

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

Г.А. Цаур^{1,2}, А.М. Попов^{1,2}, Т.В. Наседкина³, О.В. Каленник³, А.М. Кустанович⁴, О.В. Алейникова⁴, А.Г. Солодовников⁵, Т.О. Ригер^{1,2}, О.В. Стренева^{1,2}, Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,5}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹ ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница №1, Екатеринбург; ² ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург; ³ ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ⁴ ГУ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь; ⁵ ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Резюме. В исследование включено 39 больных острым лимфобластным лейкозом в возрасте от 1 дня до 11 мес, получавших терапию по протоколу MLL-Baby. Минимальную остаточную болезнь (МОБ) выявляли методами полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с детекцией различных химерных транскриптов (ХТр) с участием гена *MLL*. МОБ-отрицательными считали образцы, в которых ХТр не был обнаружен в ходе как ОТ-ПЦР, так и ПЦР-РВ с чувствительностью не ниже 1×10^{-4} . Образцы костного мозга были взяты на момент диагностики, на 15-й (точка наблюдения 1 — ТН1) и 36-й (ТН2) дни индукционной терапии и далее после каждого курса полностью транс-ретиноевой кислоты (ТН3—ТН9). Проведение многофакторного анализа показало, что наиболее важными параметрами, влияющими на развитие рецидивов в исследуемой группе, были величина МОБ более 0,1% в ТН3: отношение опасности 4,250; 95% ДИ (1,159–15,585; $p = 0,029$) и любое сохранение МОБ-положительности в ТН4: отношение опасности 3,771; 95% ДИ (1,033–13,674; $p = 0,044$), которые имеют приблизительно равное прогностическое значение. Более поздние ТН, такие как ТН5, не имеют самостоятельного прогностического значения.

Ключевые слова: дети первого года жизни, острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, перестройки гена *MLL*

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

G.A. Tsaur^{1,2}, A.M. Popov^{1,2}, T.V. Nasedkina³, O.V. Kalennik³, A.M. Kustanovich⁴, O.V. Aleinikova⁴, A.G. Solodovnikov⁵, T.O. Riger^{1,2}, O.V. Strenева^{1,2}, E.V. Shorikov^{1,2}, L.I. Savelyev^{1,2,5}, L.G. Fechina^{1,2}

¹ Regional Children's Hospital N 1, Ekaterinburg; ² Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg; ³ V.A. Engelgardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow; ⁴ Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus; ⁵ Ural State Medical Academy, Ekaterinburg

S u m m a r y. The study was carried out in 39 patients with acute lymphoblastic leukemia aged 1 day to 11 months, treated by the MLL-Baby protocol. The minimal residual disease (MRD) was detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time quantitative PCR (qPCR) of *MLL* fusion gene transcripts (FGt). Specimens without FGt detected by both RT-PCR and qPCR with sensitivity of at least 1×10^{-4} were considered MRD-negative. Bone marrow specimens were collected at the time of diagnosis, on days 15 (time point 1 — TP1) and 36 (TP2) of remission induction and after each course of all-trans retinoic acid administration (TP3-TP9). Multivariate analysis showed that two most significant parameters essential for relapse prediction in this group of patients were MRD higher than 0.1% at TP3: hazard ratio 4.250; 95% confidence interval (CI) (1.159—15.585; $p = 0.029$) and MRD-positivity at TP4: hazard ratio 3.771; 95% CI (1.033-13.674; $p = 0.044$), both parameters have similar prognostic value. Later TPs, such as TP5, did not bring any extra advantages.

Key words: infants aged under 1 year, acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, *MLL* gene rearrangements

Дети первого года жизни, больные острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), представляют собой совершенно особую группу пациентов как вследствие

уникальной биологии данного заболевания [1, 2], так и из-за неблагоприятного прогноза [3—9]. В настоящее время для лечения этих детей в Российской Федерации и Республике Беларусь применяется отечественный протокол MLL-Baby, в основе которого лежит использование полностью транс-ретиноевой кислоты (all-trans retinoic acid — ATRA) совместно с программной химиотерапией [10, 11].

Одним из важных методов, помогающих оценивать степень редукции опухолевого клона, является мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ), под которой понимают наличие в организме большого опухолевых клеток в количествах, не рас-

Для корреспонденции:

Цаур Григорий Анатольевич, канд. мед. наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии отдела детской онкологии и гематологии ГБУЗ Областная детская клиническая больница №1, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории терапии онкогематологических заболеваний ГБУЗ СО Центр оказания специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»

Адрес: 620149, Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32.

Телефон/факс: +7 (343) 216-25-17.

E-mail: tsaur@mail.ru

познаваемых стандартными цитологическими методами. Для определения МОБ при ОЛЛ применяют такие высокочувствительные методы диагностики, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия [12—24].

Длительное отслеживание эффективности терапии путем оценки наличия и величины МОБ стало важной особенностью протокола Interfant-99 — крупнейшего международного исследования по лечению ОЛЛ у детей первого года жизни [14]. Для выявления МОБ методом ПЦР у больных ОЛЛ чаще всего используют определение специфических для каждого больного перестроек генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgH*) и Т-клеточных рецепторов (*TCR*) [12, 14, 15, 20, 24—27]. Однако было показано, что по сравнению с детьми более старшего возраста у детей первого года жизни этот метод имеет ограниченное применение, поскольку в данной группе больных перестройки *IgH/TCR* встречаются реже и часто являются олигоклональными [28, 29]. Более того, проведение такого исследования технически сложно, растянуто во времени и относительно дорого [13, 14, 24, 25], что затрудняет его использование для решения клинических задач в условиях нашей страны. Использование проточной цитометрии, еще одного метода, широко применяемого для мониторинга МОБ [13, 17, 18, 21—24], также может быть затруднено в данной возрастной группе вследствие совершенно особого иммунофенотипа опухолевых клеток [30—32] и нестабильной экспрессии антигенов под действием химиопрепаратов [33, 34]. Исследование экспрессии химерных генов, т. е. выявление химерных транскриптов (ХТр), с помощью ПЦР с обратной

транскрипцией (ОТ-ПЦР) представляет собой хорошую возможность контролировать МОБ у больных первого года жизни, так как перестройки гена *MLL* встречаются у большинства больных этой возрастной группы [2—4, 7—9], а данный метод молекулярной диагностики является стандартизованным, легко воспроизводимым и относительно быстро выполняемым [16, 19, 35], что позволяет получать результаты определения МОБ, сопоставимые как с результатами выявления перестроек генов *IgH/TCR* [36], так и с данными проточной цитометрии [37].

Целью данной работы являлась оценка прогностического значения определения МОБ путем выявления ХТр у детей первого года жизни с ОЛЛ и перестройками гена *MLL*, получающих терапию по протоколу MLL-Baby, а также определение наиболее ранней точки наблюдения (ТН), выявление МОБ в которой позволило бы разделить больных на различные группы риска в зависимости от исхода заболевания.

Материалы и методы

В исследуемую группу включили 39 детей в возрасте младше 365 дней, больных ОЛЛ с установленным типом перестроек гена *MLL*, получавших терапию по протоколу MLL-Baby с сентября 2003 г. по июнь 2011 г. Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании стандартных морфологических показателей [38] и данных иммунофенотипирования согласно критериям группы EGIL [39, 40]. Информированное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур было получено во всех случаях.

