

Значение определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* методом полимеразной цепной реакции у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников с наличием транслокации $t(12;21)(p13;q22)$

Г.А. Цаур¹⁻⁴, Т.О. Ригер^{1,2}, А.М. Попов⁵, Т.Ю. Вержибская^{1,2}, Л.В. Вахонина^{1,2}, А.А. Власова¹, Ю.В. Ольшанская⁵, А.Н. Казакова⁵, О.В. Стренева^{1,2}, О.В. Макарова¹, С.В. Цвиренко^{1,4}, Л.И. Савельев^{1,2,4}, О.Р. Аракаев^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1»;
Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

²ГАУЗ Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22, корп. А;

³ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»;
Россия, 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106;

⁴ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Россия, 620030 Екатеринбург, ул. Репина, 3;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контакты: Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru

Введение. Транслокация $t(12;21)(p13;q22)$ является одной из самых частых структурных генетических аномалий, выявляемых у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Ее невозможно обнаружить при стандартном цитогенетическом исследовании, поэтому для ее диагностики используют обратнo-транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) или флуоресцентную гибридизацию *in situ*.

Целью исследования являлась оценка прогностического значения качественного и количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на разных этапах терапии у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ).

Материалы и методы. У 34 из 166 (20,5 %) обследованных пациентов химерный транскрипт *ETV6-RUNX1* был выявлен методами обратнo-транскриптазной и количественной ПЦР в режиме реального времени. Качественное выявление *ETV6-RUNX1* на 36-й и 85-й дни терапии приводило к статистически достоверно более низким показателям выживаемости, в то время как результаты качественного определения *ETV6-RUNX1* на 15-й день лечения не позволили разделить пациентов на прогностически различные группы. Методом анализа характеристических кривых (ROC-анализа, *receiver operator characteristic*) были получены пороговые уровни (ПУ) отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, которые с наибольшей эффективностью позволяют разделять пациентов с разными исходами терапии.

Результаты. Практически применимые ПУ (приближенные к 10-кратной шкале) составили 500,0; 1,0; 0,1 и 0,01 % для 0, 15, 36 и 85-го дней соответственно. Бессобытийная выживаемость и кумулятивная частота развития рецидива для пациентов со значениями, равными или превышающими ПУ, были достоверно хуже. Кроме того, отношение *ETV6-RUNX1/ABL1* $\geq 500,0$ % на момент диагностики сопровождалось замедленным клиренсом бластных клеток. Также была показана хорошая качественная (84,8 %) и количественная ($R^2 = 0,953$) сопоставимость результатов выявления минимальной остаточной болезни при исследовании методами проточной цитометрии и ПЦР в режиме реального времени с определением величины *ETV6-RUNX1/ABL1*.

Прогностически значимые уровни минимальной остаточной болезни для 2 методов на 15, 36 и 85-й дни оказались идентичными. **Заключение.** Нами показано, что качественное и количественное определение химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* методом ПЦР на разных этапах терапии ВП-ОЛЛ имеет важное прогностическое значение. На основании этого нами предложены подходы к стандартизации количественного определения *ETV6-RUNX1/ABL1* в рамках многоцентровой кооперативной клинической группы «Москва – Берлин».

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети, минимальная остаточная болезнь, транслокация $t(12;21)(p13;q22)$, химерный транскрипт *ETV6-RUNX1*

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-57-70

Significance of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript detection in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with translocation $t(12;21)(p13;q22)$

G.A. Tsauro¹⁻⁴, T.O. Riger^{1,2}, A.M. Popov⁵, T. Yu. Verzhbitskaya^{1,2}, L.V. Vakhonina^{1,2}, A.A. Vlasova¹, Yu. V. Olshanskaya⁵, A.N. Kazakova⁵, O.V. Strenева^{1,2}, O.V. Makarova¹, S.V. Tsvirenko^{1,4}, L.I. Savelyev^{1,2,4}, O.R. Arakaev^{1,2}, L.G. Fechina^{1,2}

¹Sverdlovsk Regional Children's Hospital No 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., Ekaterinburg 620149, Russia;

²Center for Specialized Types of Medical Care "Institute of Medical Cell Technologies"; 22A Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia;

³Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 106 Pervomayskaya St., Ekaterinburg 620049, Russia;

⁴Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Repina St., Ekaterinburg 620030, Russia;

⁵Dmitriy Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela Sr., Moscow 117997, Russia

Introduction. Translocation $t(12;21)(p13;q22)$ is one of the most common structural genetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). It cannot be detected by conventional G-banding, so a reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) or fluorescent *in situ* hybridization are used for this purpose.

The aim of the study was to evaluate the prognostic significance of qualitative and quantitative detection of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript at various time points in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) patients.

Materials and methods. *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript was revealed by both reverse-transcriptase PCR and quantitative real-time PCR (RQ-PCR) in 34 out of 166 (20.5 %) children with BCP-ALL. Qualitative *ETV6-RUNX1*-positivity at days 36 and 85 led to unfavorable outcome (lower event-free survival – EFS and higher cumulative incidence of relapse – CIR). While *ETV6-RUNX1* status at day 15 did not allow to divide patients with different outcomes. By ROC curve analysis we determined threshold levels (TL) for *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio at days 0, 15, 36 and 85. Afterwards we adjusted obtained results to 10-fold scale.

Results. So practically applicable TL were as follows 500.0 %, 1 %, 0.1 % u 0.01 % for days 0, 15, 36 and 85, respectively. EFS and CIR were both worse in patients with *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio equal or above defined TL. Moreover, initial ratio $\geq 500,0$ % corresponded to delayed blast clearance at days 15 and 36. We showed good qualitative (84.8 %) and quantitative ($R^2 = 0.953$) concordance between *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio and MRD data obtained by flow cytometry at days 15, 36, 85. Of note, defined TL for *ETV6-RUNX1/ABL1* at days 15, 36, 85 were equal to prognostically important levels for flow cytometry MRD.

Conclusion. Thus, qualitative detection and quantitative value of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript showed prognostic significance in the course of treatment in children with BCP-ALL. Based on these results we propose standardization approaches for Moscow – Berlin ALL study group.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, children, minimal residual disease, translocation $t(12;21)(p13;q22)$, *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript

Введение

Транслокация $t(12;21)(p13;q22)$, ведущая к образованию химерного гена *ETV6-RUNX1* (ранее известного как *TEL-AML1*) [1–3], является одной из самых частых структурных генетических аномалий, выявляемых у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [4–6]. Данная транслокация не может быть обнаружена при стандартном цитогенетическом исследовании, поэтому для этих целей используется обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) [3, 7, 8] или флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) [9]. Считается, что при проведении современной интенсивной полихимиотерапии прогноз пациентов с $t(12;21)(p13;q22)$ благоприятный [5, 6, 10–13]. По мнению ряда авторов, улучшение результатов терапии стало возможным также благодаря стратификации пациентов на основании результатов определения минимальной остаточной болезни (МОБ) [12, 14]. Чаще всего для этих целей используют данные, полученные в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с выявлением индивидуальных перестроек генов *Ig* и/или *TCR* [15] или при проведении многоцветной проточной цитометрии [12, 16]. При этом имеются только единичные работы, в которых оценивалось прогностическое значение определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*, выявляемого методом ПЦР-РВ на разных этапах лечения, включая инициальную диагностику [17]

и контроль МОБ [13, 18–23], что и послужило целью публикации данного исследования. В то же время представленные в нашей работе данные являются лишь частью проспективного многоцентрового исследования ALL-MB-2008 [24], поэтому относиться к полученным результатам надо с определенной долей осторожности.

Цель исследования – оценить значение качественного и количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на разных этапах терапии у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ), получающих лечение по протоколу ALL-MB-2008.

Материалы и методы

В данное моноцентровое исследование были включены 166 пациентов с ВП-ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-MB-2008 в отделении детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1 (Екатеринбург) с апреля 2008 г. по октябрь 2014 г. В группе исследования было 78 (46,2 %) девочек и 91 (53,8 %) мальчик в возрасте от 1,3 года до 16 лет (медиана возраста 3,15 года). Медиана времени наблюдения составила 5,2 года. Исходя из критериев стратификации протокола ALL-MB-2008 [24] в группу стандартного риска были включены 76 (45,7 %) больных, в группу промежуточного риска – 77 (46,4 %), в группу высокого риска – 13 (7,8 %).

Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании стандартных морфологических показателей [25] и данных

иммунофенотипирования согласно критериям классификации Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, EGIL) [26, 27]. При цитогенетическом исследовании применяли краткосрочное культивирование клеток в течение 24 ч. Дифференциальную окраску хромосом на G-полосы проводили красителем Гимза после предварительной обработки препаратов трипсином. В большинстве случаев анализировали не менее 11 метафазных пластинок. Анализ хромосом выполняли в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека, принятой на момент выполнения стандартного цитогенетического исследования [28–30]. В ходе данной работы все кариотипы были повторно оценены с учетом рекомендаций International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2016) [31]. У 3 (1,8 %) детей с ОЛЛ диагностирована болезнь Дауна. 22 пациентам дополнительно проведено исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зондов Vysis LSI ETV6(TEL)/RUNX1 (AML1) ES Dual Color Translocation Probe (Abbott Molecular, США) ($n = 10$) и XL t(12;21) ETV6/RUNX1 (Metasystems, Германия) ($n = 12$).

Наличие МОБ определяли методом проточной цитометрии по методике, описанной ранее [16, 32–34], с выделением групп риска на основании данных оценки на 15, 36 и 85-й дни (а для группы высокого риска – после 1-го блока интенсификации) [16]. Оценка МОБ на 15-й день выполнена 163 пациентам, на 36-й день – 166, а на 85-й день – 161.

При определении химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* лейкоциты и бластные клетки выделяли из костного мозга путем лизиса в 0,84 % растворе хлорида аммония, после чего проводили подсчет ядросодержащих клеток на гематологическом анализаторе KX-21 (Sysmex, Япония). В работу брали 5×10^6 ядросодержащих клеток. Для выделения РНК использовали TRIreagent (Molecular Research Center, США) в количестве 1,0 мл согласно инструкции производителя. Полученную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fischer Scientific, Латвия) согласно инструкции производителя. Качество выделенной РНК исследовали с использованием микроструйных чипов RNA 6000 Nano LabChip (Caliper Technologies, США) на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Германия). В дальнейшую работу брались образцы с показателем целостности РНК более 4,2, который достаточен для получения достоверных результатов в ходе ПЦР [35]. Концентрацию полученной РНК определяли спектрофотометрически, после чего 1 мкг РНК переводили в комплементарную ДНК в ходе реакции обратной транскрипции, которая проходила при 37 °C в течение 60 мин с использованием реактива MML–V обратной транскриптазы (Promega, Германия) и смеси случайных нонанеров (ДНК-синтез, Россия). Гнездную ОТ-ПЦР проводили в объеме 20 мкл в 2 этапа. На 1-м этапе

гнездной ОТ-ПЦР брали комплементарную ДНК в количестве, эквивалентном 100 нг РНК, на 2-м этапе в ПЦР-смесь вносили 1 мкл ПЦР-продукта, полученного на 1-м этапе. Для проведения ПЦР использовали реагент «ДиаТак-полимераза» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) и амплификатор «GeneAmp PCR system 9700 Gold» (Applied Biosystems, Сингапур). Конечная концентрация ионов магния в ПЦР-реакции составляла 3 ммоль/л. Температурные условия ПЦР и нуклеотидные последовательности праймеров для выявления химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* в ходе гнездной ПЦР были взяты из работы J. Harbott и соавт. [36]. Детекцию проводили методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле. Верификацию выявленных ПЦР-продуктов выполняли с помощью прямого секвенирования на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, Япония) с использованием набора «BigDye Terminator 3.1» (Applied Biosystems, США) и праймеров из 2-го этапа гнездной ОТ-ПЦР. Чувствительность гнездной ОТ-ПЦР, которую оценивали методом лимитирующих разведений клеточной культуры REN, составила 5×10^{-5} . Для исключения ложно-негативных результатов во всех образцах определялось наличие ПЦР-фрагмента транскрипта нормального гена *ABL1* в ходе ОТ-ПЦР, идентичной гнездной ОТ-ПЦР на 1-м этапе.

Пациенты, у которых в ходе гнездной ОТ-ПЦР в момент установления диагноза был выявлен химерный транскрипт *ETV6-RUNX1*, обследованы также методом ПЦР-РВ согласно рекомендациям международного проекта «Европа против рака» [37, 38]. Нуклеотидная последовательность праймеров, флуоресцентных зондов и температурные условия ПЦР-РВ приведены в табл. 1. Чувствительность ПЦР-РВ составила 1×10^{-4} . В качестве позитивного контроля применяли клеточную культуру REN, калибровочных стандартов – плазмиды, несущие фрагменты транскриптов *ETV6-RUNX1* и *ABL1* (оба Qiagen, Франция). Для анализа брались образцы, в которых экспрессия нормального гена *ABL1* превышала 10 тыс. копий [39]. Для количественной оценки величины МОБ на основании данных, полученных в ходе ПЦР-РВ, использовалось отношение количества копий химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и нормального транскрипта *ABL1* в процентах в конкретной точке наблюдения (ТН), включая момент установления диагноза.

Образцы костного мозга были исследованы в момент установления диагноза, а также в ТН, предусмотренных протоколом терапии для оценки морфологического статуса костного мозга: ТН₁ – 15-й день индукционной терапии, ТН₂ – 36-й день индукционной терапии, ТН₃ – 85-й день для пациентов стандартной или промежуточной групп риска или после первого блока интенсификации для пациентов группы высокого риска. При мониторинге МОБ во избежание случайной ошибки все образцы во всех ТН тестировались

Таблица 1. Праймеры, флуоресцентные зонды и условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления и количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*

Table 1. Primers, fluorescent probes and PCR conditions for qualitative and quantitative detection of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcripts

Тип ПЦР Type of PCR	Исследуемый транскрипт Detected fusion gene transcript	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer	Флуоресцентный зонд Fluorescent probe
Гнездная обратнотранскриптазная ПЦР: Nested reverse-transcriptase PCR: 1-й этап 1 st phase	<i>ETV6-RUNX1</i>	agcccatcatgcaccctctgatcc	gtggtcggccagcacctccacc	—
		94 °C – 2 мин, 35 циклов: 94 °C 15 с – 64 °C 45 с – 72 °C 45 с, 72 °C – 6 мин 94 °C – 2 min, 35 cycles: 94 °C 15 sec – 64 °C 45 sec – 72 °C 45 sec, 72 °C – 6 min		
2-й этап 2 nd phase	<i>ETV6-RUNX1</i>	gcagaattccactccgtggattcaaacagtc	aacgcctcgcctcatcttgccctgggctc	—
		94 °C – 2 мин, 25 циклов: 94 °C 15 с – 60 °C 45 с – 72 °C 45 с, 72 °C – 6 мин 94 °C – 2 min, 25 cycles: 94 °C 15 sec – 60 °C 45 sec – 72 °C 45 sec, 72 °C – 6 min		
Одностадийная ПЦР One-step PCR	<i>ABL1</i>	cggccagtagcatctgactttg	ccttgccatttttggttgg	—
		94 °C – 2 мин, 35 циклов: 94 °C 15 с – 64 °C 45 с – 72 °C 45 с, 72 °C – 6 мин 94 °C – 2 min, 35 cycles: 94 °C 15 sec – 64 °C 45 sec – 72 °C 45 sec, 72 °C – 6 min		
ПЦР в режиме реального времени Real-time PCR	<i>ETV6-RUNX1</i>	ctctgtctccccgcctgaa	cggctcgtgctggcat	HEX-tcccaatgggcatg gcgtgc-BHQ1
	<i>ABL1</i>	agctccgggtcttagctat	tagttgcttgggaccagcc	FAM-ccatttttg gtttggcttcacaccatt-BHQ1
	95 °C – 15 мин, 50 циклов: 95 °C 15 с – 60 °C 60 с 95 °C – 15 min, 50 cycles: 95 °C 15 sec – 60 °C 60 sec			

2 методами — гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ. МОБ-негативными считали образцы, в которых химерный транскрипт не был обнаружен в ходе как ОТ-ПЦР, так и ПЦР-РВ.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение XLSTAT 2016. При сравнении по качественным признакам использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса, а при сопоставлении по количественным признакам — критерий Манна-Уитни. Для выявления пороговых уровней (ПУ) отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, которые с наибольшей диагностической эффективностью позволяют разделять образцы пациентов с различными исходами терапии, был использован метод характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых) [40, 41]. Для удобства практического применения полученные ПУ приводили к ближайшим значениям, кратным 10 %. Результаты терапии оценивали по кривым бессобытийной выживаемости (БСВ), построенным по методу Каплана-Майера [42]. При расчете БСВ под событиями понимали рецидив, смерть вследствие любой причины как первое событие, выход из под наблюдения, развитие вторичной опухоли. Стандартную ошибку рассчитывали по формуле Гринвуда. Также оценивали кумулятивную частоту развития рецидива (КЧР) [43]. Для сравнения кривых использовали непараметрические критерии: для БСВ — log-rank (логарифмический ранговый тест), для КЧР — Грея. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Химерный транскрипт *ETV6-RUNX1* выявлен у 34 (20,5 %) из 166 обследованных пациентов с ВП-ОЛЛ при проведении гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ во время установления диагноза. Несмотря на разницу в чувствительности гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ (5×10^{-5} и 1×10^{-4} соответственно), нами не выявлено discordантных результатов между этими методами ни в момент установления диагноза, ни при мониторинге МОБ. При сравнении инициальных характеристик пациентов и показателей ответа на терапию на 8, 15 и 36-й дни терапии не зафиксировано статистически достоверной разницы между пациентами с наличием $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ и без нее (табл. 2).

