

Савельев Леонид Иосифович

Заведующий лабораторией клеточной терапии онкогематологических заболеваний ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

Доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФУВ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»,

к.м.н., доцент

г. Екатеринбург

Г.А. Цаур^{1,2,3}, А.М. Попов⁴, О.Р. Аракаев^{1,2},
Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина¹

МЕТОДОЛОГИЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

¹ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1» Екатеринбург;

² ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург;

³ ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург;

⁴ ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Москва, Российская Федерация

Введение

Острые лейкозы (ОЛ), ассоциированные с перестройками гена *MLL* (*myeloid-lymphoid leukemia, mixed-lineage leukemia*), расположенного в хромосомном районе 11q23 [1–3], наиболее часто встречаются у детей первого года жизни, поэтому в рамках данной работы мы остановимся только на этой возрастной группе.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей старше 1 года: неуклонно повышается бесобытийная (БСВ) и общая выживаемость (ОВ) пациентов, снижается частота развития рецидивов. В то же время результаты терапии ОЛЛ у детей первого года жизни остаются неудовлетворительными: БСВ редко превышает 45%, а основной причиной неудачи терапии являются рецидивы [4–14]. На сегодняшний день наиболее эффективным способом прогнозировать развитие рецидивов считается определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Для этой цели применяются такие высокочувствительные методы клинической лабораторной диагностики как многоцветная проточная цитометрия и различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако биологические особенности ОЛ у детей первого года жизни требуют создания специальных методов

выявления МОБ с последующим сравнительным анализом полученных результатов между собой и оценкой вероятности развития рецидивов.

При использовании метода проточной цитометрии для мониторинга МОБ у детей первого года жизни с ОЛЛ основными сложностями использования этого метода являются особенности иммунофенотипа опухолевых клеток при наличии перестроек гена *MLL*, а также нестабильность экспрессии антигенов во время терапии [15, 16]. Кроме того, чаще всего описываются только алгоритмы оценки МОБ у детей с CD10-позитивными В-линейными ОЛЛ, в то время как у детей первого года жизни преобладают CD10-негативные варианты. Несмотря на то, что при CD10-позитивном и CD10-негативном вариантах ОЛЛ из В-линейных предшественников применяется одинаковая панель антигенов, отдельные маркеры используются в различных целях (табл. 1). Исходя из этого нами было сформулировано два различных алгоритма анализа данных (рис. 1). Также для успешного определения МОБ нужно также учитывать, что фенотип опухолевых клеток может существенно меняться во время терапии. [17, 18].

Таблица 1

Задачи применения различных антигенов для определения МОБ при CD10-позитивном и CD10-негативном ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ)

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

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

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

Актуальность создания системы мониторинга МОБ у детей первого года жизни обусловлена еще и тем, что в нашей стране Л.Г. Фечиной разработан оригинальный отечественный протокол *MLL-Baby* для терапии ОЛЛ у детей

первого года жизни [30], который предусматривает многократное определение МОБ (Рис. 2). Это, в свою очередь, обуславливает необходимость установления роли наличия и величины МОБ в различные точки наблюдения для прогнозирования исходов терапии.

