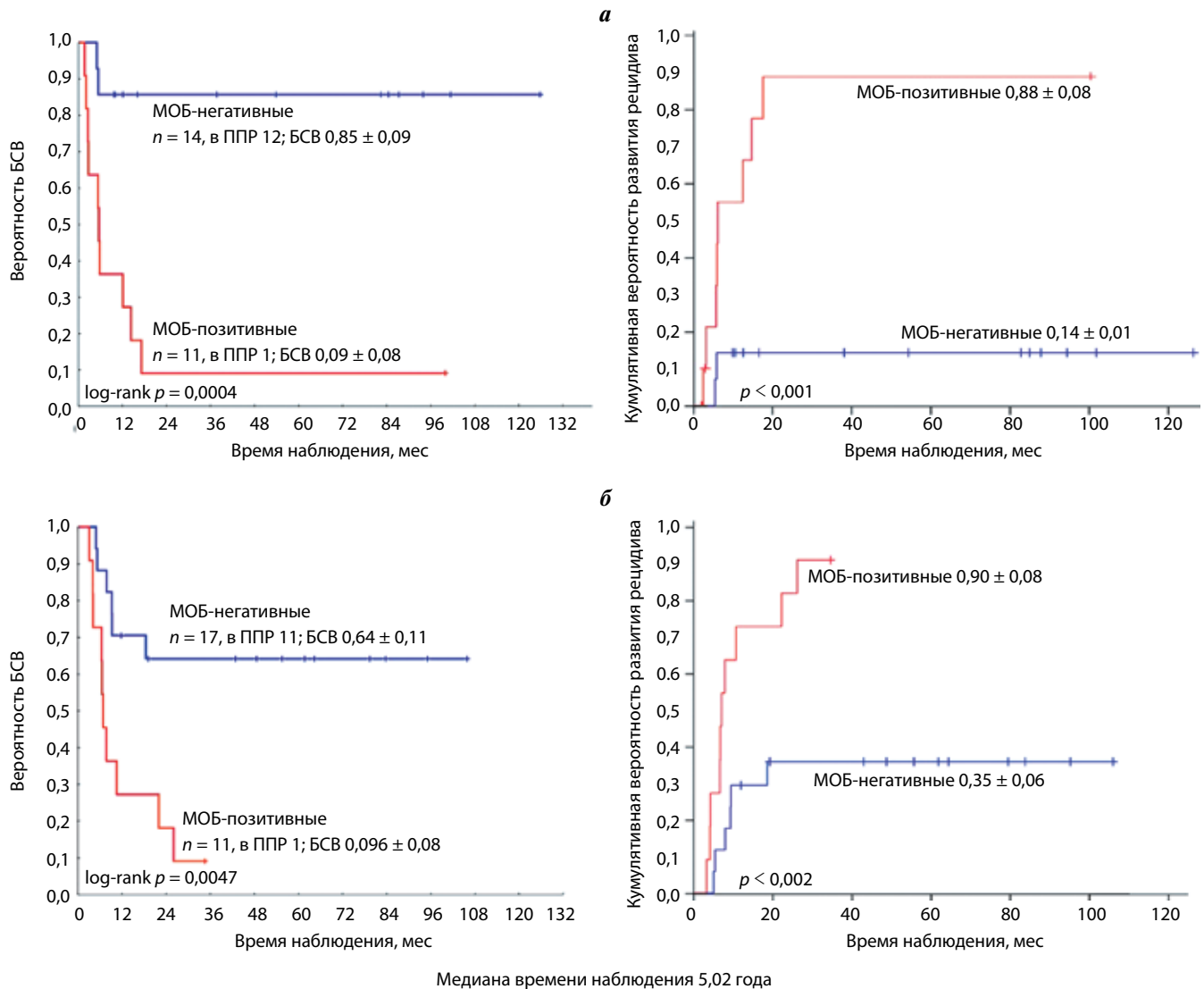


Рис. 7. БСВ и кумулятивная вероятность развития рецидива у 25 пациентов группы высокого риска (с наличием MLL-AF4) (а) и 28 пациентов группы промежуточного риска (все остальные перестройки гена MLL) (б) в зависимости от обнаружения МОБ в точке наблюдения 4 в КМ

необходимо количественное определение МОБ, предпочтительнее использовать данные проточной цитометрии. Но в последующих точках наблюдения достаточно только качественного определения МОБ, поэтому целесообразнее использовать результаты ОТ-ПЦР/ПЦР-РВ вследствие более высокой чувствительности метода.