В ТН₁ (на 15-й день терапии) из 33 обследованных 9 (27,3 %) пациентов с наличием химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* достигли МОБ-негативности. К окончанию индукционной терапии (в ТН₂ — на 36-й день) уже 22 (64,7 %) из 34 пациентов находились в молекулярной ремиссии. В ТН₃ (на 85-й день) доля МОБ-негативных пациентов возросла до 85,3 % (29 из 34 больных). Мы последовательно проанализировали прогностическое значение определения МОБ в качественном формате в 3 последовательных ТН (рис. 1). Результаты определения МОБ в ТН₂ и ТН₃ приводили к разделению пациентов на группы с различным прогнозом, в то время как качественное выявление химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* в ТН₁ не дало статистически достоверных различий.

Таблица 2. Инициальные показатели и ответ на терапию пациентов с острым лимфобластным лейкозом из B-линейных предшественников в зависимости от наличия или отсутствия транслокации t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1

Table 2. Initial parameters and treatment response criteria in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on presence or absence of translocation t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1

Показатель Parameter	Число больных с транслокацией t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1 и без нее, абс. (%) Number of patients with translocation t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1 and without it, abs. (%)		p
	наличие, n = 34 presence, n = 34	отсутствие, n = 132 absence n = 132	
Медиана возраста, годы (диапазон) Median age, years (range)	3 (2–10)	3 (1,1–16,0)	0,443
Мальчики/девочки Boys/girls	18 (52,9) / 16 (47,1)	71 (53,8) / 61 (46,2)	0,917
Группа риска (по протоколу ALL-MB-2008): Risk group (Protocol ALL-MB-2008):			
стандартная, n = 76 standard, n = 76	18 (52,9)	58 (43,9)	0,447
промежуточная, n = 77 intermediate, n = 77	15 (44,1)	62 (47,0)	
высокая, n = 13 high, n = 13	1 (2,9)	12 (9,1)	
Инициальный лейкоцитоз более 30 × 10 ⁹ /л Initial WBC count >30 × 10 ⁹ /l	7 (20,6)	32 (24,2)	0,825
Размер селезенки ≥4 см ниже реберной дуги Spleen size ≥4 sm below costal edge	10 (29,4)	56 (42,4)	0,236
Выявление бластов в ЦНС (ЦНС2- и ЦНС3-статусы)* Detection of blast cells in the CNS (CNS2- and CNS3-status)*	5 (14,7)	24 (18,2)	0,824
Более 1000 бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии More than 1000 blast cells in 1 microliter of peripheral blood at day 8 of remission induction	1 (2,9)	5 (3,8)	0,780
M3 статус костного мозга на 15-й день терапии M3 status of bone marrow at day 15 of induction remission	1 (2,9)	13 (9,8)	0,344
Отсутствие ремиссии на 36-й день терапии Not achieved remission at the end of induction (day 36)	—	6 (4,5)	0,453
МОБ на 15-й день терапии: Flow-MRD at day 15 of induction remission:			
<0,1 %	14 (41,1)	49 (37,4)	0,707
0,1–10 %	15 (44,1)	63 (48,1)	
≥10 %	3 (8,8)	19 (14,5)	
МОБ на 36-й день терапии: Flow-MRD at day 36 of treatment:			
<0,1 %	30 (88,2)	110 (83,3)	0,662
≥0,1 %	4 (11,8)	22 (16,7)	
МОБ на 85-й день терапии: Flow-MRD at day 85 of treatment:			
<0,01 %	31 (91,2)	116 (90,6)	0,815
≥0,01 %	3 (8,8)	12 (9,4)	

*Выявление бластов в спинномозговой жидкости после центрифугирования при клеточности менее 10 кл/мкл (статус ЦНС2) и более 10 кл/мкл (статус ЦНС3) и нетравматичной люмбальной пункции. ЦНС – центральная нервная система.

*Identification of blasts cells in the cerebrospinal fluid after centrifugation with cellularity less than 10 cells/μl (CNS2) and more than 10 cells/μl (CNS3) and non-traumatic lumbar puncture. CNS – central nervous system.

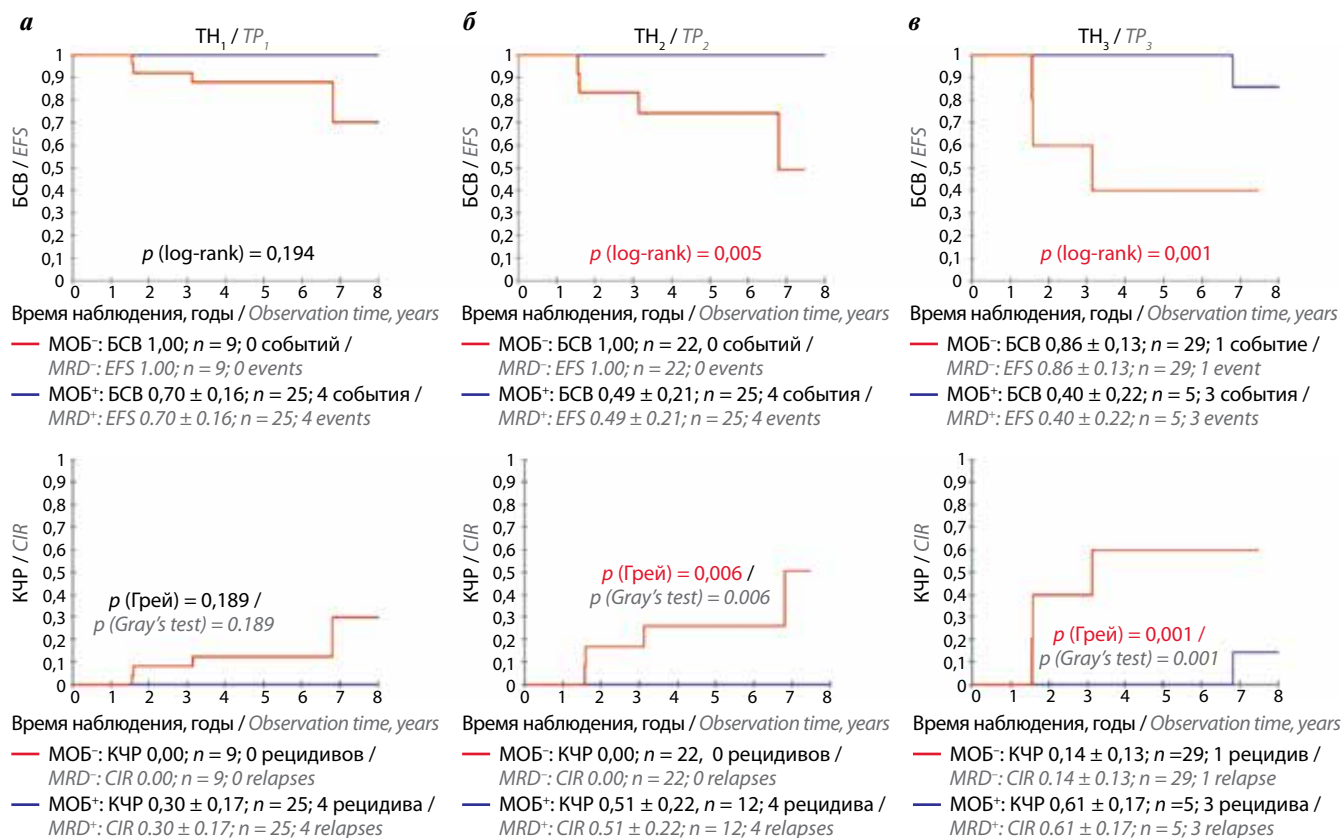


Рис. 1. Прогностическое значение качественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* у *t(12;21)*-позитивных пациентов ($n = 34$) с острым лимфобластным лейкозом из *B*-линейных предшественников. Для каждой точки наблюдения (TH) определены бессобытийная выживаемость (БСВ) и кумулятивная частота развития рецидивов (КЧР): а, б, в – соответственно TH_1 , TH_2 , TH_3 на 15, 36, 85-й день лечения. MOB^+ и MOB^- – минимальная остаточная болезнь с позитивным и негативным статусом соответственно