Медиана наблюдения составила 32 мес (диапазон 5—99 мес). В обследуемой группе было 12 (31%)

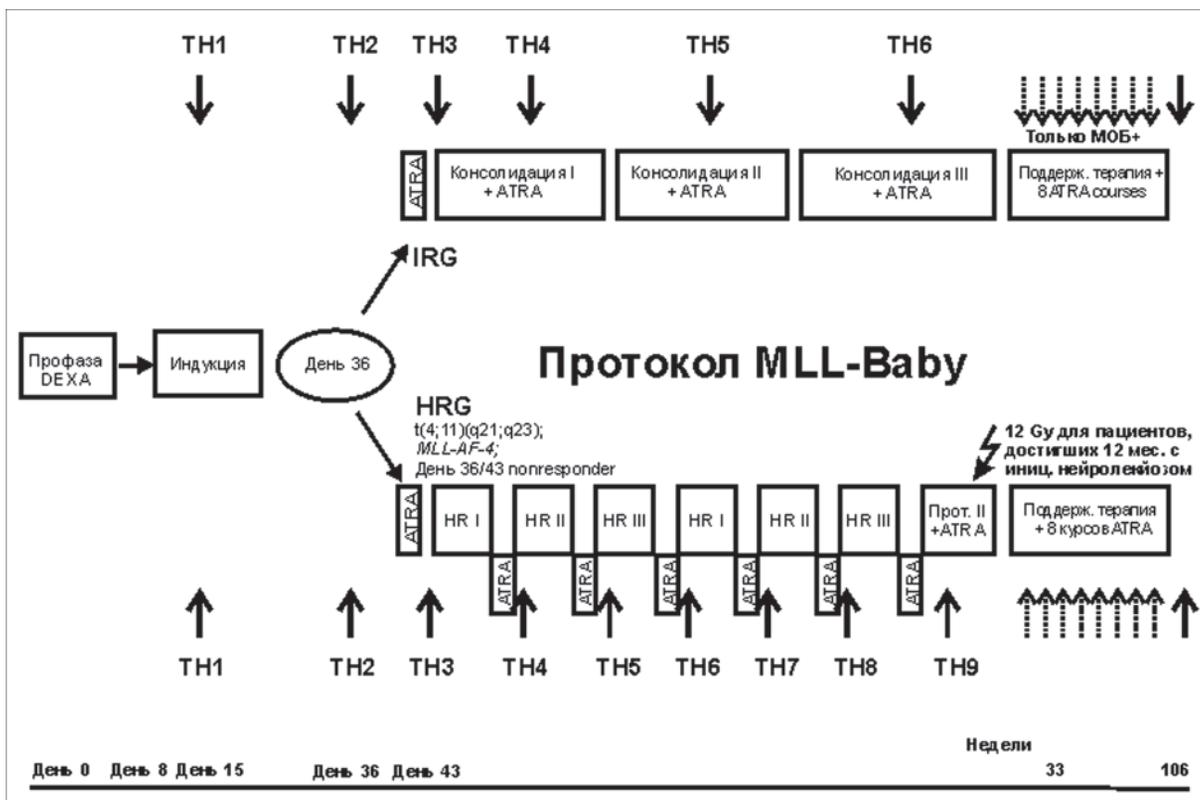


Рис. 1. Схема протокола MLL-Baby с указанием точек наблюдения (ТН), в которые производилась оценка МОБ.

ОТ-ПЦР	Положительно	4	120
	Отрицательно	57	1
		ПЦР-РВ	
		Отрицательно	Положительно

Рис. 2. Сравнение результатов определения МОБ методами гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ в 182 образцах больных с различными перестройками гена *MLL*. Сходимость двух методов составила 97,2%

мальчиков и 27 (69%) девочек, медиана возраста составила 4,37 мес (диапазон 0,03—11,8 мес). Лейкоцитоз более $100 \times 10^9/\text{л}$ в момент постановки диагноза имели 16 (41%) больных. Инициальное поражение центральной нервной системы (ЦНС) был зафиксировано у 10 (27%) из 37 больных. У 2 больных данные о проведении цитологического исследования спинно-мозговой жидкости отсутствовали.

Инициальное выявление перестроек гена *MLL* проводили методами гнездной ОТ-ПЦР по ранее описанным протоколам [16, 41—43] и флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с зондом LSI *MLL* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe («Ab-bott», США) согласно инструкции производителя. У 20 (51%) больных был выявлен ХТр *MLL-AF4*, по 5 (13%) больных имели ХТр *MLL-MLLT1* (ранее известный как *MLL-ENL*), *MLL-MLLT3* (*MLL-AF9*) и *MLL-MLLT10* (*MLL-AF10*), у 4 (10%) был обнаружен ХТр *MLL-EPS15* (*MLL-AF1p*). Качество выделенной РНК исследовали с использованием микроструйных чипов RNA 6000 Nano LabChip («Caliper Technologies», США) на Биоанализаторе Agilent 2100 («Agilent», США) согласно инструкции производителя. В дальнейшую работу брали образцы, в которых показатель целостности РНК превышал 4,2 [44].

Мониторинг МОБ путем выявления ХТр выполняли методами гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [19, 35, 45]. Чувствительность данных методов, которую оценивали методом лимитирующих разведений клеточной культуры RS411, составила 1×10^{-4} для ПЦР-РВ и 5×10^{-5} для ОТ-ПЦР. В качестве калибровочных стандартов для ПЦР-РВ использовали плазмиды, несущие фрагменты генов *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3*, *MLL-MLLT10*, *ABL* (все фирмы «Ipsogen», Франция), *MLL-EPS15* (лаборатория генной инженерии ГНЦ РАМН). В дальнейший анализ брали образцы, в которых экспрессия контрольного гена *ABL*, превышала 10^4 копий. Для количественной оценки величины МОБ на основании данных, полученных в ПЦР-РВ, использовали методику расчета, рекомендованную консорциумом «Europe Against Cancer», основанную на отношении величин экспрессии химерного и нормального генов на момент установления диагноза и в конкретной ТН [35]. Величину МОБ рассчитывали как отношение числа копий (ЧК) транскрипта хи-