Оценка прогностической роли выявления МОБ в ходе лечения по протоколу MLL-Baby показала, что наличие МОБ в точке наблюдения 4 в КМ ведет к достоверному снижению БСВ и повышению кумулятивной вероятности развития рецидива (рис. 6). При разделении пациентов по группам риска протокола MLL-Baby сохранялись достоверные различия в величинах БСВ и кумулятивной вероятности развития рецидива между МОБ-позитивными и МОБ-негативными больными в точке наблюдения 4 в КМ (рис. 7). В то же время использование периферической крови

для выявления МОБ у данной группы пациентов себя не оправдало. Технически это выполнимо, однако значимой прогностической роли выявление МОБ в периферической крови не имело. При проведении многофакторного анализа единственным значимым фактором являлось сохранение МОБ в точке наблюдения 4 в КМ (ОО 7,326; 95 % ДИ 2,378–22,565) (табл. 3).

Сходные данные получены и для ОМЛ у детей первого года жизни. Длительное сохранение МОБ при ОМЛ, даже в условиях клинико-гематологической ремиссии, неизбежно приводит к рецидиву (рис. 8).

Обсуждение

МОБ, как уже отмечалось ранее, – это сохранение в организме пациента опухолевых клеток в количествах, не распознаваемых стандартными цитологическими методами. Но даже в том случае, если в образцах КМ, взятых во время терапии, количество опухолевых

Таблица 3. Анализ прогностических показателей, влияющих на возникновение рецидивов у пациентов первого года жизни с ОЛЛ, получающих терапию по протоколу MLL-Baby, с учетом МОБ в точке наблюдения 4 в КМ

Показатель	Пациенты	События	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			ОО	95 % ДИ	p	ОО	95 % ДИ	p
Возраст								
Старше 6 месяцев	22	8	Референтное	–	0,059	Референтное	–	0,513
Младше 6 месяцев	31	19	2,179	0,949–5,005		1,393	0,515–3,765	
Иммунофенотип								
VI-ОЛЛ	36	16	0,746	0,346–1,610	0,623	1,611	0,405–6,416	0,499
VII-ОЛЛ	8	7	2,136	0,899–5,077	0,079	1,225	0,274–5,469	0,790
VIII-ОЛЛ	9	4	0,703	0,242–2,041	0,514	1	–	–
Наличие MLL-AF4								
Нет	28	4	Референтное	–	0,685	Референтное	–	0,529
Есть	25	8	0,853	0,396–1,840		0,752	0,311–1,821	
Инициальный лейкоцитоз, × 10⁹/л								
< 100	29	11	Референтное	–	0,019	Референтное	–	0,995
≥ 100	24	16	2,443	1,129–5,285		0,996	0,338–2,934	
Инициальное поражение центральной нервной системы								
Нет	33	12	Референтное	–	0,004	Референтное	–	0,071
Есть	19	15	2,995	1,382–6,493		2,187	0,936–5,114	
Количество бластов в 1 мкл крови на 8-й день терапии дексаметазоном								
< 1000	46	21	Референтное	–	0,096	Референтное	–	0,993
≥ 1000	7	6	2,131	0,856–5,304		0,996	0,364–2,722	
МОБ в точке наблюдения 4								
Отсутствие	31	7	Референтное	–	0,001	Референтное	–	0,001
Наличие	22	20	7,181	3,002–17,177		7,326	2,378–22,565	