Fig. 1. Prognostic significance of *ETV6-RUNX1* qualitative detection in *t(12;21)*-positive BCP-ALL patients ($n = 34$). For each time-point (TP) event-free survival (EFS) (upper row) and cumulative incidence of relapse (CIR) (lower row) were calculated: а, б, в, respectively TH_1 , TH_2 , TH_3 on the days 15, 36, 85. MRD^+ and MRD^- – minimal residual disease with positive and negative status respectively

Для выявления ПУ отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, которые с наибольшей эффективностью позволяют разделять пациентов с разными исходами терапии, был выполнен ROC-анализ для $TH_1 - TH_3$, а также во время установления диагноза (TH_0). Он проведен 30 пациентам, у которых имелись данные о количестве копий *ETV6-RUNX1* и *ABL1* в каждой из TH . Практически применимые ПУ составили 500,0; 1,0; 0,1 и 0,01 % для TH_0 , TH_1 , TH_2 и TH_3 соответственно (рис. 2). БСВ и КЧР для групп пациентов, выделенных в соответствии с этими ПУ в $TH_0 - TH_3$, представлены на рис. 3. Для всех 4 TH результаты оказались высокодостоверными. Инициальная гиперэкспрессия *ETV6-RUNX1* ($ETV6-RUNX1/ABL1 \geq 500,0$ %) сопровождалась замедленным клиренсом бластных клеток: прогностически неблагоприятный уровень MOB сохраняли 4 пациента из 5 в TH_1 , а 3 – в TH_2 и TH_3 . У 3 последних пациентов в дальнейшем развились рецидивы. Среди 8 пациентов с высоким уровнем MOB в TH_1 у 5 определялась MOB более 0,1 % в TH_2 . Все 4 рецидива были зафиксированы именно у этих больных.

Данные ПЦР-РВ, полученные в $TH_1 - TH_3$, были сопоставлены с результатами определения MOB методом проточной цитометрии в качественном и количе-

ственном форматах. Общая качественная сопоставимость результатов в 99 образцах составила 84,8 % (рис. 4). При этом она была несколько ниже в TH_2 (76,5 %) по сравнению с TH_1 и TH_3 (83,9 и 94,1 % соответственно). Интересно отметить, что 11 из 15 дискордантных образцов были негативны по данным ПЦР, но слабопозитивны по данным проточной цитометрии; медиана MOB в этих образцах составляла 0,003 % (диапазон 0,001–0,013 %). К настоящему моменту ни у одного из пациентов, у которых были получены дискордантные результаты как в сторону ПЦР-РВ, так и в сторону проточной цитометрии, рецидивов не наблюдалось.

При сравнении количественных результатов определения MOB разными методами мы попарно сопоставляли процентное соотношение *ETV6-RUNX1/ABL1* с процентом опухолевых клеток, выявленным при проведении проточной цитометрии и рассчитанным от общего количества исследованных ядросодержащих клеток в образце. Исследование было проведено в 95 образцах, 40 из которых были негативны по данным обоих методов. Выявлена высокая степень корреляции между количественными данными по определению MOB методами ПЦР-РВ и проточной цитометрии ($R^2 = 0,953$, $p < 0,0001$) (рис. 5). Ранее нами было показано, что при

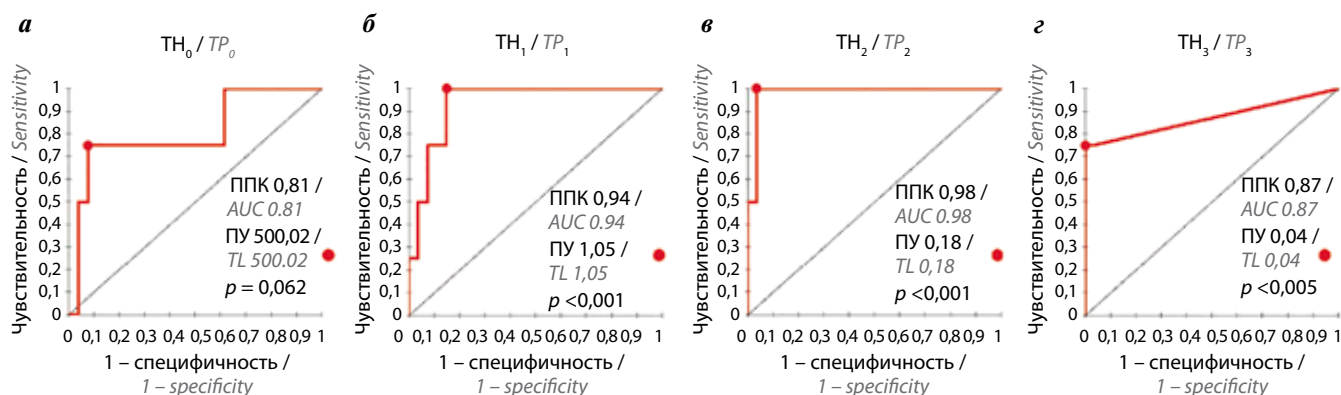


Рис. 2. Результаты ROC-анализа. ППК – площадь под кривой (показатель, отражающий достоверность полученного результата), ● – оптимальные пороговые уровни (ПУ), позволяющие с наибольшей эффективностью разделить пациентов с разными исходами терапии, TH – точка наблюдения

Fig. 2. Results of ROC-curve analysis. AUC – area under curve (represent the reliability of the results), ● – optimal threshold level (TL), allowing the most effective stratification of patients with different therapy outcomes, TP – time point