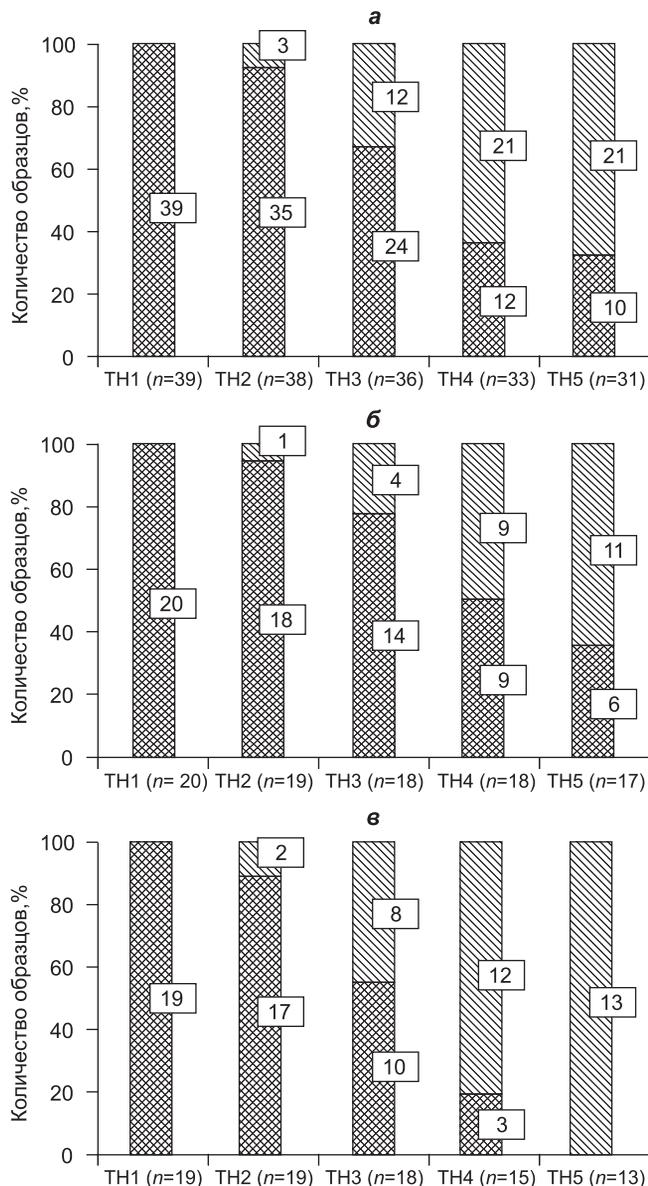


Рис. 3. Количество образцов, в которых была выявлена МОБ (штриховка) и в которых МОБ не обнаружена (светлые столбики) в TH1—TH5 с указанием количества больных: а — все больные; б — больные группы высокого риска согласно критериям протокола MLL-Baby; в — больные группы промежуточного риска.

мерного гена (ХГ) к числу копий транскрипта контрольного гена (КГ), взятых на момент установления диагноза (DS) и в конкретной ТН:

$$\text{МОБ} = (\text{ХГчк} / \text{КГчк})_{\text{ТН}} / (\text{ХГчк} / \text{КГчк})_{\text{DS}} \times 100\%.$$

Образцы костного мозга были взяты на момент диагностики, а также в ТН, предусмотренные протоколом терапии MLL-Baby (рис. 1); TH1—TH2 — 15-й и 36-й дни индукционной терапии; TH3—TH9 — после каждого курса ATRA. Больные с наличием *MLL-AF4* получали терапию по ветви высокого риска, все остальные — по ветви промежуточного риска [10]. МОБ-отрицательными считали образцы, в которых ХТр не был обнаружен в ходе как ОТ-ПЦР, так и ПЦР-РВ.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение SPSS 17.0, Statistica 8.0,

Таблица 1

Характеристика больных в зависимости от выявления МОБ в ТН4

Показатель	МОБ-отрицательные больные	МОБ-положительные больные	<i>p</i>
Количество больных	21	12	
Пол:			
М.	8	4	0,999
Ж.	13	8	
Возраст, мес:			
до 6	10	9	0,160
старше 6	11	3	
Инициальный лейкоцитоз, × 10 ⁹ /л:			
до 100	14	6	0,465
100 и выше	7	6	
Инициальное поражение ЦНС*:			
есть	6	1	0,379
нет	15	9	
Имунофенотип:			
CD10 ⁺ суцт ⁻	14	7	0,030
CD10 ^{-/+} суцт ⁻	2	5	
CD10 ⁻ суцт ⁺	5	—	
Перестройки гена <i>MLL</i> :			
<i>MLL-AF4</i>	9	9	0,156
<i>MLL-MLLT1</i>	3	2	
<i>MLL-MLLT3</i>	2	—	
<i>MLL-MLLT10</i>	4	—	
<i>MLL-EPS15</i>	3	1	
Ответ на дексаметазон на 8-й день**:			
хороший	19	10	0,610
плохой	2	2	
Статус костного мозга на 15-й день:			
M1	17	10	0,999
M2	4	2	
M3	—	—	
Клинико-гематологическая ремиссия на 36-й день:			
достигнута	21	12	—
не достигнута	—	—	
Группа риска по протоколу <i>MLL-Baby</i> :			
промежуточный риск	12	3	0,145
высокий риск	9	9	

Примечание.* — у 2 больных из группы МОБ-положительных отсутствовали данные об оценке поражения ЦНС.

Здесь и в табл. 2—3: ** — ответ на дексаметазон расценивали как хороший при абсолютном количестве бластных клеток в периферической крови менее 1000/мкл.

R-statistics и Analyse-it. При сравнении групп больных по качественным признакам использовали точный критерий Фишера. Для выявления порогового уровня величины МОБ, с наибольшей диагностической эффективностью разделяющей больных с различными исходами терапии, использовали метод характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых) [46, 47]. Результаты терапии оценивали по кривым бессобытийной выживаемости (БСВ), построенным по методу Каплана—Майера [48], а также по кумулятивной вероятности развития рецидива. Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический критерий log-rank. Расчет отношения опасности с 95% доверительным интервалом (ДИ) был проведен по методу Кокса [49] в однофакторной и многофакторной моделях. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами проведена оценка выявления МОБ помощью гнездовой ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ. МОБ была обнаружена обоими методами в 120 (65,9%) из 182 обследованных образцов, в то время как отрицательный результат при использовании как ОТ-ПЦР, так и ПЦР-РВ был зафиксирован в 57 (31,3%) образцах. В 4 (2,2%) образцах МОБ была выявлена только методом ОТ-ПЦР, в 1 (0,5%) — только ПЦР-РВ. Общая сходимость двух методов составила 97,2% (рис. 2). Во всех 5 дискордантных образцах уровень экспрессии гена *ABL*, используемого для нормализации, был выше порогового значения $1,00 \times 10^4$ копий; медиана составила $7,38 \times 10^4$ копий (диапазон $3,12 \times 10^4$ — $1,18 \times 10^5$). Образцы с дискордантными результатами не были взяты в дальнейший анализ.

Мы оценили количество МОБ-положительных и МОБ-отрицательных больных в различных ТН. Все больные были МОБ-положительными в ТН1. Затем происходило постепенное нарастание доли МОБ-отрицательных больных: с 8% в ТН2 до 67% в ТН5 (рис. 3, а). При разделении больных на группы высокого (рис. 3, б) и промежуточного (рис. 3, в) риска согласно критериям протокола *MLL-Baby*, выявленная тенденция сохранялась за исключением того, что в ТН5 ни у одного из больных группы промежуточного риска МОБ не выявлена.

Результаты сравнения величин БСВ и кумулятивной вероятности развития рецидива, полученные при разделении больных на группы в зависимости от выявления МОБ в ТН2, ТН3, ТН4, ТН5 приведены на рис. 4.

Наиболее ранней ТН, для которой были получены статистически значимые различия в результатах терапии между группами МОБ-положительных и МОБ-отрицательных больных, являлась ТН4. В этой точке наблюдения БСВ в группе МОБ-отрицательных больных была выше, а кумулятивная вероятность развития рецидива ниже, чем у больных, у которых зафиксировано наличие МОБ. БСВ составила $0,79 \pm 0,09$ и $0,13 \pm 0,11$, а кумулятивная вероятность развития рецидива — соответственно $0,20 \pm 0,01$ и $0,85 \pm 0,03$ ($p = 0,001$ в обоих случаях; рис. 4, в). Выявление

МОБ в ТН5 также было связано с неблагоприятным прогнозом. БСВ для группы МОБ-отрицательных больных была выше, чем для МОБ-положительных ($0,80 \pm 0,08$ и $0,14 \pm 0,12$ соответственно; $p = 0,006$), а кумулятивная вероятность рецидива у МОБ-отрицательных больных была существенно ниже, по сравнению с МОБ-положительными ($0,19 \pm 0,01$ и $0,86 \pm 0,02$ соответственно; $p = 0,005$; рис. 4, г).