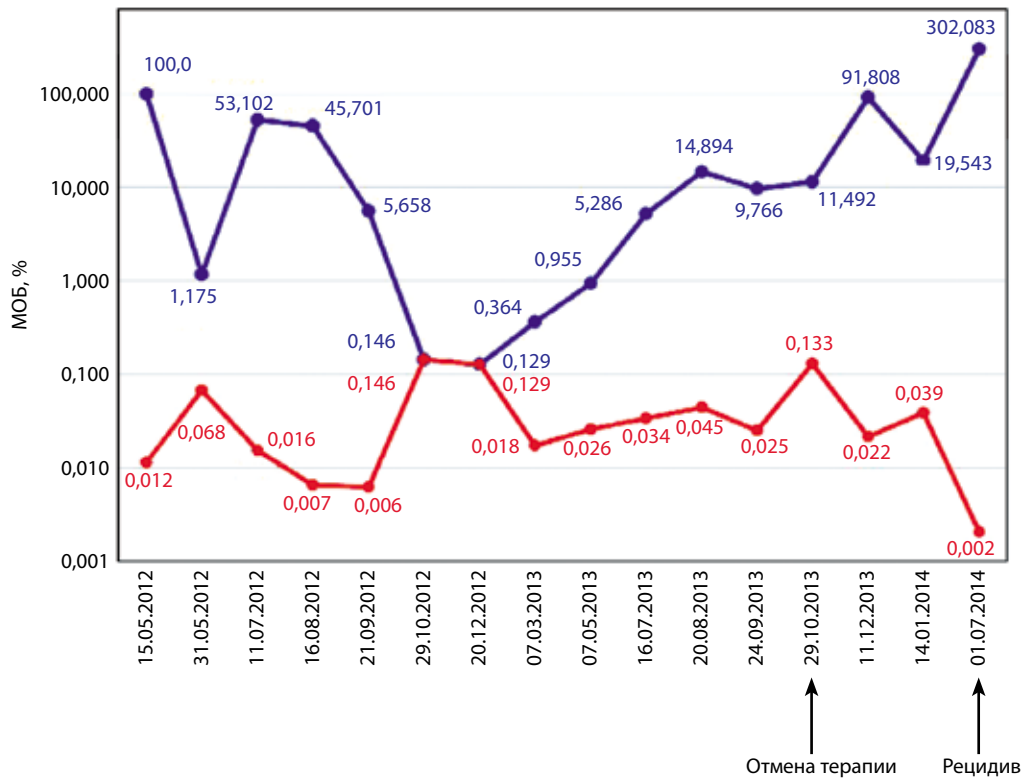


Рис. 8. Мониторинг МОБ у пациента с ОМЛ и наличием химерного транскрипта *MLL-MLLT11* методом ПЦР-РВ. Синяя кривая – величина МОБ, красная – чувствительность, рассчитанная согласно рекомендациям консорциума «Европа против рака» [22]

клеток ниже уровня чувствительности цитологического метода ($< 1\%$), они вносят существенный вклад в неблагоприятный исход заболевания [46–51]. Определение МОБ – это один из современных вариантов оценки ответа опухоли на химиотерапию, и оно находит свое применение при лечении не только ОЛ, но и ряда солидных опухолей, лимфом, множественной миеломы.

Большие усилия были приложены для стандартизации всех этапов количественного анализа при определении специфических для каждого больного перестроек генов иммуноглобулинов (*Ig*) и Т-клеточных рецепторов (*TCR*) методом ПЦР. Это дало возможность определить требования к количеству вносимого в реакцию материала, сформулировать основные понятия и принципы, разработать алгоритмы данного вида лабораторной диагностики в условиях проведения многоцентровых исследований [52, 53]. Данный метод широко применяется при мониторинге МОБ у детей и взрослых с ОЛЛ в европейских странах [28, 46, 49, 54]. На основании результатов мониторинга МОБ уже сегодня проводится стратификация пациентов с ОЛЛ, получающих терапию по многим современным протоколам [50, 54–56]. Метод хорошо себя зарекомендовал не только при *de novo* ОЛЛ, но и при рецидивах [57, 58].

Из недостатков определения МОБ методом выявления индивидуальных перестроек *Ig/TCR* следует отметить то, что проведение такого исследования техни-

чески сложно, растянуто во времени и относительно дорого [28, 29, 48]. Это затрудняет его использование для решения клинических задач в условиях нашей страны.