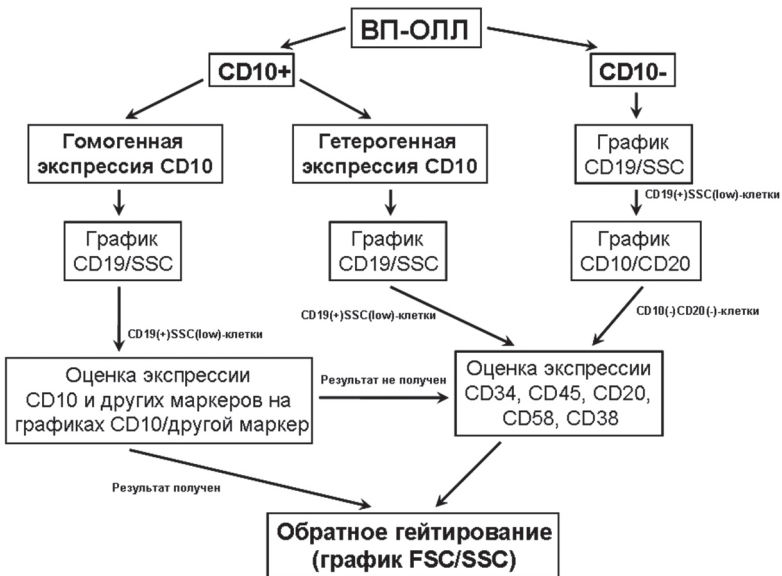
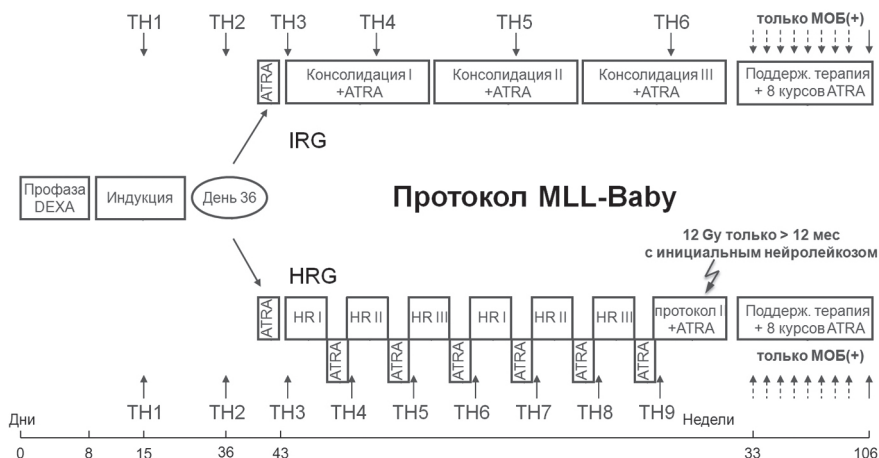


Рисунок 1. Алгоритм анализа данных проточной цитометрии для мониторинга МОБ при CD10-положительном и CD10-негативном вариантах ОЛЛ из V-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ).

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

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

ся наименее изученными. Традиционно считается, что наиболее неблагоприятной при ОЛЛ является транслокация $t(4;11)/MLL-AF4$, в то время как прогноз для пациентов с $t(11;19)/MLL-MLLT1$ и $t(9;11)/MLL-MLLT3$ несколько лучше [40]. С другой стороны, в рамках проспективного исследования Interfant-99 пациенты с любой из вышеперечисленных транслокаций имели сходную величину бессобытийной выживаемости [5]. Наиболее неблагоприятными транслокациями при ОМЛ являются $t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10$ и $t(6;11)(q27;q23)/MLL-MLLT4$ [39].



Критерии стратификации:

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

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

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

Материалы и методы

Для сравнительного анализа выявления МОБ методами проточной цитометрии и обратно-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) в анализ был включен 401 образец костного мозга, полученный от 65 пациентов первого года жизни с ОЛЛ. МОБ методом проточной цитометрии определяли на приборах «FACS Canto», «FACS Canto II» и «FACS Aria» (Becton & Dickinson (BD), США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 4.0–6.1 (BD, США). Результат определения МОБ рассчитывали в виде процентного содержания опухолевых клеток среди всех ядродержащих клеток костного мозга. Образцы КМ считали МОБ-положительными при величине МОБ > 0,01%. При этом для большинства образцов удалось достичь аналитической чувствительности в 0,001%. Методические особенности технологии проточной цитометрии для мониторинга МОБ были описаны нами ранее [17, 43].