Далее мы оценили прогностическое значение последовательного качественного выявления МОБ в ТН4 и ТН5 (рис. 5). Из 22 МОБ-положительных в ТН3 больных, у которых также определяли наличие МОБ в ТН4 и ТН5, кумулятивная вероятность развития рецидива в

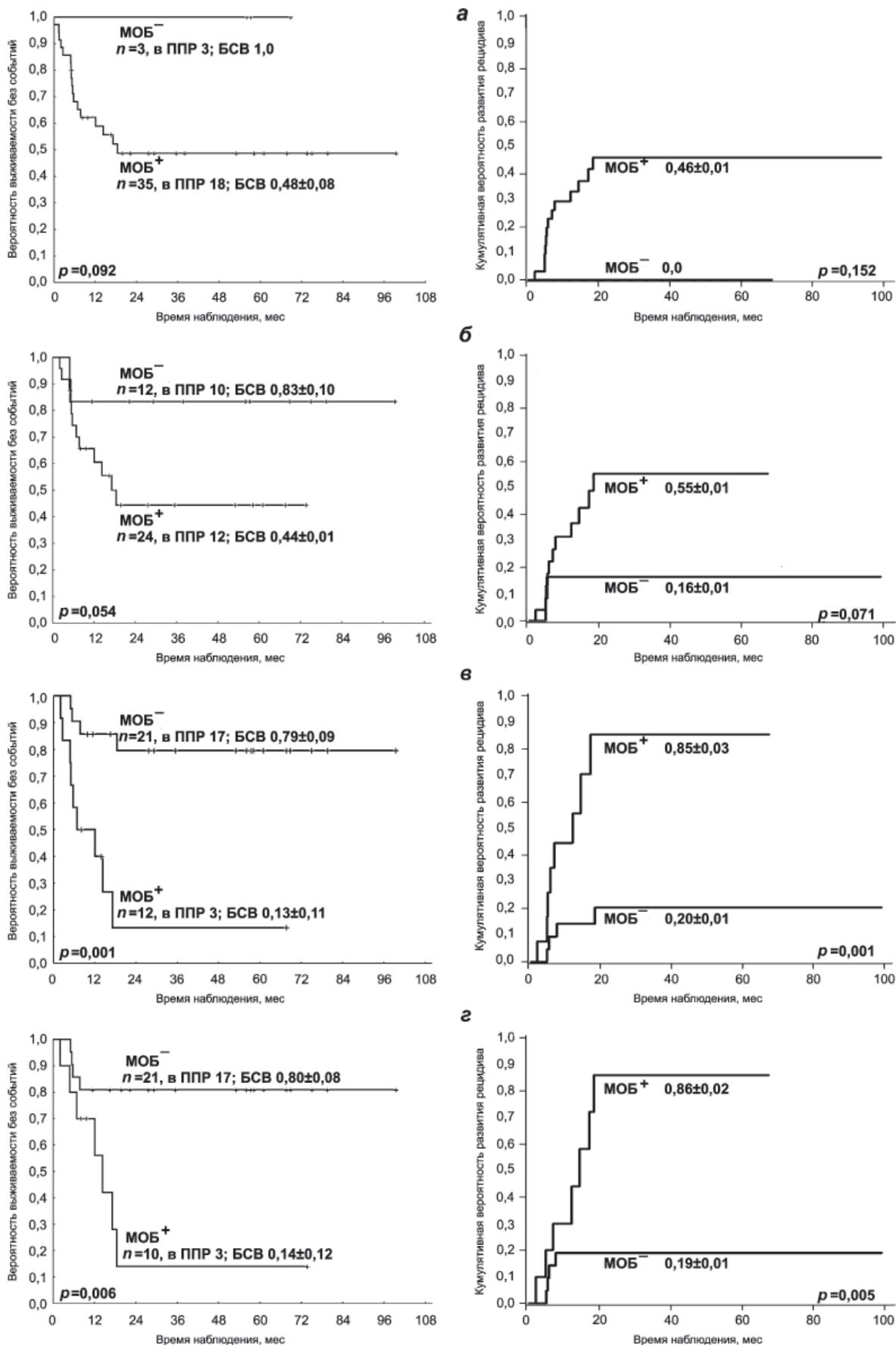


Рис. 4. Бессобытийная выживаемость (слева) и кумулятивная вероятность развития рецидива (справа) у МОБ-положительных и МОБ-отрицательных больных в зависимости от выявления МОБ в четырех последовательных точках наблюдения:

a — TH2; б — TH3; в — TH4; з — TH5.

Таблица 2

Анализ прогностических показателей, влияющих на возникновение рецидивов у больных ОЛЛ первого года жизни, получающих терапию по протоколу MLL-Baby с учетом МОБ в ТН4

Показатель	Количество больных	События	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			отношение опасности	95% ДИ	<i>p</i>	отношение опасности	95% ДИ	<i>p</i>
Возраст, мес:								
старше 6	14	1	1			1		
до 6	19	11	10,559	1,361—81,903	0,001	6,171	0,728—52,277	0,095
Иммунофенотип:								
CD10 ^{+/+} сyтr ⁻	7	5	1					
CD10 ⁻ сyтr ⁻	21	7	0,792	0,359—1,745	0,560			
CD10 ⁻ сyтr ⁺	5	0	—	—				
Наличие <i>MLL-AF4</i> :								
нет	15	4	1					
есть	18	8	1,899	0,571—6,316	0,302			
Инициальный лейкоцитоз, × 10 ⁹ /л:								
до 100	20	7	1					
100 и выше	13	5	1,252	0,396—3,960	0,704			
Инициальное поражение ЦНС:								
нет	24	7	1					
есть	7	4	2,316	0,669—8,018	0,193			
Ответ на дексаметазон на 8-й день**:								
хороший	29	9	1					
плохой	4	3	2,087	0,563—7,734	0,268			
Выявление МОБ в ТН4:								
отсутствие	21	4	1			1		
наличие	12	8	6,761	1,934—23,638	0,003	3,771	1,033—13,674	0,044

группе больных, сохранявших МОБ-положительность в ТН4, составила $0,86 \pm 0,02$, что было статистически значимо выше по сравнению с группой достигших в ТН4 МОБ-отрицательности ($0,33 \pm 0,03$) ($p = 0,009$). Из 11 больных, МОБ-положительных в ТН4, 8 сохраняли МОБ-положительный статус и в ТН5, в то время как только у 3 в данной ТН МОБ перестала обнаруживаться. У этих больных кумулятивная вероятность развития рецидива статистически значимо не различалась ($0,85 \pm 0,03$ и $0,67 \pm 0,27$ соответственно; $p = 0,570$). Таким образом, выявление МОБ в ТН5 не имеет преимуществ и не дает дополнительных данных по сравнению с ТН4, поэтому ТН4 была выбрана нами в качестве основной для качественного определения МОБ с целью прогнозирования исходов терапии при лечении по протоколу MLL-Baby.