Еще одним подходом для мониторинга МОБ является использование сиквенса зоны разрыва в *MLL* и гене-партнере [59] для создания пациент-специфичной тест-системы с оценкой методом ПЦР-РВ [54, 60, 61]. К преимуществам данного метода следует отнести возможность абсолютного подсчета МОБ (по сравнению с использованием РНК/кДНК), а также прямую взаимосвязь между количеством химерного гена с участием *MLL* и опухолевых клеток лейкозного клона (по сравнению с перестройками *Ig/TCR*). В целом последовательность выполнения и интерпретации результатов очень близка к тому, что было предложено Европейской рабочей группой по изучению МОБ при ОЛЛ (ESG-MRD-ALL, в настоящее время – EuroMRD) для перестроек *Ig/TCR* [52]. Данный подход технически выполним и позволил с успехом проводить мониторинг МОБ как у детей первого года жизни [54], так и у взрослых [60] с наличием перестроек *MLL*. Сравнительный анализ определения МОБ по перестройкам *Ig/TCR* и индивидуальной структуре зоны разрыва в ДНК при образовании химерного гена с участием *MLL* показал хорошую степень сопоставимости двух методов [54].

Третьим из существующих способов мониторинга МОБ является применение ОТ-ПЦР и/или ПЦР-РВ для обнаружения химерных транскриптов. Химерные

транскрипты, выявляемые методом ОТ-ПЦР, или величина МОБ, определяемая при проведении ПЦР-РВ, используются в качестве фактора ответа на терапию относительно редко. Одной из причин этого является то, что химерные гены встречаются в среднем только у 40 % пациентов с ОЛЛ. Однако в случае обнаружения химерных транскриптов они являются высокочувствительными (10^{-4} – 10^{-6}) и стабильными маркерами [28, 29]. Поэтому данный вариант мониторинга МОБ нашел свое применение в группах, выделенных именно по наличию конкретного химерного гена. Так, в работе L. Elia и соавт. при выявлении химерных транскриптов *MLL-AF4* методами ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ

у 17 взрослых пациентов с ОЛЛ было показано, что у больных, достигших МОБ-негативности, кумулятивная вероятность развития рецидива была ниже, чем у оставшихся *MLL-AF4*-позитивными (44 и 88 % соответственно) [61]. Позднее этой же группой исследователей был проведен анализ 12 случаев ОЛЛ, включая 1 пациента младше 1 года и 3 – старше 1 года с наличием химерного транскрипта *MLL-MLLT1*. Интересно, что у 5 больных в этой группе, включая пациента первого года жизни, получавшего терапию по протоколу Interfant-99, было отмечено длительное персистирование химерного транскрипта *MLL-MLLT1*, а также повторное его выявление после достижения МОБ-не-