Таблица 2

Характеристика различных методов, применяемых для определения МОБ у пациентов с ОЛЛ (приводится по M. Brügemann et al [28] и T. Szczepanski [29] с дополнениями)

Метод / Показатель	Определение перестроек генов Ig и TCR методом ПЦР-РВ	Определение химерных транскриптов методом ПЦР-РВ	Многоцветная проточная цитометрия
Чувствительность	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-4} - 10^{-6}	10^{-4} - 10^{-5} Зависит от количества вносимых клеток
Количественный диапазон	10^{-2} - 10^{-4}	10^{-4} - 10^{-5}	Варирует в различных исследованиях
Преимущества метода	<ul style="list-style-type: none"> • Применимость для подавляющего большинства пациентов с ОЛЛ • Высокая чувствительность • Высокая степень стандартизации • Доказанная надежность при использовании в качестве стратификационного критерия • Исходный материал (ДНК) — стабилен при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> • Высокая чувствительность • Стабильность мишени во время курса терапии • Быстрота • Относительная простота выполнения • Для наиболее частых химерных транскриптов имеется стандартизованная методика 	<ul style="list-style-type: none"> • Применимость для подавляющего большинства пациентов с ОЛЛ • Быстрота • Возможность количественной оценки результата • Источник дополнительной информации о нормальных и опухолевых клетках • Стандартизация в рамках проводимых протоколов терапии
Недостатки метода	<ul style="list-style-type: none"> • Большая длительность • Возможная нестабильность выбранных маркеров (феномен клональной эволюции) • Для проведения теста требуется большое количество знаний и опыта 	<ul style="list-style-type: none"> • Применимо только у части пациентов (40-45%) • Полная стандартизация проведена только для BCR-ABL; для остальных химерных генов разработаны только условия проведения ОТ-ПЦР • Существует риск ложнопозитивных результатов вследствие контаминации • Исходный материал (РНК) — мало стабилен при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> • Изменение иммунофенотипа во время терапии • В-линейная регенерация может затруднять проведение анализа • Низкая клеточность во время и после индукции может затруднять проведение анализа • Для проведения теста требуется большое количество знаний и опыта
Применимость	90-95%	<ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL (5-8% детей и 30-35% взрослых с ВП-ОЛЛ) • TCF3-PBX1 (1-2% детей и взрослых) • Перестройки MLL (70-80% детей < 1 года; 3-5% детей > 1 года; 5-7% взрослых) • ETV6-RUNX1 (20-25% детей) 	>95% Зависит от количества одновременно определяемых маркеров

Выявление перестроек 11q23/MLL проводили методами стандартной цитогенетики, FISH, обратнo-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) по ранее описанным протоколам [35, 36, 44]. Для исключения образцов низкого качества из анализа

перед проведением ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили оценку качества РНК с использованием микроструйных чипов RNA 6000 Nano LabChip («Caliper Technologies», США) на Биоанализаторе Agilent 2100 («Agilent», Германия) согласно инструкции производителя. В дальнейшую работу брали образцы, в которых показатель целостности РНК превышал 4,2 [45].

		Все образцы (n=401)		Индукция ремиссии (n=131)		Консолидация / интенсификация (n=209)		Терапия рецидива (n=61)	
ОТ-ПЦР	обнаружено	223	50	86	27	100	19	37	4
	не обнаружено	2	126	1	17	1	89	0	20
Проточная цитометрия									
		Сопоставимость 87,0%		Сопоставимость 78,6%		Сопоставимость 90,4%		Сопоставимость 93,4%	

		День 15 (n=45)		День 36 (n=52)		День 43 (n=34)	
ОТ-ПЦР	обнаружено	36	5	32	14	18	8
	не обнаружено	0	4	1	5	0	8
Проточная цитометрия							
		Сопоставимость 88,9%		Сопоставимость 71,1%		Сопоставимость 76,5%	

Рисунок 3. Сопоставимость выявления МОБ на разных этапах терапии.