Характеристика больных, МОБ-положительных и МОБ-отрицательных в ТН4, представлена в табл. 1. Группы пациентов статистически значимо не различались между собой по возрасту, полу, инициальным характеристикам ОЛЛ, показателям ответа на терапию.

Оценка влияния различных факторов на развитие рецидивов показала, что такие показатели, как наличие ХТр *MLL-AF4*, инициальное поражение ЦНС, инициальный лейкоцитоз выше 100×10^9 /л, количество бластных клеток в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии более 1000 и ряд других, оказались ста-

статистически незначимыми, а прогностически неблагоприятными факторами в исследуемой группе больных являлись сохранение МОБ-положительности в ТН4 ($p = 0,003$) и возраст младше 6 мес ($p = 0,001$). При сравнении этих параметров в многофакторной модели единственным независимым прогностическим фактором осталось сохранение МОБ-положительности в ТН4 ($p = 0,044$; табл. 2).

Сохранение МОБ в ТН4 было связано с неблагоприятным исходом заболевания в группе высокого риска (больные с наличием ХТр *MLL-AF4*; рис. 6), но не в группе промежуточного риска. Также не было

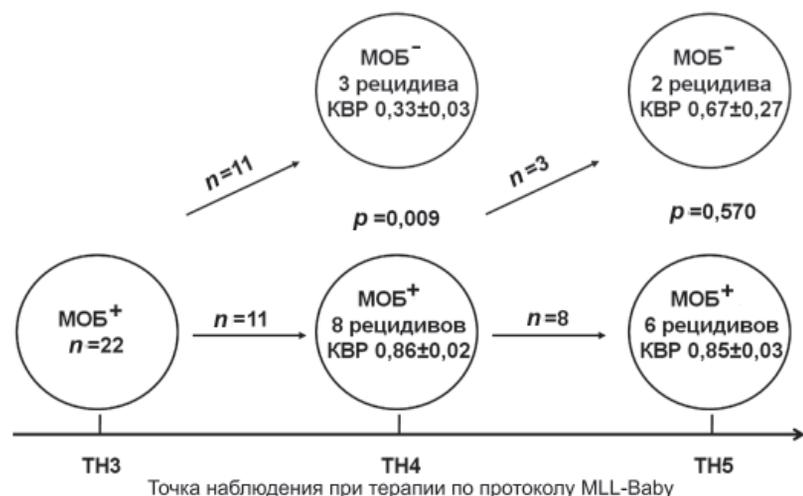


Рис. 5. Оценка прогностического значения последовательного качественного выявления МОБ в ТН3, ТН4 и ТН5.

Объяснения в тексте. КВР — кумулятивная вероятность развития рецидива.

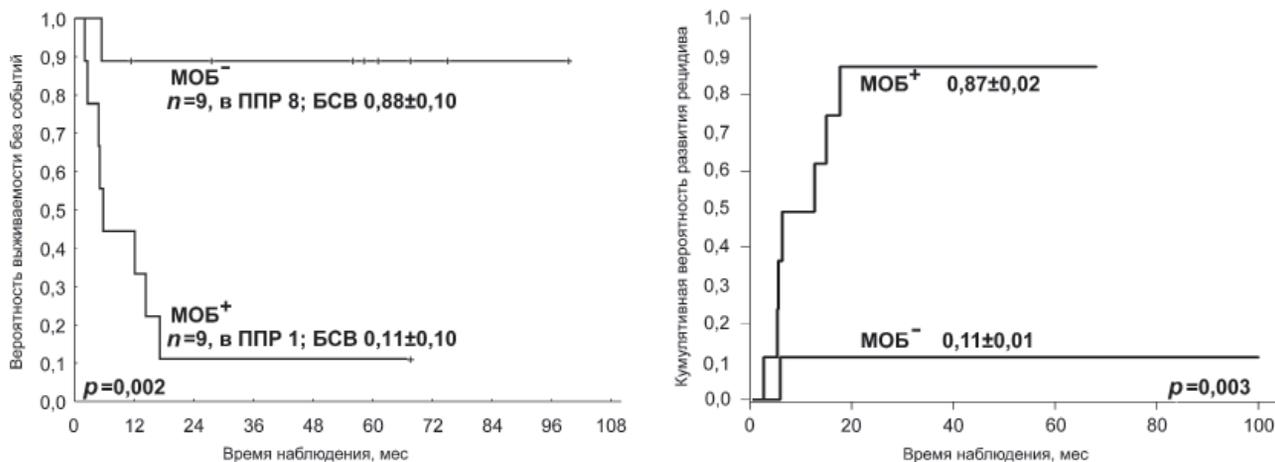


Рис. 6. Бессобытийная выживаемость (слева) и кумулятивная вероятность развития рецидива (справа) у больных с наличием *MLL-AF4* в зависимости от обнаружения МОБ в ТН4.

найден какой-либо ТН, выявление МОБ в которой было бы прогностически важным для больных группы промежуточного риска (данные не приведены).

Нами проанализирована возможность использования данных количественного анализа уровня МОБ методом ПЦР-РВ в ТН2 и ТН3. Нами не было найдено порогового значения МОБ в ТН2, разделяющего пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходами терапии. Известно, что в большинстве протоколов терапии, использующих величину МОБ для стратификации больных по группам риска, принята шкала оценки МОБ кратная 10 [49—54]. Принимая это во внимание, а также то, что методом анализа характеристических кривых (ROC-кривых) было выявлено, что пороговым уровнем МОБ в ТН3, наиболее эффективно разделяющим группы пациентов с различным исходом заболевания, является величина, равная 0,332% (рис. 7), которая близка к значению 0,1%, нами было принято решение использовать именно величину 0,1% в качестве пороговой, и по отношению к ней разделить больных с разным уровнем МОБ в ТН3.

Данная диагностическая модель позволила с высокой долей достоверности прогнозировать исходы

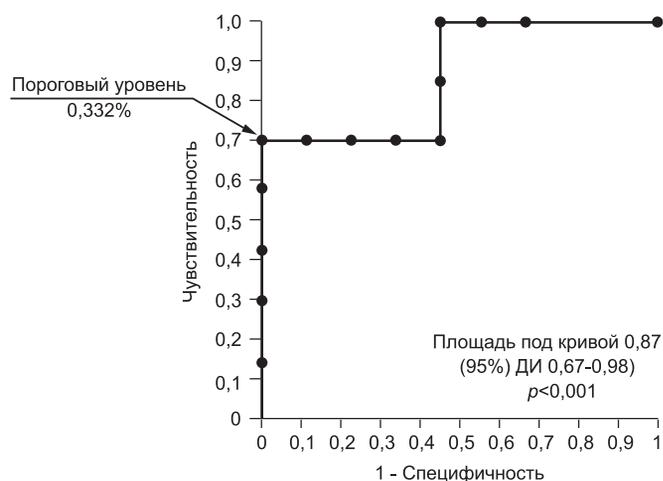


Рис. 7. ROC-кривая с указанием порогового уровня. Объяснение в тексте.

терапии по протоколу MLL-Baby. Больные с величиной МОБ в ТН3 более 0,1% ($n = 7$) имели более низкую БСВ и более высокую кумулятивную вероятность развития рецидива по сравнению с больными, у которых МОБ была ниже 0,1% ($n = 21$; $p = 0,011$ и $p = 0,017$ соответственно; рис. 8).