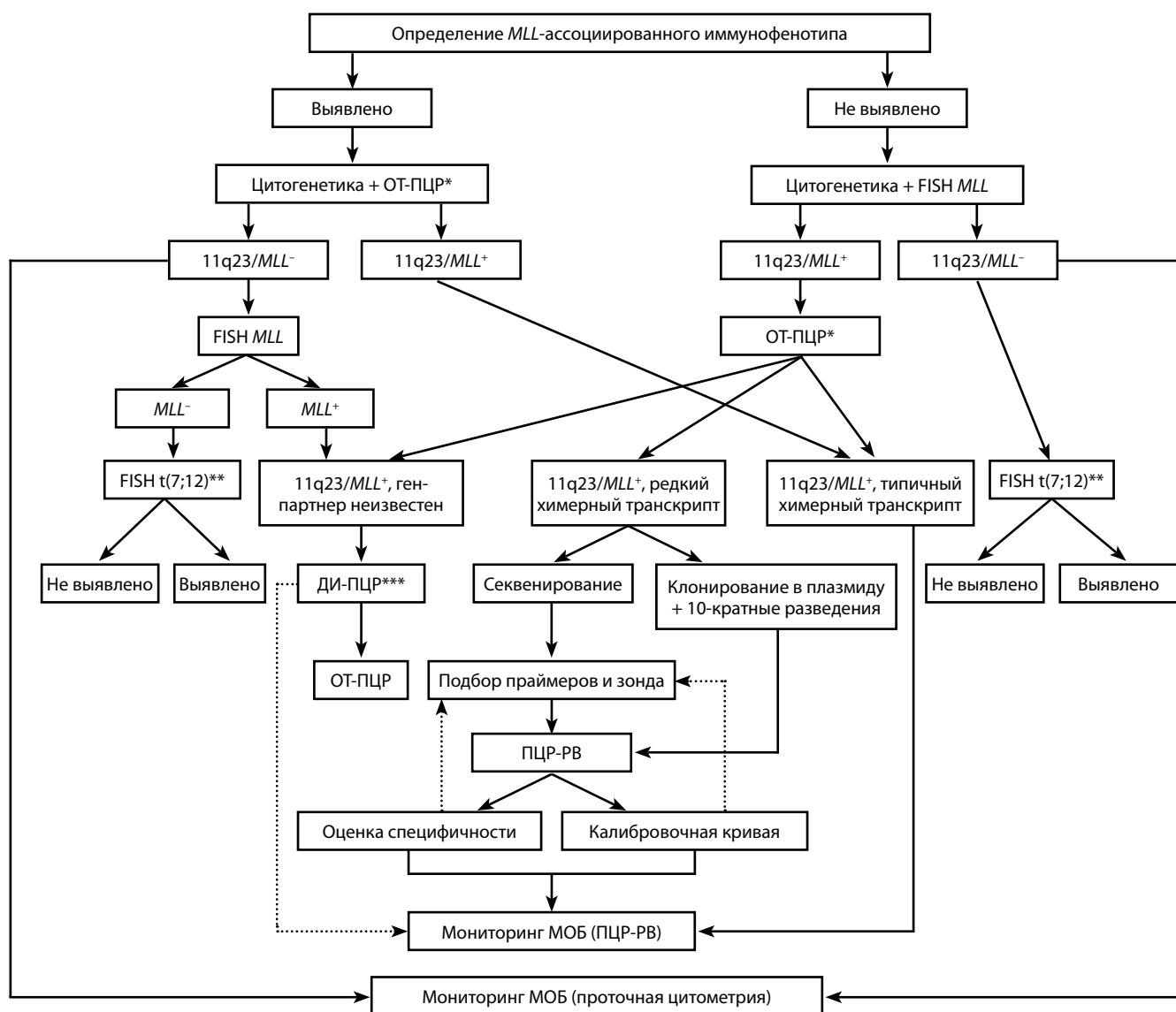


Рис. 9. Алгоритм комплексной лабораторной диагностики и мониторинга МОБ при ОЛ у детей первого года жизни на основании инициальных характеристик опухолевых бластов. Под *MLL*-ассоциированным иммунофенотипом понимали наличие экспрессии *NG2* на *CD45⁺*-клетках при отсутствии экспрессии *CD10* и *CD20* у пациентов с ОЛЛ, а также наличие экспрессии *CD11b*, *NG2*, *CD99*, *CD15*, *CD65* при ОМЛ.

*ОТ-ПЦР проводится в 2 этапа в зависимости от частоты встречаемости отдельных перестроек гена *MLL*. У пациентов с ОЛЛ 1-й этап: *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3*; 2-й этап: *MLL-EPS15*, *MLL-MLLT10*. У пациентов с ОМЛ 1-й этап: *MLL-MLLT3*, *MLL-MLLT10*, *MLL-MLLT11*, *MLL-ELL*; 2-й этап: *MLL-AF4*, *MLL-MLLT4*, *MLL-MYO1F*, *MLL-FOXO4*, *MLL-SEPT6*, *MLL-SEPT9*.

***FISH* для выявления транслокации *t(7;12)* проводится пациентам с ОМЛ. ***ДИ-ПЦР – длинная инвертированная ПЦР

гивности без последующего развития клинико-гематологического рецидива [62]. Все это свидетельствует в пользу того, что определение МОБ путем выявления химерных транскриптов с участием *MLL* должно применяться в таргетных группах, каковой являются дети первого года жизни, как для получения новых данных о биологии опухоли, так и для оценки клинической значимости этого метода, что и было продемонстрировано нами.