		MLL-AF4 (n=230)		MLL-MLLT1 (n=76)		MLL-MLLT3 (n=73)		MLL-EPS15 (n=22)	
ОТ-ПЦР	обнаружено	154	12	37	10	24	25	8	3
	не обнаружено	2	62	0	29	0	24	0	11
Проточная цитометрия									
		Сопоставимость 93,9%		Сопоставимость 86,8%		Сопоставимость 65,7%		Сопоставимость 86,4%	

		Наличие ВП* (n=271)		Отсутствие ВП* (n=130)	
ОТ-ПЦР	обнаружено	137	32	86	18
	не обнаружено	2	100	0	26
Проточная цитометрия					
		Сопоставимость 87,4%		Сопоставимость 86,1%	

Рисунок 4. Сопоставимость выявления МОБ у пациентов с различными типами химерных транскриптов, а также в зависимости от наличия нормальных В-линейных предшественников (ВП*).

Таблица 3

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

Показатель	Пациенты	События	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
			Отношение опасности	95% ДИ	Отношение опасности	95% ДИ
Возраст						
Старше 6 мес.	22	8	Референтное	—	Референтное	—
Младше 6 мес.	31	19	2,179	0,949-5,005	1,393	0,515-3,765
Иммунофенотип						
VI-ОЛП	36	16	0,746	0,346-1,610	1,611	0,405-6,416
VII-ОЛП	8	7	2,136	0,899-5,077	1,225	0,274-5,469
VIII-ОЛП	9	4	0,703	0,242-2,041	1	—
Наличие MLL-AF4						
Нет	28	4	Референтное	—	Референтное	—
Есть	25	8	0,853	0,396-1,840	0,752	0,311-1,821
Инициальный лейкоцитоз, × 10⁹/л						
<100	29	11	Референтное	—	Референтное	—
≥100	24	16	2,443	1,129-5,285	0,996	0,388-2,934
Инициальное поражение ЦНС						
Нет	33	12	Референтное	—	Референтное	—
Есть	19	15	2,995	1,382-6,493	2,187	0,936-5,114
Количество бластов в 1 мкл крови на 8-й день терапии дексаметазоном						
< 1000	46	21	Референтное	—	Референтное	—
≥ 1000	7	6	2,131	0,856-5,304	0,996	0,364-2,722
Выявление МОБ в ТН4						
Отсутствие	31	7	Референтное	—	Референтное	—
Наличие	22	20	7,181	3,002-17,177	7,326	2,378-22,565
						0,001

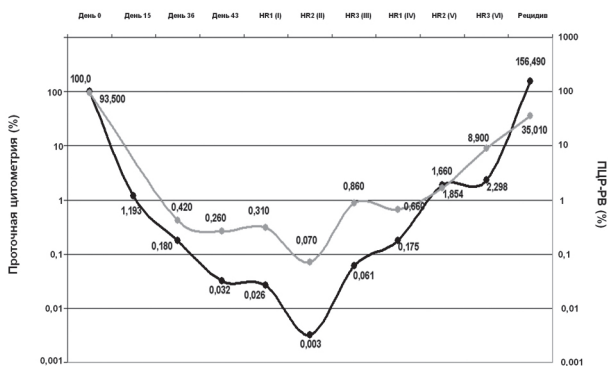


Рисунок 5. Динамика выявления МОБ методами проточной цитометрии (верхняя кривая) и ПЦР-РВ (нижняя кривая) у пациентки с наличием химерного транскрипта MLL-AF4.

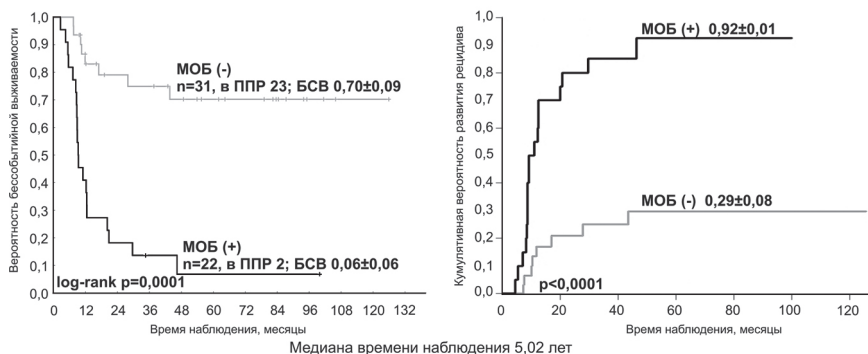


Рисунок 6. БСВ и кумулятивная вероятность развития рецидива МОБ-положительных и МОБ-негативных пациентов в зависимости от выявления МОБ в точке наблюдения 4 в костном мозге.