Так же как и для ТН4, мы провели одно- и многофакторный анализ в данной группе больных с целью поиска факторов, влияющих на развитие рецидивов (табл. 3). Возраст младше 6 мес и величина МОБ в ТН3 выше 0,1% были двумя статистически значимыми прогностически неблагоприятными факторами ($p = 0,041$ и $p = 0,003$ соответственно), однако в многофакторной модели только величина МОБ в ТН3 выше 0,1% сохранила свою значимость ($p = 0,029$).

Для определения, какой из параметров вносит наибольший вклад в неблагоприятный прогноз заболевания, было проведено сравнение степени влияния наличия МОБ в ТН4 и величины МОБ выше 0,1% в ТН3 на риск развития рецидива (табл. 4). Основываясь на величине отношения опасности, установили, что ни один из этих факторов не имеет преимущества перед другим, а выделяемые по ним группы больных приблизительно одинаковы.

В данной работе нами проведен анализ прогностической значимости мониторинга МОБ путем выявления и количественной оценки экспрессии химерных генов у детей первого года жизни, больных ОЛЛ и с наличием перестроек гена *MLL*, получающих терапию по протоколу MLL-Baby. Определение ХТр для мониторинга МОБ у больных ОЛЛ используется только в отдельных группах, когда ХТр выявляются у всех или у подавляющего большинства больных: например, при Rh-положительном ОЛЛ, ОЛЛ у детей первого года жизни. Это позволило не только оценить прогностическое значение определения МОБ путем выявления ХТр [51—53], но и найти ряд закономерностей в кинетике ХТр [43, 54, 55]. Полученные нами результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными о неблагоприятной прогностической роли выявления перестроек гена *MLL* на поздних этапах терапии ОЛЛ [52]. Определение МОБ, позволяющее оценить характер

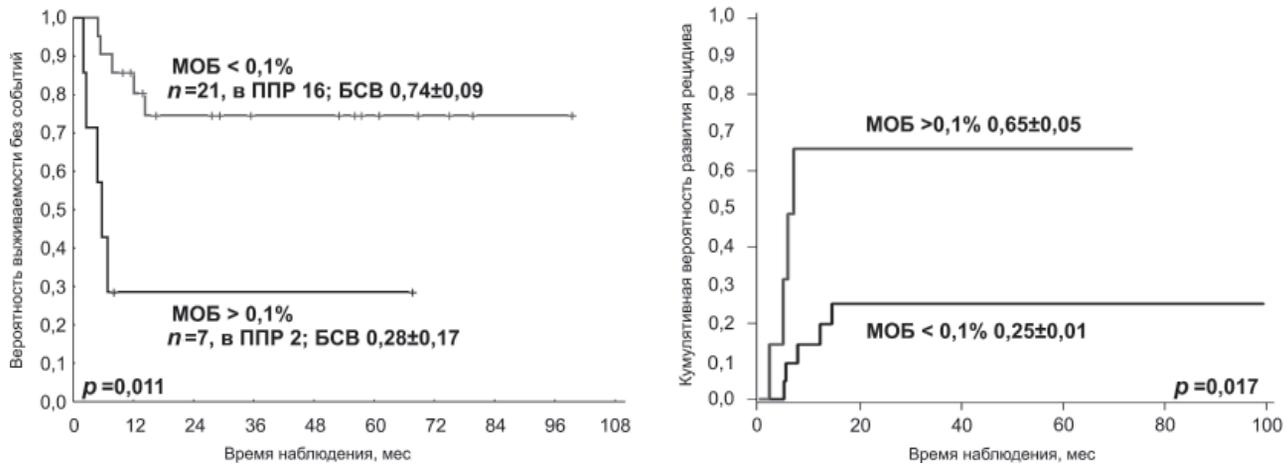


Рис. 8. Бессобытийная выживаемость (слева) и кумулятивная вероятность развития рецидива (справа) у больных с величиной МОБ в ТНЗ более и менее 0,1%.

ответа опухоли на терапию, дает возможность выделить группу больных, у которых предусмотренная протоколом терапия неэффективна.

Проведенное в рамках данной работы сопоставление результатов качественного выявления МОБ в ходе ОТ-ПЦР и количественного с помощью ПЦР-РВ показало высокий уровень сходимости (97,3%). Если 4 из 5 дискордантных результата могут быть связаны с большей чувствительностью гнездовой ОТ-ПЦР, то в одном случае, когда МОБ была выявлена только в ходе ПЦР-РВ, но не в гнездовой ОТ-ПЦР, однозначного объяснения расхождения результатов нет. Приемлемый уровень экспрессии гена *ABL*,

используемого для нормализации, исключал недостаточное количество материала, вносимого в ПЦР, как возможную причину расхождений. Технические ошибки также маловероятны, так как анализ был повторен несколько раз с неизменным результатом. Наличие ингибиторов ПЦР сказалось бы на результатах обеих ПЦР — ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ. Тем не менее во избежание неадекватной оценки результатов все 5 образцов, в которых были получены дискордантные данные, были исключены из анализа.

В то же время, говоря о высокой степени сходимости результатов двух методов, необходимо отметить, что подавляющее большинство образцов (162

Таблица 3

Анализ прогностических показателей, влияющих на возникновение рецидивов у больных ОЛЛ первого года жизни, получающих терапию по протоколу MLL-Baby с учетом МОБ в ТНЗ

Показатель	Количество больных	События	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			отношение опасности	95% ДИ	p	отношение опасности	95% ДИ	p
Возраст, мес:								
старше 6	13	1	1			1		
до 6	15	9	8,606	1,088—68,073	0,041	5,614	0,661-47,657	0,114
Имунофенотип:								
CD10 ^{+/+} cyt ⁺	6	4	1					
CD10 ⁺ cyt ⁺	18	6	0,435	0,118—1,599	0,435			
CD10 ⁻ cyt ⁺	4	0	—	—				
Наличие <i>MLL-AF4</i> :								
нет	14	3	1					
есть	14	7	2,347	0,606—9,093	0,217			
Инициальный лейкоцитоз, × 10 ⁹ /л:								
до 100	19	6	1					
100 и выше	9	4	1,961	0,549—7,006	0,300			
Инициальное поражение ЦНС:								
нет	20	6	1					
есть	6	3	2,260	0,552-9,248	0,257			
Ответ на дексаметазон на 8-й день**:								
хороший	26	9	1					
плохой	2	1	1,726	0,218-13,695	0,605			
Величина МОБ в ТНЗ:								
менее 0,1%	21	5	1			1		
более 0,1%	7	5	7,059	1,976-25,225	0,003	4,250	1,159-15,585	0,029

Сравнение прогностической значимости выявления МОБ в ТН4 и величины МОБ в ТН3 более 0,1% у 28 больных в модели пропорционального риска Кокса

Показатель	Количество больных	События	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			отношение опасности	95% ДИ	<i>p</i>	отношение опасности	95% ДИ	<i>p</i>
Выявление МОБ в ТН4:								
отсутствие	18	3	1			1		
наличие	10	7	7,547	1,907—29,840	0,004	4,570	0,753—27,741	0,099
Величина МОБ в ТН3:								
менее 0,1%	21	5	1			1		
более 0,1%	7	5	7,059	1,976—25,225	0,003	2,274	0,433—11,948	0,332

из 182) было исследовано в одной лаборатории, а постановки ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ проводили из одной и той же комплементарной ДНК (кДНК).