Четвертым методом определения МОБ является многоцветная проточная цитометрия. При оценке МОБ этим способом позитивными считаются образцы, в которых на точечных графиках определяется группа из 10 и более клеток, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, соответствующие лимфоцитам/лимфобластам. Максимальная чувствительность метода (анализ 1 000 000 клеток) составляет 0,001 %, т. е. возможно выявить 1 опухолевую клетку среди 100 000 нормальных. В то же время далеко не во всех случаях клеток в образце достаточно для достижения такой чувствительности. Поэтому минимально достаточной рутинной чувствительностью обычно принято считать 0,01 %, для достижения которой необходим анализ 100 000 клеток. Если по тем или иным причинам не удается собрать достаточное количество клеток, а опухо-

левые клетки не выявляются, исследование считается не выполненным.

Результаты определения МОБ методом проточной цитометрии при ОЛЛ у детей первого года жизни на данный момент представлены лишь в 1 публикации группы Interfant, в которой исследовался 51 пациент, получавший терапию по протоколам Interfant-99 и Interfant-06 в рамках итальянской группы AIEOP. МОБ определяли на 15-й и 33-й дни индукционной терапии. Авторами работы был сделан вывод о том, что определение МОБ методом проточной цитометрии на 15-й день терапии может быть с успехом использовано в комбинации с другими прогностическими факторами для стратификации пациентов [63].

Исходя из собственных данных, представленных здесь и опубликованных ранее [17, 27, 35–38, 43], мы сформулировали алгоритм комплексной диагностики и мониторинга МОБ при ОЛ у детей первого года жизни на основании сочетанного применения различных методов клинической лабораторной диагностики (рис. 9).

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-35-00105, а также постановлением № 211 Правительства Российской Федерации, контракт № 02.A03.21.0006.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Cimino G., Moir D.T., Canaani O. et al. Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res* 1991;51(24):6712–4.
- Ziemin-van der Poel S., McCabe N., Gill H.J. et al. Identification of a gene, *MLL*, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(23):10735–9.
- Tkachuk D., Kohler S., Cleary M. Involvement of a homolog of *Drosophila tritorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992;71(4):691–700.
- Шориков Е.В. Результаты программного лечения острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 34 с. [Shorikov E.V. Treatment results of acute lymphoblastic leukemia in infants. Author's abstract of thesis ... of candidate of medicine. Moscow, 2005. 34 p. (In Russ.)].
- Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007;370(9583):240–50.
- Hilden J., Dinndorf P., Meerbaum S. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood* 2006;108(2):441–51.
- Ferster A., Bertrand Y., Benoit Y. et al. Improved survival for acute lymphoblastic leukaemia in infancy: the experience of EORTC-Childhood Leukaemia Cooperative Group. *Br J Haematol* 1994;86(2):284–90.
- Silverman L., McLean T., Gelber R. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 1997;80(12):2285–95.
- Lauer S., Camitta B., Leventhal B. et al. Intensive alternating drug pairs after remission induction for treatment of infants with acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group pilot study. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20(3):229–33.
- Tomizawa D., Koh K., Sato T. et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an *MLL* gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia* 2007;22(11):2258–63.
- Dördelmann M., Reiter A., Borkhardt A. et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;94(4):1209–17.
- Biondi A., Rizzari C., Valsecchi M.G. et al. Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies. *Haematologica* 2006;91(4):534–7.
- Frankel L., Ochs J., Shuster J.J. et al. Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493). *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19(1):35–42.
- Chessells J., Harrison C., Watson S. et al. Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987–1999. *Br J Haematol* 2002;117(2):306–14.
- de Zen L., Bicciato S., te Kronnie G. et al. Computational analysis of flow cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an *MLL*/AF4 identification. *Leukemia* 2003;17(8):1557–65.
- Borkhardt A., Wuchter C., Viehmann S. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia –

- combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia* 2002;16(9):1685–90.
17. Попов А.М., Вержицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2012;(5):31–6. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Methodology of flow cytometry application for minimal residual disease monitoring in childhood CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy diagnostiki v pediatrii* = Diagnostic Issues in Pediatrics 2012;(5):31–6. (In Russ.)].
18. Попов А.М., Вержицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Изменения иммунофенотипа опухолевых бластов при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-MB-2008. *Иммунология* 2010;(2):60–4. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Changes in blasts immunophenotype in CD10-positive children acute lymphoblastic leukemia by 15th day of induction therapy according ALL-MB-2008 protocol. *Immunologiya* = Immunology 2010;(2):60–4. (In Russ.)].
19. Pui C.H., Carroll W., Meshinchi S. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29(5):551–65.
20. Biondi A., Cimino G., Pieters R. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000;96(1):24–33.
21. Chen C.S., Sorensen P., Domer P. et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993;81(9):2386–93.
22. Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(12):2474–86.
23. Gabert J., Beillard E., van der Velden V. et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(12):2318–57.
24. van Dongen J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13(12):1901–18.
25. Zaliova M., Fronkova E., Krejcikova K. et al. Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia* 2009;23(5):944–51.
26. Taube T., Eckert C., Körner G. et al. Real-time quantification of TEL-AML1 fusion transcripts for MRD detection in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods. *Leuk Res* 2004;28(7):699–706.
27. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержицкая Т.Ю. и др. Сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии и выявления химерного транскрипта полимеразной цепной реакцией у детей, больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2010;55(2):3–9. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Yu. et al. Comparison of the results of evaluating the minimal residual disease by flow cytometry and by detecting of chimeric transcript by the polymerase chain reaction in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya* = Hematology and Transfusiology 2010;55(2):3–9. (In Russ.)].
28. Brüggemann M., Schrauder A., Raff T. et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the second international symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia* 2010;24(3):521–35.
29. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2007;21(4):622–6.
30. Fechina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A, abstract 2828.
31. Meyer C., Kowarz E., Hofmann J. et al. New insights to the *MLL* recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23(8):1490–9.
32. Pieters R. Biology and treatment of infant leukemias. In: *Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research*. Ed. by C.H. Pui. Totowa: Humana Press, 2003. Pp. 61–73.
33. Reaman G. Biology and treatment of infant leukemias. In: *Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research*. Ed C.H. Pui. Totowa: Humana Press, 2003. Pp. 75–83.
34. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Попов А.М. и др. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая характеристика острых лейкозов у детей первого года жизни. *Клиническая онкогематология* 2011;4(2):134–41. [Tsaur G.A.,
- Fleyshman E.V., Popov A.M. et al. Cytogenetics and molecular genetics of infant acute leukemias. *Klinicheskaya onkogematologiya* = Clinical Oncohematology 2011;4(2):134–41. (In Russ.)].
35. Цаур Г.А., Попов А.М., Алейникова О.В. и др. Характеристика перестроек 11q23(*MLL*) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематология* 2011;(3):57–64. [Tsaur G.A., Popov A.M., Aleynikova O.V. et al. Detection of 11q23(*MLL*) rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia. *Onkogematologiya* = Oncohematology 2011;(3):57–64. (In Russ.)].
36. Цаур Г.А., Плеханова О.М., Гиндина Т.Л. и др. Применение метода флуоресцентной гибридизации *in situ* для выявления перестроек гена *MLL* при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Медицинская генетика* 2012;(7):35–45. [Tsaur G.A., Plekhanova O.M., Gindina T.L. et al. Detection of *MLL* gene rearrangements in infants under 12 month of age with acute leukemias by fluorescence *in situ* hybridization. *Meditsinskaya genetika* = Medical Genetics 2012;(7):35–45. (In Russ.)].
37. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Гиндина Т.Л. и др. Характеристика перестроек 11q23/*MLL* при остром миелоидном лейкозе у детей первого года жизни. *Клиническая онкогематология* 2012;5(4):365–70. [Tsaur G.A., Fleyshman E.V., Gindina T.L. et al. Detection of 11q23(*MLL*) rearrangements in infant acute myeloid leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya* = Clinical Oncohematology 2012;5(4):365–70. (In Russ.)].
38. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Плеханова О.М. и др. Редкие перестройки хромосомного района 11q23 и гена *MLL* при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Вопросы диагностики в педиатрии* 2012;(6):16–24. [Tsaur G.A., Fleyshman E.V., Plekhanova O.M. et al. Rare 11q23/*MLL* rearrangements in infant acute leukemia. *Voprosy diagnostiki v pediatrii* = Diagnostic Issues in Pediatrics 2012;(6):16–24. (In Russ.)].
39. Balgobind B., Raimondi S., Harbott J. et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/*MLL*-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood* 2009;114(12):2489–96.
40. Pui C.H., Gaynon P., Boyett J. et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359(9321):1909–15.
41. Meyer C., Hofmann J., Burmeister T. et al. The *MLL* recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 2013;27(11):2165–76.
42. Felix C., Hosler M., Slater D. et al. *MLL* genomic breakpoint distribution within