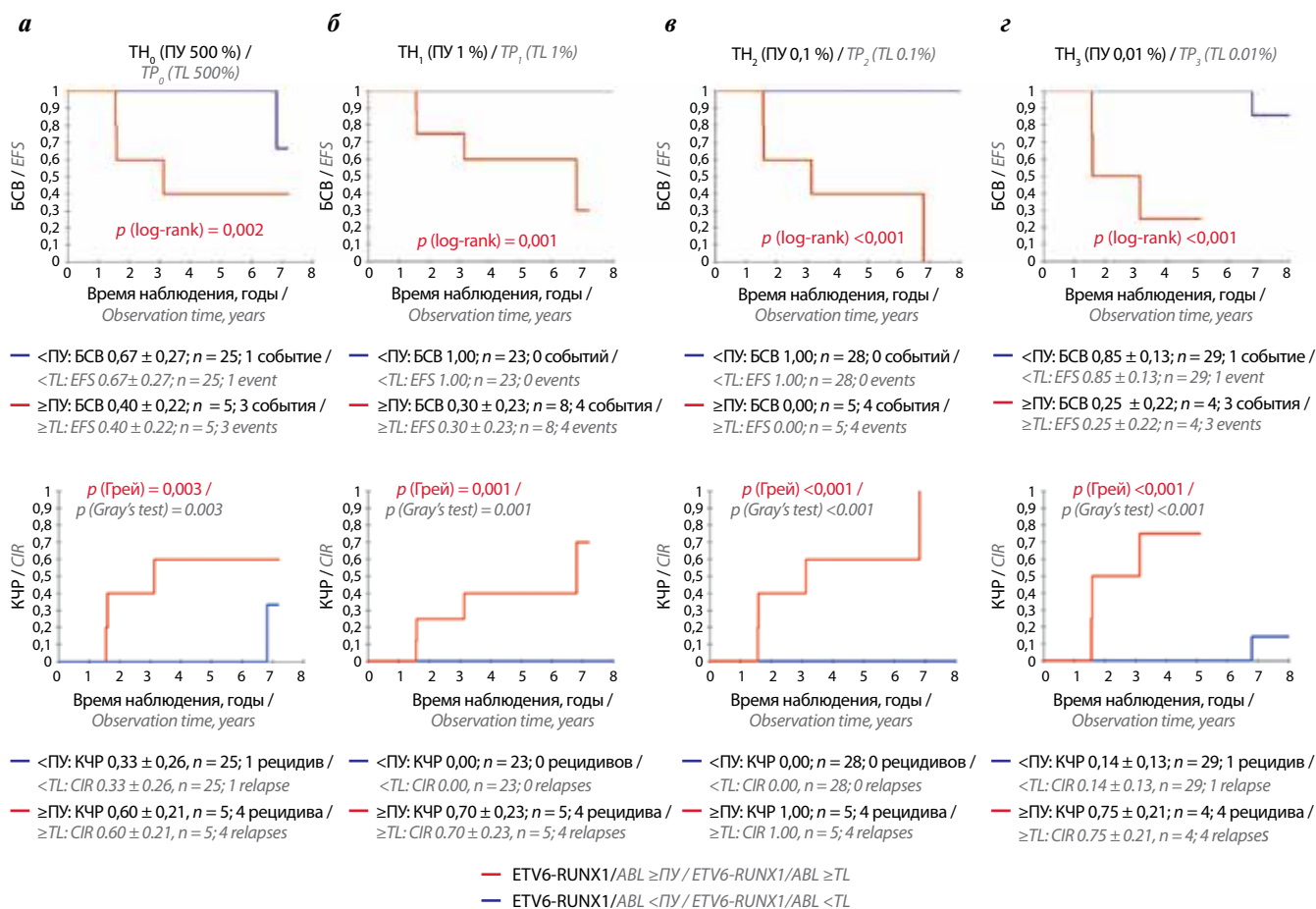


Рис. 3. Прогностическое значение отношения ETV6-RUNX1/ABL1 с учетом выявленных пороговых уровней (ПУ) для времени установления диагноза (точка наблюдения 0 – TH₀) и 3 последовательных точек наблюдения (TH₁– TH₃), бессобытийная выживаемость (БСВ) и кумулятивная частота развития рецидивов (КЧР) для каждой TH: а, б, в, г – соответственно TH₀, TH₁, TH₂, TH₃

Fig. 3. Prognostic significance of ETV6-RUNX1/ABL1 ratio based on identified threshold levels (TL) for diagnosis time (day 0 – TP₀) and 3 consecutive time-points (TP₁– TP₃); event-free survival (EFS) (upper row) and cumulative incidence of relapse (CIR) (lower row) for each TP: а, б, в, г – TP₀, TP₁, TP₂, TP₃ respectively

ETV6-RUNX1-позитивных ОЛЛ для результатов определения МОБ проточной цитометрией в TH₁ и TH₂ прогностически значимыми также являются ПУ в 1,0 и 0,1 %

соответственно [16]. В табл. 3 (см. на с. 22) показано, что оба метода при использовании одинаковых ПУ позволяют выделять в целом одинаковые группы пациентов.

		а Все образцы (n = 99) / All samples (n = 99)		б ТН ₁ (n = 31) / TP ₁ (n = 31)		в ТН ₂ (n = 34) / TP ₂ (n = 34)		г ТН ₃ (n = 34) / TP ₃ (n = 34)	
OT-ПЦР / RT-PCR	Обнаружено / Detected	37	4	22	2	11	1	4	1
	Не обнаружено / Not detected	11	47	3	4	7	15	1	28
		Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected	Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected	Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected	Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected
		Сопоставимость 84,8 % / Concordance 84.8%		Сопоставимость 83,9 % / Concordance 83.9%		Сопоставимость 76,5 % / Concordance 76.5%		Сопоставимость 94,1 % / Concordance 94.1%	

Рис. 4. Качественное сопоставление выявления *ETV6-RUNX1* и минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии в 3 последовательных точках наблюдения (ТН): а – все образцы (n = 99), б – ТН₁ на 15-й день лечения, в – ТН₂ на 36-й день лечения, г – ТН₃ на 85-й день лечения. ОТ-ПЦР – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция

Fig. 4. Qualitative concordance of *ETV6-RUNX1* detection and flow-cytometric minimal residual disease in 3 consecutive time-points (TP): а – all samples (n = 99); б – TP₁ – day 15 of remission induction; в – TP₂ – day 36 of remission induction; г – TP₃ – day 85 of treatment. RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction

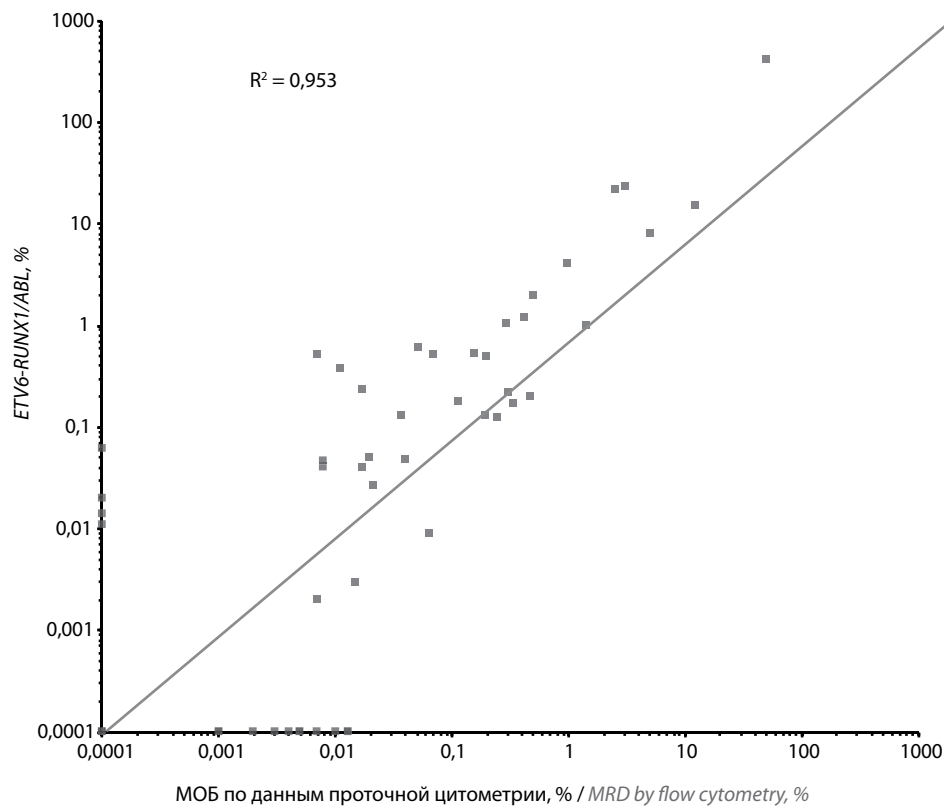


Рис. 5. Количественное сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни (МОБ) методом проточной цитометрии и отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, определенного в ходе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Fig. 5. Quantitative concordance of minimal residual disease (MRD) by multicolor flow cytometry and *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio revealed by real-time quantitative PCR

Обсуждение

Нами установлено, что инициальная гиперэкспрессия *ETV6-RUNX1* предопределяет неблагоприятный прогноз t(12;21)-позитивного ОЛЛ у детей. В работе W. Stams и соавт. также было показано, что

у пациентов с транслокацией t(12;21)(p13;q22) высокий уровень экспрессии нормального *RUNX1*, химерного *ETV6-RUNX1* и реципрокного *RUNX1-ETV6* транскриптов были ассоциированы с плохим прогнозом. Интересно отметить, что этот эффект не был связан

Таблица 3. Сравнение результатов количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и проточной цитометрии для выделения групп пациентов с различным риском развития рецидива на 15-й и 36-й дни индукционной терапии

Table 3. Comparison of results of real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) and flow cytometry for identification patients' groups with various risk of relapse on days 15 and 36 of remission induction

Значение транскрипта при исследовании методом ПЦР-РВ Transcript value in the RQ-PCR assay	Число больных (количество рецидивов) Number of patients (number of relapses)		
	Проточная цитометрия Flow cytometry		Итого Total
	МОБ <1 % MRD <1.0 %	МОБ ≥1 % MRD ≥1.0 %	
День 15-й Day 15			
<i>ETV6-RUNX1/ABL1</i> <1 %	20 (0)	1 (0)	21 (0)
<i>ETV6-RUNX1/ABL1</i> ≥1 %	3 (1)	5 (3)	8 (4)
<i>Итого</i> Total	23 (1)	6 (3)	29 (4)
День 36-й Day 36			
	МОБ <0,1 %	МОБ ≥0,1 %	
<i>ETV6-RUNX1/ABL1</i> <0,1 %	28 (0)	0 (0)	28 (0)
<i>ETV6-RUNX1/ABL1</i> ≥0,1 %	2 (1)	3 (3)	5 (4)
<i>Итого</i> Total	30 (1)	3 (3)	33 (4)

с резистентностью к преднизолону, винкристину и L-аспарагиназе – стандартным препаратам для лечения ОЛЛ [17].