Возраст младше 6 мес, который при однофакторном анализе был ассоциирован с неблагоприятным исходом терапии, утратил свое значение в ходе многофакторного анализа как для ТН3, так и для ТН4. В ходе нашей работы было показано, что величина МОБ более 0,1% в ТН3 и любое наличие МОБ в ТН4 связаны с высокой вероятностью развития рецидива. Нам не удалось выявить, какой из этих показателей является наиболее важным. Отчасти это может быть связано с небольшим размером исследуемых групп, отчасти с возможной взаимной компенсацией этих параметров. Так, все 7 больных, имевших в ТН3 величину МОБ более 0,1%, были также МОБ-положительны в ТН4, а из 21 больного, имевшего в ТН3 величину МОБ менее 0,1%, 18 были МОБ-отрицательны в ТН4 (рис. 9).

При необходимости сделать выбор, какой из параметров предпочесть — количественную оценку МОБ в ТН3 или качественную в ТН4, следует учитывать, что в условиях многоцентрового исследования

ряд лабораторий в силу своего оснащения не могут проводить количественную оценку по методологии Europe Against Cancer [35], использованной в данной работе. Более того, использование данных количественного анализа, получаемых методом ПЦР-РВ, требует длительного этапа оценки межлабораторной воспроизводимости результатов. Еще одним недостатком использования данных количественной оценки величины МОБ в ТН3 является отсутствие прямой связи между экспрессией гена, т. е. уровнем ХТр, и количеством бластных клеток в костном мозге [14, 24, 25], что осложняет использование выявления ХТр для количественной оценки ответа на терапию. Однако это не распространяется на анализ качественных результатов. Ранее была выявлена высокая качественная сходимость результатов определения МОБ методом проточной цитометрии и выявления различных ХТр (в том числе перестроек гена *MLL*) гнездовой ОТ-ПЦР, составившая 93,9% [37], что демонстрирует адекватность использования данных качественного выявления ХТр для долгосрочного мониторинга МОБ. Высокая сопоставимость результатов была получена и при сравнении данных ОТ-ПЦР и определения перестроек *IgH/TCR* [36]. Исходя из изложенного выше, считаем более целесообразным рекомендовать проводить учет качественного выявления МОБ в ТН4 для прогнозирования исходов терапии по протоколу MLL-Baby.

Однако необходимо отметить, что выявление МОБ в ТН4 с целью оценки прогнозирования исходов терапии по протоколу MLL-Baby в нашем исследовании было применимо только в группе высокого риска, в то время как в группе промежуточного риска не удалось выявить статистически значимых различий исходов заболевания между группами МОБ-положительных и МОБ-отрицательных больных. С одной стороны, если применять определение ХТр для мониторинга МОБ только в группе высокого риска, существенно упрощается стандартизация данного исследования при проведении его в различных лабораториях, так как отпадает необходимость мониторировать все типы ХТр, кроме *MLL-AF4*. С другой стороны, при проведении многофакторного анализа наличие МОБ в ТН4 оказалось наиболее важным прогностическим фактором. Следовательно, можно предположить, что результаты определения МОБ не следует анализировать отдельно в группах промежуточного и высокого риска, а следует воспринимать

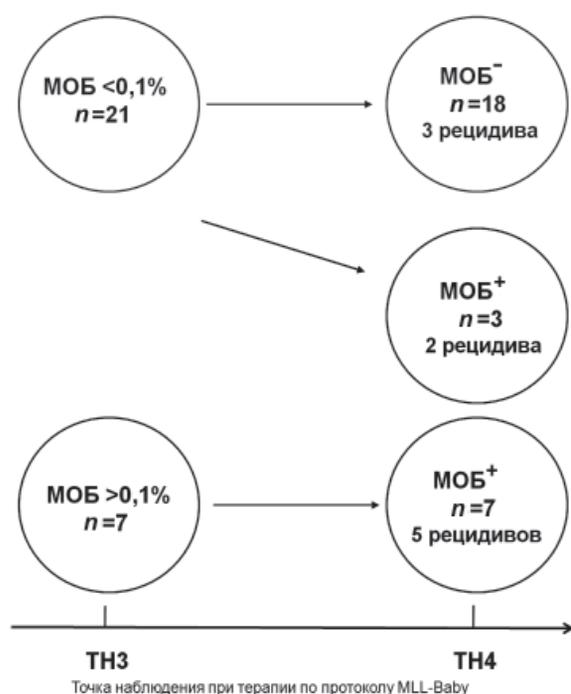


Рис. 9. Связь величины МОБ в ТН3 с выявлением МОБ в ТН4.

как отдельный прогностически значимый параметр. Однако подобные выводы можно будет сделать только после анализа большего числа больных.

В то же время в группу промежуточного риска попадают также больные, не включенные в данное исследование, — больные с неустановленным типом перестройки гена *MLL* и больные, у которых перестройка данного гена не выявлены. Поэтому, возможно, в группе промежуточного риска по протоколу MLL-Baby целесообразнее использовать другие методы мониторинга МОБ, такие как проточная цитометрия и/или выявление индивидуальных перестроек генов *IgH/TCR*. Однако однозначно утверждать это будет возможно только при существенном увеличении мощности исследования.

Таким образом, необходимо отметить, что величина МОБ более 0,1% в ТНЗ и сохранение МОБ в ТН4 являются важными прогностическими факторами, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом, и, следовательно, могут быть использованы для оптимизации лечения больных первого года жизни с ОЛЛ, получающих терапию по протоколу MLL-Baby, исходя из ответа опухоли на терапию. Следует заметить, что представленные в данной работе результаты нуждаются в дальнейшем изучении на большей выборке пациентов и при более длительном периоде наблюдения. С этой целью в настоящее время проводится проспективное исследование МОБ в рамках протокола MLL-Baby.

Авторы выражают искреннюю благодарность коллективам отделений, проводившим лечение детей первого года жизни по протоколу MLL-Baby, в частности сотрудникам Областной детской клинической больницы №1 (Екатеринбург), Российской детской клинической больницы (Москва), Морозовской детской клинической больницы (Москва), Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минск, Республика Беларусь), Областной детской клинической больницы (Нижний Новгород), Детской городской больницы № 1 (Санкт-Петербург), Областной детской клинической больницы (Ярославль), Московского областного онкологического диспансера (Балашиха), Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва (Москва).