- the breakpoint cluster region in *de novo* leukemia in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20(4):299–308.
43. Попов А.М., Вержицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Особенности мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах методом проточной цитометрии у детей первого года жизни. *Детская онкология* 2008;(2):32–5. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Peculiarities of minimal residual disease monitoring by flow cytometry in infants with B-lineage acute lymphoblastic leukemia *Detskaya onkologiya* = *Pediatric Oncology* 2008;(2):32–5. (In Russ.)].
44. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематология* 2010;(2):46–54. [Tsaur G.A., Nasedkina T.V., Popov A.M. et al. Time to molecular remission as prognostic factor in infant acute lymphoblastic leukemia. *Onkogematologiya* = *Oncohematology* 2010;(2):46–54. (In Russ.)].
45. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестник уральской медицинской академической науки* 2011;(4):107–11. [Tsaur G.A., Druy A.E., Popov A.M. et al. Microfluidic biochips for RNA quantity and quality evaluation in patients with oncological disorders. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki* = *Bulletin of the Ural Medical Academic Research* 2011;(4):107–11. (In Russ.)].
46. van Dongen J.J., Seriu T., Panzer-Grumayer R. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998;352(9142):1731–8.
47. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952–8.
48. Campana D. Minimal residual disease studies in acute leukaemia. *Am J Clin Pathol* 2004;122:S47–57.
49. 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* 2008;22(4):771–82.
50. Borowitz M., Devidas M., Hunger S. 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* 2008;111(12):5477–85.
51. Цаур Г.А., Попов А.М., Наседкина Т.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни, определенной путем выявления химерных транскриптов у детей первого года жизни, больных острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколу MLL-Baby. *Гематология и трансфузиология* 2012;57(4):12–22. [Tsaur G.A., Popov A.M., Nasedkina T.V. et al. Prognostic significance of minimal residual disease detected by PCR for fusion gene transcripts in infant acute lymphoblastic leukemia treated by MLL-baby protocol. *Gematologiya i transfuziologiya* = *Hematology and Transfusiology* 2012;57(4):12–22. (In Russ.)].
52. van der Velden V., Cazzaniga G., Schrauder A. et al. Analysis of minimal residual disease by *Ig/TCR* gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21(4):604–11.
53. van der Velden V., Panzer-Grumayer E.R., Cazzaniga G. et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007;21(4):706–13.
54. van der Velden V., Corral L., Valsecchi M.G. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23(6):1073–9.
55. Garand R., Beldjord K., Cavé H. et al. Flow cytometry and IgH/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia* 2013;27(2):370–6.
56. Schrappe M., Valsecchi M.G., Bartram C. et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011;118(8):2077–84.
57. Eckert C., Biondi A., Seeger K. et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001;358(9289):1239–41.
58. Bader P., Kreyenberg H., Henze G. et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(3):377–84.
59. Meyer C., Schneider B., Reichel M. et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(2):449–54.
60. Burmeister T., Meyer C., Schwartz S. et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 2006;20(3):451–7.
61. Elia L., Gottardi E., Floriddia G. et al. Retrospective comparison of qualitative and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction in diagnosing and monitoring the ALL1-AF4 fusion transcript in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2004;18(11):1824–30.
62. Elia L., Grammatico S., Paoloni F. et al. Clinical outcome and monitoring of minimal residual disease in patients with acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/ENL fusion gene. *Am J Hematol* 2011;86(12):993–7.
63. Popov A., Buldini B., de Lorenzo P. et al. Identification of low risk group in infants with acute lymphoblastic leukemia by flow cytometric minimal residual disease measurement at day 15 of Interfant-99 and Interfant-06 protocols treatment. *Blood* 2013;122(21):abstract 1333.