В исследование по оценке прогностической значимости выявления МОБ методом ПЦР-РВ было включено 53 пациента с ОЛЛ и установленным типом перестроек гена MLL, получавших лечение по протоколу MLL-Baby. В исследуемой группе было 20 мальчиков (37,7%) и 33 девочки (62,3%), медиана возраста составила 5,3 мес. (диапазон 0,03–11,8). У 25 пациентов (47,2%) был выявлен химерный транскрипт MLL-AF4, у 10 пациентов (18,9%) — MLL-MLLT3, 9 пациентов имели химерный транскрипт MLL-MLLT1 (17,0%), 5 пациентов (9,4%) — MLL-MLLT10, у 4 пациентов (7,5%) был обнаружен химерный транскрипт MLL-EPS15. Определение МОБ проводилось в 142 парных образцах костного мозга и периферической крови. Количественную ПЦР в режиме реального времени с чувствительностью не ниже $1 \cdot 10^{-4}$ проводили согласно рекомендациям международного протокола «Европа против рака» [22, 23].

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение «SPSS 18.0», «STATISTICA 8.0», «R-statistics». При сравнении двух групп

пациентов по количественным признакам использовали критерий Манна-Уитни. Результаты терапии оценивались по кривым бессобытийной выживаемости (БСВ), построенным по методу Каплана-Майера, а также по кумулятивной вероятности развития рецидива. Для сравнения кривых использовались непараметрические log-rank критерий и критерий Грея, соответственно. Стандартную ошибку (СО) рассчитывали по формуле Гринвуда. Расчет отношения опасности (ОО) с 95% доверительным интервалом (ДИ) был проведен по методу Кокса в однофакторной и многофакторной моделях. Параметры сравнивались с использованием теста Вальда. Все различия считались достоверными при $p < 0,05$. Информированное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур было получено во всех случаях.