ЛИТЕРАТУРА

1. Cimino G., Rapanotti M., Sprovieri T., Loredana E. ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica* 1998; 83: 350—7.
2. Biondi A., Cimino G., Pieters R., Pui C. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000; 96: 24—33.
3. Chen C.-S., Sorensen P., Domer P., Reaman G.H., Korsmeyer S.J., Heerema N.A., 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.
4. Greaves M. Infant leukemia: biology, aetiology and treatment. *Leukemia* 1996; 10(2): 372—7.
5. Itoyama K., Eguchi M., Hibi S., Kinukawa N., Ohkawa H., Kawasaki H., et al. Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). *Br. J. Haematol.* 2002; 118(4): 999—1010.
6. Pui C-H., Gaynon P., Boyett L., Chessells J.M., Baruchel A., Kamps W., et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002; 359(9321): 1909—15.
7. Hilden J.M., Dinndorf P.A., Meerbaum S.O., Sather H., Villaluna D., Heerema N.A., et al.; Children's Oncology Group. 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.
8. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P., Hann I., De Rossi G., Felice M., 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.
9. Tomizawa D., Koh K., Sato T., Kinukawa N., Morimoto A., Itoyama K., 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; 21(11): 2258—63.
10. 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 (abstr. 2828).
11. Fechina L., Shorikov E., Strenova O. et al. Does ATRA confirm to play a role in the better relapse-free survival of infants with acute lymphoblastic leukemia? *Blood* 2011; 118(21): 657—8 (abstr. 1515).
12. van Dongen J., Seriu T., Panzer-Gruemayer E.R., Biondi A., Pongers-Willemsse M.J., Corral L., et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998; 352(9142): 1731—8.
13. Campana D. Minimal residual disease studies in acute leukaemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004; 122 (suppl.): S47—57.
14. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2007; 21(4) 622—6.
15. van der Velden V., Corral L., Valsecchi M., Jansen M.W., De Lorenzo P., Cazzaniga G., et al.; Interfant-99 Study Group. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009; 23(6): 1073—9.
16. van Dongen J., Macintyre E.A., Gabert J.A., Delabesse E., Rossi V., Saglio G., 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—28.
17. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D., Mann G., Pötschger U., Mühlegger N., et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99(6): 1952—8.
18. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G., Hancock M.L., Razzouk B.I., Ribeiro R.C., et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2002; 100(1): 52—8.
19. Gabert J., Beillard E., van der Velden V., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., 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.
20. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G., Panzer-Grümayer R., van der Velden V., Fischer S., 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.
21. Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P., Bowman W.P., Carroll A.J., Carroll W.L., 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.
22. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G., Dworzak M.N., Ratei R., Silvestri D., et al. Risk of relapse of childhood acute lympho-

- blastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(31): 5168—74.
23. Савва Н.Н., Красько О.В., Белевцев М.В., Савицкий В.П., Мигаль Н.В., Алейникова О.В. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ). *Онкогематология* 2009; 2: 17—21.
 24. Brüeggemann M., Schrauder A., Raff T., Pfeifer H., Dworzak M., Ottmann O.G., et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the 2nd International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18—20 September 2008. *Leukemia* 2010; 24(3): 521—35.
 25. van der Velden V., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen J.J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17(6): 1013—34.
 26. van der Velden V., Cazzaniga G., Schrauder A., Hancock J., Badger P., Panzer-Grumayer E.R., et al.; Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; 21(7): 604—11.
 27. van der Velden V., Panzer-Grumayer E.R., Cazzaniga G., Flohr T., Sutton R., Schrauder A., et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007; 21(7): 706—13.
 28. Jansen M., Corral L., van der Velden V., Panzer-Grumayer R., Schrappe M., Schrauder A., et al. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia* 2007; 21(7): 633—41.
 29. Peham M., Panzer S., Fasching K., Haas O.A., Fischer S., Marschalek R., et al. Low frequency of clonotypic Ig and T-cell receptor gene rearrangements in t(4;11) infant acute lymphoblastic leukaemia and its implication for the detection of minimal residual disease. *Br. J. Haematol.* 2002; 117(2): 315—21.
 30. De Zen L., Bicciato S., te Kronnie G., Basso G. Computational analysis of flow-cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification. *Leukemia* 2003; 17(8): 1557—65.
 31. Schwartz S., Rieder H., Schläger B., Burmeister T., Fischer L., Thiel E. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangement and a CD10(-)/CD24(-)/CD65(+)/CD15(+) B-cell phenotype. *Leukemia* 2003; 17(8): 1589—95.
 32. Attarbaschi A., Mann G., König M., Steiner M., Strehl S., Schreiberhuber A., et al. Mixed lineage leukemia-rearranged childhood pro-B and CD10-negative pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(10): 2988—94.
 33. 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. *Дет. онкол.* 2008; 2: 32—35.
 34. Попов А. М., Вержбицкая Т. Ю., Цаур Г. А., Шориков Е. В., Савельев Л. И., Фечина Л. Г. Возможности применения NG2 для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом, ассоциированным с реарранжировками гена MLL. *Гематол. и трансфузиол.* 2009; 6: 19—22.
 35. Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V.H., Bi W., Dee R., van der Schoot E., 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.
 36. Zaliova M., Fronkova E., Krejčíková K., Muzikova K., Mejstrikova E., Stary J., 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.
 37. Попов А. М., Цаур Г. А., Вержбицкая Т. Ю., Ригер Т. О., Яковлева Ю. А., Иванова А. С. 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. *Гематол. и трансфузиол.* 2010; 2: 3—9.
 38. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976; 33(4): 451—458.
 39. Béné M., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., van't Veer M.B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995(10); 9: 1783—86.
 40. Béné M., Nebe T., Bettelheim P., Buldini B., Bumbea H., Kern W., et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25(4): 567—74.
 41. Borkhardt A., Repp R., Haupt E., Brettreich S., Buchen U., Gossen R., Lampert F. Molecular analysis of MLL/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1994; 8(4): 549—53.
 42. Pallisgaard N., Hokland P., Riishoj D., Pedersen B., Jørgensen P. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998; 92(2): 574—88.
 43. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М., Каленик О.В., Солодовников А.Г., Ригер Т.О. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематология* 2010; 2: 46—54.
 44. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М., Семенихина Е.Р., Ригер Т.О., Иванова А.С. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестн. Уральск. мед. акад. науки* 2011; 4: 107—11.
 45. Jansen M., van der Velden V.H., van Dongen J. Efficient and easy detection of MLL-AF4, MLL-AF9 and MLL-ENL fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and LightCycler. *Leukemia* 2005; 19(11): 2016—8.
 46. Zweig M., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 1993; 39(4): 561—77.
 47. Obuchowski N. ROC analysis. *Am. J. Roentgenol.* 2005; 184: 364—72.
 48. Kaplan E., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Statist. Ass.* 1958; 53: 457—81.
 49. Cox D. R. Regression models and life tables. *J. Roy. Statist. Soc. (Ser. B: Methodological)* 1972; 34: 187—220.
 50. van der Velden V., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen J.J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17(6): 1013—34.
 51. Preudhomme C., Henic N., Cazin B., Lai J.L., Bertheas M.F., Vanrumbeke M., et al. Good correlation between RT-PCR analysis and relapse in Philadelphia (Ph1)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* 1997; 11(2): 294—8.
 52. Cimino G., Elia L., Rapanotti M., Sprovieri T., Mancini M., Cuneo A., et al. A prospective study of residual-disease monitoring of the ALL1/AF4 transcript in patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95(1): 96—101.
 53. Cayuela J., Ballerini P., Romeo M. et al. Evaluation of minimal residual disease (MRD) by quantification of TEL-AML1 transcripts is a powerful prognostic tool in children with t(12;21) positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2004; 104: abstr. 322.
 54. Pane F., Cimino G., Izzo D., Camera A., Vitale A., Quintarelli C., et al.; GIMEMA group. Significant reduction of the hybrid BCR/ABL transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005; 19(4): 628—35.
 55. Madzo J., Zuna J., Muziková K., Kalinová M., Krejčí O., Hrusák O., 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.