Использование качественной ОТ-ПЦР, обнаруживающей наличие химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* для оценки МОБ, началось в середине 1990-х годов, почти сразу же после описания методики ПЦР-диагностики данной генетической аберрации [44, 45]. К. Seeger и соавт. не смогли выявить прогностическую роль различной скорости клиренса *ETV6-RUNX1* у пациентов с первичным ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-BFM-95, в отличие от пациентов с рецидивом ОЛЛ, лечившихся по протоколу ALL-REZ BFM-96 [20]. Также отсутствие взаимосвязи между прогнозом и количеством химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на момент окончания индукционной терапии (день 33) по протоколам 58881 и 58951 Европейской организации по изучению и лечению рака (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC) было зафиксировано в исследовании S. Drunat и соавт. [19]. Противоположные данные были получены J. Madzo и соавт. на относительно большой группе детей с t (12;21)-позитивным ОЛЛ (n = 57), получавших терапию по протоколу ALL-BFM-95: сохранение МОБ на 33-й день было связано с повышенной вероятностью рецидива ОЛЛ [22]. Схожие результаты были описаны J. Lee и соавт: выявление химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* по окончании индукции ремис-

сии являлось независимым прогностическим фактором, ведущим к снижению бессобытийной и общей выживаемости [13].

В нашем исследовании качественное выявление химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* имело прогностическое значение только при определении на 36-й и 85-й дни терапии, но не на 15-й день. В то же время 9 МОБ-негативных в ТН₁ пациентов безусловно представляют собой группу с наилучшим ответом на терапию и являются возможными кандидатами на снижение интенсивности или продолжительности лечения в будущем. ТН₂ и ТН₃ оказались более предпочтительными для выявления пациентов с высоким риском развития рецидива с помощью качественной ОТ-ПЦР. Тем не менее более точные результаты были получены при исследовании МОБ методом количественной ПЦР-РВ. Определенные с помощью ROC-анализа ПУ позволили очень точно выделить группы пациентов с плохим прогнозом во всех 3 ТН. Однако если в группе высокого риска, сформированной по результатам выявления МОБ в ТН₁, рецидивировали 50 % пациентов, то при определении такой группы по данным ТН₂ рецидивы были зафиксированы уже в 80 % случаев. Кроме того, не было ни одного пациента с высоким уровнем МОБ в ТН₂, кто не был бы отнесен к группе с плохим прогнозом в ТН₁. Таким образом, определение МОБ на момент окончания индукционной терапии позволило максимально уточнить группу высокого

риска, избежав избыточного включения в нее пациентов с медленным клиренсом опухолевых клеток по данным, полученным в ТН₁. В то же время, если для выделения группы детей с плохим прогнозом предпочтительнее использовать результаты определения МОБ в ТН₁, то для выявления пациентов с хорошим ответом на терапию, наоборот, более подходит день 15-й [16]. Эта задача крайне актуальна именно при *ETV6-RUNX1*-позитивном ОЛЛ, так как традиционно наличие данной генетической aberrации считается благоприятным фактором риска и именно в этой группе пациентов в перспективе может оказаться обоснованным снижение интенсивности или продолжительности химиотерапии. Последнее с успехом было предпринято японскими исследователями при лечении по протоколу TCCSG L92–13, в рамках которого БСВ у пациентов с наличием *ETV6-RUNX1*, достигших клинико-гематологической ремиссии, составляла $93,8 \pm 6,1$ % [46].

Сравнительный анализ определения МОБ различными методами выполнялся неоднократно, и чаще всего это делалось для сопоставления данных проточной цитометрии и определения индивидуальных перестроек *Ig/TCR* [47–53]. Сравнение метода выявления химерных транскриптов [23, 54–56] или химерных генов [57] с 1 из 2 упомянутых методов проводится значительно реже. Так, Т. Taube и соавт. выявили конкордантные результаты количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и индивидуальных перестроек *Ig/TCR* в 34 из 36 образцов от детей

с рецидивом ОЛЛ [23]. В 2 дискордантных образцах (5,5 %) величина МОБ, определенная по данным индивидуальных перестроек *Ig/TCR*, была значительно выше, чем по результатам мониторинга химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*, несмотря на сопоставимую чувствительность обоих тестов. Схожие результаты получены также Е. Fronkova и соавт. Они выявили высокую корреляцию между этими методами ($R^2 = 0,903$) при прямом количественном сравнении [54]. Также авторами было показано, что только 8 из 117 образцов (6,8 %) различались между собой более чем в 10 раз, причем эта тенденция чаще всего проявлялась тем, что результаты определения *ETV6-RUNX1* были ниже по сравнению с *Ig/TCR*. Это несколько расходится с нашими данными, опубликованными ранее и свидетельствующими о более высокой частоте обнаружения химерных транскриптов в РНК, нежели при подходах, основанных на мониторинге химерных генов в геномной ДНК для выявления МОБ. Однако необходимо отметить, что проведенное нами сравнение касалось перестроек гена *MLL* [58].

Также хорошо сопоставимые результаты получены в работе S. Alm и соавт. при сравнении количества химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и МОБ, определяемой методом проточной цитометрии. Однако в этом исследовании процент опухолевых клеток, выявленный методом проточной цитометрии, сравнивался с частным от деления *ETV6-RUNX1* / нормальный ген в каждой из ТН к этой же величине в момент установления диагноза (ТН₀) [55]. Нам представляется

Таблица 4. Различный подход к определению минимальной остаточной болезни

Table 4. Various approaches for the minimal residual disease detection

Метод Method	Способ Method
Определение клональных перестроек генов <i>Ig/TCR</i> Detection of clonal <i>Ig/TCR</i> rearrangements	Логарифмическое снижение количества ДНК из клеток, имеющих клоноспецифические перестройки генов <i>Ig/TCR</i> , относительно ДНК из исходной опухолевой популяции Log10 decline of DNA isolated from cells, carrying clonal <i>Ig/TCR</i> rearrangements, in relation to DNA from an initial blast cells population
Определение химерных генов Detection of fusion genes in DNA	Логарифмическое снижение количества ДНК из клеток, несущих химерный ген, относительно ДНК из исходной опухолевой популяции Log10 decline of DNA isolated from cells, carrying fusion gene in relation to DNA from an initial blast cells population
Определение химерных транскриптов (вариант 1) Detection of fusion gene transcripts in RNA (option 1)	Отношение нормализованной экспрессии химерного гена в определенной точке наблюдения по отношению к инициально диагностированной Ratio of normalized expression of fusion gene transcript at a precise time-point in relation to initial the normalized expression
Определение химерных транскриптов (вариант 2) Detection of fusion gene transcripts in RNA (option 2)	Отношение экспрессии химерного гена опухолевыми клетками к экспрессии нормального гена всеми клетками костного мозга на момент проведения исследования Ratio of fusion gene transcript expression in blast cells to expression of control gene from all nucleated cells at a precise time-point
Многоцветная проточная цитометрия Multicolor flow cytometry	Процентное содержание опухолевых клеток среди всех ядросодержащих клеток костного мозга на момент проведения исследования Percentage of blast cells out of all nucleated cells at a precise time-point

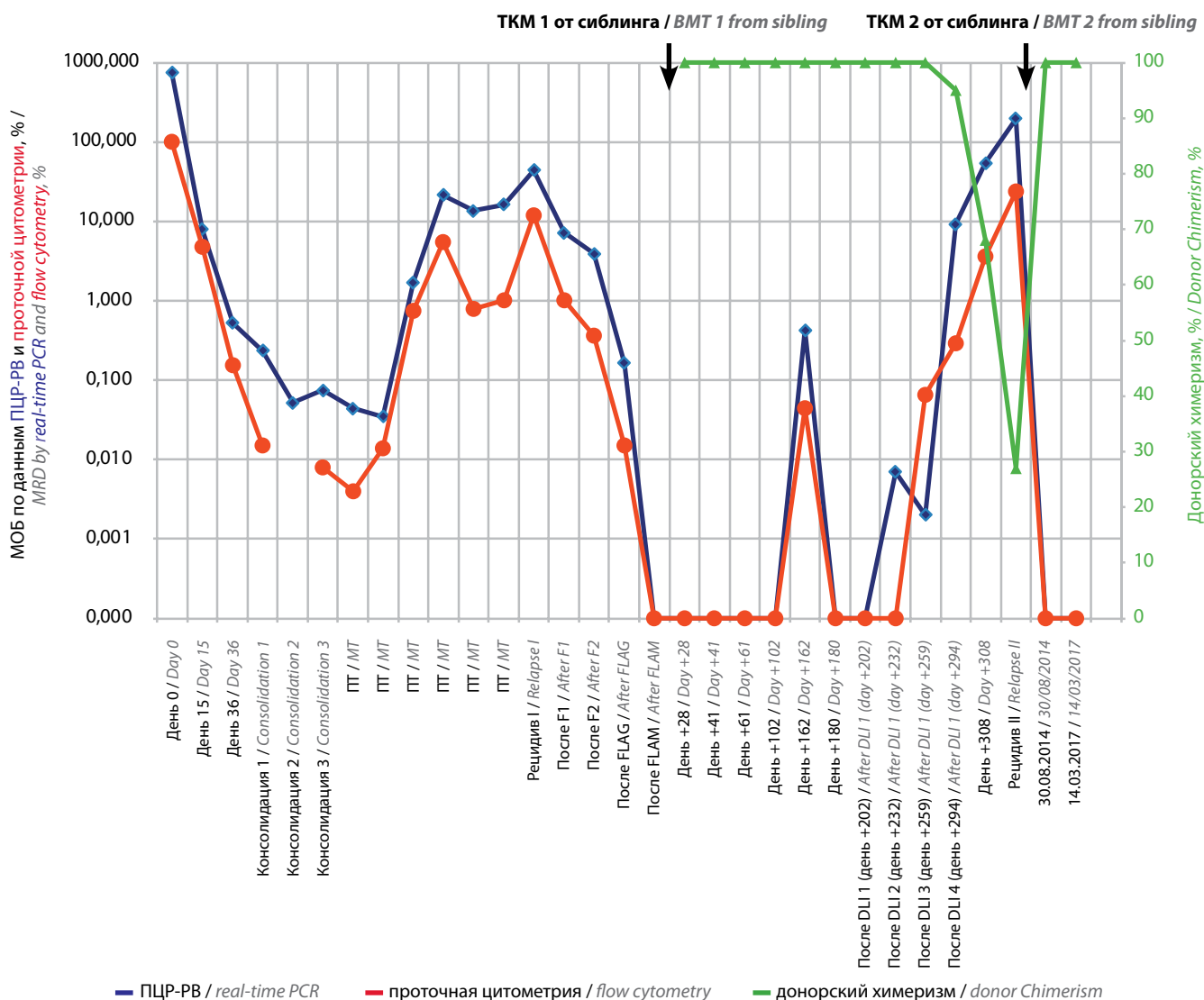


Рис. 6. Пример совместного мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с определением значения *ETV6-RUNX1/ABL1* и проточной цитометрии. ТКМ – трансплантация костного мозга, DLI – инфузия донорских лимфоцитов, F1, F2, FLAG, FLAM – химиотерапевтические блоки при лечении рецидива, ПТ – поддерживающая терапия
Fig. 6. Example of combined minimal residual disease (MRD) monitoring by real-time quantitative PCR (RT-PCR) with detection of *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio and by multicolor flow cytometry. BMT – bone marrow transplantation, DLI – donor lymphocyte infusion, F1, F2, FLAG, FLAM – blocks of chemotherapy in the treatment of relapse, MT – maintenance therapy

более логичным для сопоставления с данными проточной цитометрии применять в качестве величины МОБ отношение количества транскриптов химерного и нормального генов (табл. 4, вариант 2), так как такой способ расчета величины МОБ наиболее близок к методике ее измерения иммунофенотипированием (см. табл. 4). Более того, полученный нами коэффициент корреляции между данными ПЦР-РВ и проточной цитометрии ($R^2 = 0,953$) практически не отличается от этого же показателя, если бы мы проводили расчет по методике S. Alm и соавт. ($R^2 = 0,964$).

Принципиально важным является и то, что выявленные нами ранее для *ETV6-RUNX1*-позитивного ОЛЛ прогностически значимые уровни цитометрически определяемой МОБ как для $ТН_1$, так и для $ТН_2$ [16] оказались идентичными тем ПУ, которые были

получены в данном исследовании для количественной ПЦР-РВ. Кроме того, при длительном мониторинге МОБ параллельно 2 методами кинетика элиминации опухолевых клеток оказалась сходной (рис. 6). Полученная нами в данной работе высокая качественная и количественная сопоставимость результатов ПЦР и проточной цитометрии свидетельствует о валидности полученных результатов и минимизирует возможные случайные ошибки при анализе прогностического значения МОБ, определяемой методом ПЦР-РВ как отношение *ETV6-RUNX1/ABL1*. Важно отметить, что методы как проточной цитометрии [16], так и выявления химерных транскриптов [59] являются наиболее воспроизводимыми и относительно недорогими для мониторинга МОБ, а идентичность прогностически значимых ПУ МОБ для обоих методов делает

их наиболее удобными для совместного применения у пациентов с t(12;21).

Сравнение результатов с нашей собственной более ранней работой показало снижение сопоставимости качественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и данных проточной цитометрии с 96,3 % [56] до 84,8 %. Возможно, отчасти это связано с более чем 3-кратным увеличением числа исследованных t(12;21)-позитивных образцов.

Однако, несмотря на статистическую значимость полученных результатов, сложно делать однозначные выводы о прогностической роли выявления МОБ по данным, полученным на относительно небольшой когорте пациентов в моноцентровом исследовании. Поэтому крайне актуальным является вопрос проведения стандартизации определения МОБ данным методом в рамках многоцентрового исследования. Наиболее целесообразным представляется обследование всех *ETV6-RUNX1*-позитивных пациентов в нескольких референсных лабораториях, использующих единые протокол анализа, условия проведения обратной транскрипции и ПЦР и контрольные материалы. При этом на 1-м этапе необходимо проведение сравнительного анализа результатов на разведениях клеточной линии REN, затем на образцах пациентов, после чего станет возможным перейти к мониторингу МОБ в многоцентровом формате. Ранее неоднократно было показано, что *ETV6-RUNX1* представляет собой маркер, экспрессия которого остается стабильной не менее 48 ч с момента взятия биологического мате-

риала [20, 22, 23], что существенно облегчает исследование в многоцентровом режиме.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного нами анализа было показано, что определение количества химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на разных этапах терапии ВП-ОЛЛ имеет важное прогностическое значение. Гиперэкспрессия *ETV6-RUNX1* при установлении диагноза, а также величина МОБ, определяемая как отношение количества копий химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* к транскрипту нормального гена *ABL1*, на 15-й и 36-й дни терапии по протоколу ALL-MB-2008 являются важными факторами риска, влияющими на прогноз t(12;21)-позитивного ОЛЛ у детей. Также была показана хорошая качественная и количественная сопоставимость результатов определения МОБ при исследовании методом проточной цитометрии и выявления химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*. Прогностически значимые уровни МОБ для 2 методов оказались идентичными. Поскольку включенные в данное исследование пациенты представляют собой часть группы многоцентрового исследования ALL-MB-2008, полученные результаты обязательно должны быть валидированы в проспективном режиме в многоцентровом формате. Дальнейшее обсуждение прогностического значения результатов определения МОБ при t(12;21)-позитивном ОЛЛ у детей может позволить включить данную технологию в систему стратификации этих пациентов на группы риска в будущем.

Благодарности. Авторы выражают благодарность всем врачам и медицинским сестрам отделения детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1 (Екатеринбург).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Romana S.P., Le Coniat M., Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:186–91. PMID: 7515661.
- Golub T., Barker G., Bohlander S. et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(11):4917–21. PMID: 7761424.
- Romana S.P., Mauchauffe M., Le Coniat M. et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995;85(12):3662–70. PMID: 7780150.
- Liang D., Shih L., Yang C. et al. Frequencies of ETV6-RUNX1 fusion and hyperdiploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia are lower in Far East than West. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55(3):430–3. DOI: 10.1002/pbc.22628. PMID: 20658612.
- Moricke A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265–84. DOI: 10.1038/leu.2009.257. PMID: 20010625.
- Moorman A., Ensor H., Richards S. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11(5):429–38. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70066–8. PMID: 20409752.
- Shurtleff S., Buijs A., Behm F. et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9(12):1985–9. PMID: 8609706.
- Borkhardt A., Cazzaniga G., Viehmann S. et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood* 1997;90(2):571–7. PMID: 9226156.
- Kobayashi H., Rowley J. Identification of cytogenetically undetected 12p13 translocations and associated deletions with fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(1):66–9. PMID: 7534114.
- Loh M., Goldwasser M., Silverman L. et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber

- Cancer Institute Consortium Protocol 95–01. *Blood* 2006;107(11):4508–13. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3451. PMID: 16493009.
11. Forestier E., Heyman M., Andersen M.-K. et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol* 2008;140(6):665–72. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2008.06980.x. PMID: 18241254.
 12. Bhojwani D., Pei D., Sandlund J. et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia* 2012;26(2):265–70. DOI: 10.1038/leu.2011.227. PMID: 21869842.
 13. Lee J., Kim S., Jang P. et al. Outcome and prognostic factors for ETV6/RUNX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia treated at a single institution in Korea. *Cancer Res Treat* 2017;49(2):446–53. DOI: 10.4143/crt.2016.211. PMID: 27506214.
 14. Pui C.-H., Pei D., Raimondi S. et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. *Leukemia* 2017; 31(2):333–9. DOI: 10.1038/leu.2016.234. PMID: 27560110.
 15. Conter V., Bartram C., Valsecchi M.-G. et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;115(16):3206–14. DOI: 10.1182/blood-2009-10-248146. PMID: 20154213.
 16. Попов А. М., Вержбицкая Т. Ю., Цаур Г. А. и др. Применение проточной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколам со сниженной интенсивностью. *Онкогематология* 2015;10(4):44–55. [Popov A. M., Verzhbitskaya T. Yu., Tsauro G. A. et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia treated by regimens with reduced intensity. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(4):44–55. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-44-55.
 17. Stams W., den Boer M., Beverloo B. et al. Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2974–80. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-04–1829. PMID: 15837750.
 18. Ballerini P., Landman Parker J., Laurendeau I. et al. Quantitative analysis of TEL/AML1 fusion transcripts by real-time RT-PCR assay in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(8):1526–8. PMID: 10942253.
 19. Drunat S., Olivi M., Brunie G. et al. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;114(2):281–9. PMID: 11529845.
 20. Seeger K., Kreuzer K.-A., Lass U. et al. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood all by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer Res* 2001;61(6):2517–22. PMID: 11289124.
 21. Bolufer P., Barragán E., Verdeguer A. et al. Rapid quantitative detection of TEL-AML1 fusion transcripts in pediatric acute lymphoblastic leukemia by real-time reverse transcription polymerase chain reaction using fluorescently labeled probes. *Haematologica* 2002;87(1):23–32. PMID: 11801462.
 22. Madzo J., Zuna J., Muziková K. et al. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer* 2003;97(1):105–13. DOI: 10.1002/cncr.11043. PMID: 12491511.
 23. 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. DOI: 10.1016/j.leukres.2003.11.006. PMID: 15158091.
 24. Литвинов Д. В., Карелин А. Ф., Романова К. И. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. *Доктор. Ру* 2015;10(11):30–7. [Litvinov D.V., Karelin A. F., Romanova K. I. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: current possibilities and unsolved problems. *Doctor.ru* 2015;10(11):30–7. (In Russ.)].
 25. Bennett J., Catovsky D., Daniel M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451–8. PMID: 188440.
 26. Bene M. C., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6. PMID: 7564526.
 27. Béné M. C., Nebe T., Bettelheim P. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567–74. DOI: 10.1038/leu.2010.312. PMID: 21252983.
 28. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Eds.: L. Shaffer, N. Tommerup. Basel: S. Karger, 2005.
 29. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Eds.: L. Schaffer, M. Slovak, L. Campbell. Basel: S. Karger, 2009.
 30. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Eds.: L. Schaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. Basel: S. Karger, 2013.
 31. ISCN 2016 An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Eds.: J. McGowan-Jordan, A. Simons, M. Schmid. Basel: S. Karger, 2016.
 32. Попов А. М., Вержбицкая 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. J., Tsauro 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.)].
 33. Цаур Г. А., Попов А. М., Фечина Л. Г., Румянцев С. А. Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2016;11(1):62–74. [Tsauro G. A., Popov A. M., Fechina L. G., Romyantsev S. A. Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(1):62–74. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-62-74.
 34. Попов А. М., Белевцев М. В., Божкова Е. В. и др. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы. *Онкогематология* 2016;11(4):64–73. [Popov A. M., Belevtsev M. V., Boyakova E. V. et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Russia–Belarus multicenter group experience. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(4):64–73. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-64-73.
 35. 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. [Tsauro G. A., Druy A. E., Popov A. M. et al. Microfluidic

- biochips for RNA quantity and quality evaluation in patients with oncological disorders. *Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Research* 2011;4:107–11. (In Russ.).
36. Harbott J., Viehmann S., Borkhardt A. et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* 1997;90(12):4933–7. PMID: 9389711.
 37. 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. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135. PMID: 14562125.
 38. Beillard E., Pallisaard 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. DOI: 10.1038/sj.leu.2403136. PMID: 14562124.
 39. Cross N., White H., Müller M. et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012;26(10):2172–5. DOI: 10.1038/leu.2012.104. PMID: 22504141.
 40. Zweig M., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;31:561–77. PMID: 8472349.
 41. Obuchowski N. ROC analysis. *Am J Roentgenol* 2005;184(2):364–72. DOI: 10.2214/ajr.184.2.01840364. PMID: 15671347.
 42. Kaplan E., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–81.
 43. Слинин А.С., Быданов О.И., Карачунский А.И. Анализ выживаемости и вероятности возникновения отдельных событий у пациентов с острым лейкозом. *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016; 15(3):34–9. [Slinin A.S., Bydanov O.I., Karachunskiy A.I. Analysis of survival and possibility of certain events in patients with acute leucosis. *Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric hematology/oncology and immunopathology* 2016;15(3):34–9. (In Russ.)]. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-3-34-39.
 44. Cayuela J.-M., Baruchel A., Orange C. et al. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88(1):302–30. PMID: 8704188.
 45. Satake N., Kobayashi H., Tsunematsu Y. et al. Minimal residual disease with TEL-AML1 fusion transcript in childhood acute lymphoblastic leukaemia with t(12;21). *Br J Haematol* 1997;97(3):607–11. PMID: 9207408.
 46. Kato M., Ishimaru S., Seki M. et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia* 2017;31:580–4. DOI: 10.1038/leu.2016.274. PMID: 27698447.
 47. Neale G., Coustan-Smith E., Pan Q. et al. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999;13(8):1221–6. PMID: 10450750.
 48. Malec M., Björklund E., Söderhäll S. et al. Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001;15(5):716–27. PMID: 11368431.
 49. Neale G., Coustan-Smith E., Stow P. et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(5):934–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403348. PMID: 15029212.
 50. Malec M., van der Velden V., Björklund E. et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of *Ig/TcR* rearrangements and multicolor flow cytometry immunophenotyping. *Leukemia* 2004;18(10):1630–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2403444. PMID: 15295608.
 51. Kerst G., Kreyenberg H., Roth C. et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005; 128(6):774–82. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05401.x. PMID: 15755280.
 52. Robillard N., Cavé H., Méchinaud F. et al. Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2005;90(11):1516–23. PMID: 16266899.
 53. Gaipa G., Cazzaniga G., Valsecchi M.G. et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1582–93. DOI: 10.3324/haematol.2011.060426. PMID: 22581001.
 54. Fronkova E., Madzo J., Zuna J. et al. TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005;19(7):1296–7. DOI: 10.1038/sj.leu.2403759. PMID: 15858617.
 55. Alm S., Engvall C., Asp J. et al. Minimal residual disease monitoring in childhood B lymphoblastic leukemia with t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1: concordant results using quantitation of fusion transcript and flow cytometry. *Int J Lab Hematol* 2017; 39(2):121–8. DOI: 10.1111/ijlh.12593. PMID: 28004528.
 56. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни методами проточной цитометрии и ПЦР химерного транскрипта у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников. *Гематология и трансфузиология* 2010;55(2):3–9. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Y. et al. Comparison of the results of evaluating the minimum residual disease by flow cytometry and by detecting the 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.)].
 57. Metzler M., Mann G., Monschein U. et al. Minimal residual disease analysis in children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of Ig/TCR rearrangements and the genomic fusion gene. *Haematologica* 2006;91(5):683–6. PMID: 16627248.
 58. Цаур Г.А., Попов А.М., Плеханова О.М. и др. Транслокация t(1;11)(p32;q23) с образованием химерного гена *MLL-EP35* при острых лейкозах: обзор литературы и описание 6 новых случаев. Подходы к мониторингованию минимальной остаточной болезни. *Онкогематология* 2013;1:17–32. [Tsaur G.A., Popov A.M., Plekhanova O.M. et al. Translocation t(1;11)(p32;q23) with *MLL-EP35* fusion gene formation in acute leukemias: a review and 6 new cases report. Approaches to minimal residual disease monitoring. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2013;1:17–32. (In Russ.)].
 59. 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 the minimal residual disease evaluated by detection of MLL fusion gene transcripts in infants under 1 year of age with acute lymphoblastic leukemia treated by the MLL-Baby protocol. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and transfusiology* 2012;57(4):12–22. (In Russ.)].

Статья поступила: 22.07.2017. Принята в печать: 17.11.2017.

Article received: 22.07.2017. Accepted for publication: 17.11.2017.