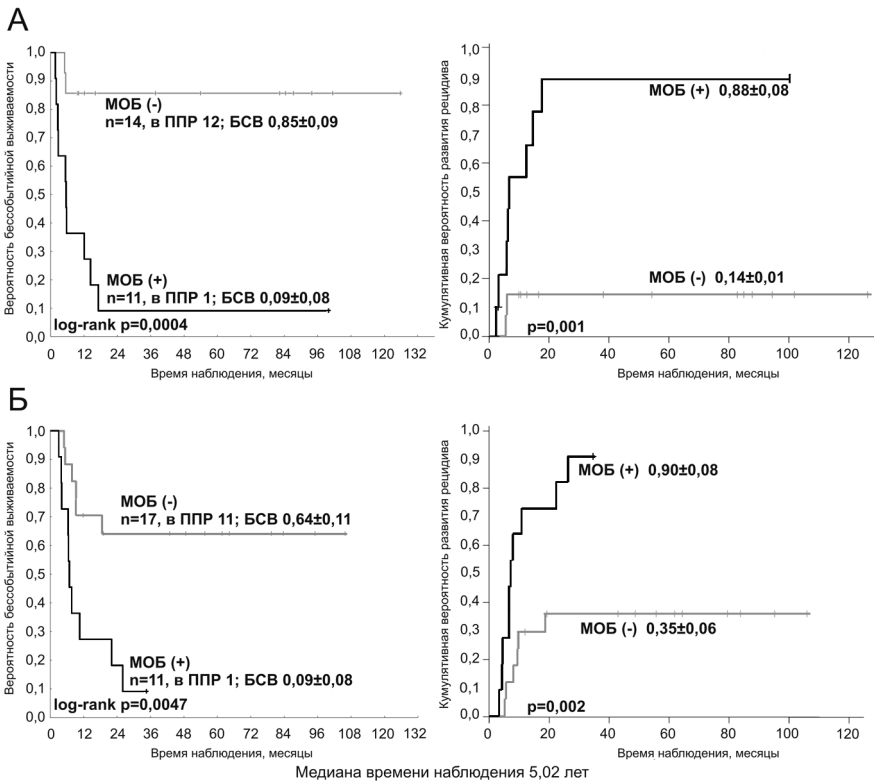


Рисунок 7. БСВ и кумулятивная вероятность развития рецидива у 25 пациентов группы высокого риска (с наличием MLL-AF4) (А) и 28 пациентов группы промежуточного риска (все остальные перестройки гена MLL) (Б) в зависимости от обнаружения МОБ в ТН4 в КМ.

Результаты

Качественная сопоставимость результатов проточной цитометрии и ОТ-ПЦР в 401 образце КМ составила 87,0%. При этом в 50 образцах МОБ была обнаружена только в ходе ПЦР, и лишь в 2 — только проточной цитометрией.

Сопоставимость результатов была достоверно ниже в образцах, взятых на этапе индукционной терапии (78,6%; $n=131$) по сравнению с образцами этапов консолидации/интенсификации ($n=209$; 90,4%) и терапии рецидива ($n=61$; 93,4%) ($p=0,002$). В то же время не выявлено значимых различий между тремя точками наблюдения (день 15, день 36, день 43) во время индукционной терапии ($p=0,098$) (Рис. 3).

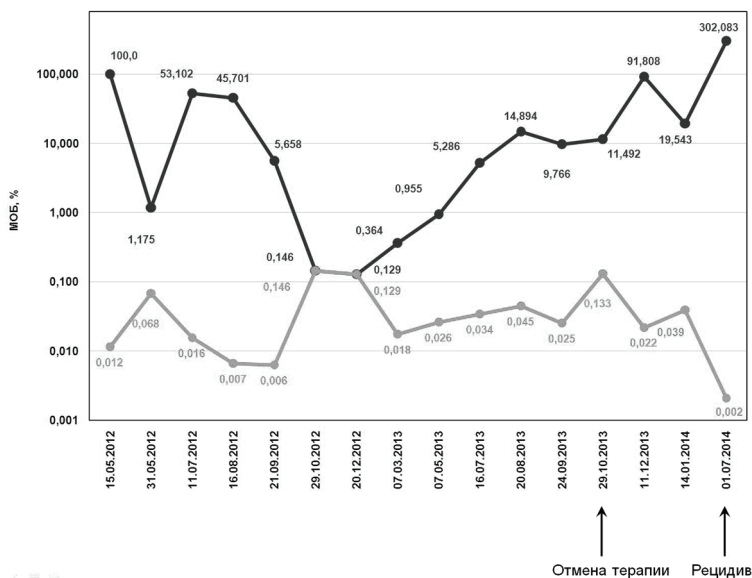


Рисунок 8. Мониторинг МРОБ у пациента с ОМЛ и наличием химерного транскрипта *MLL-MLLT11* методом ПЦР в режиме реального времени. Верхняя кривая — величина МРОБ, нижняя — чувствительность, рассчитанная согласно рекомендациям консорциума «Европа против рака» [22].

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

Несмотря на то, что прямое количественное сопоставление результатов определения МРОБ двумя данными методами невозможно, кинетика величины МРОБ во время терапии сходна для проточной цитометрии и ПЦР-РВ (Рис. 5). Вследствие этого, у пациентов, у которых определяется химерный транскрипт с вовлечением *MLL*, возможно одновременное применение данных методов. Во время индукционной терапии и в начале консолидации/интенсификации, когда необходимо количественное определение МРОБ, предпочтительнее использовать данные проточной цитометрии. В то же время, в последующих точках наблюдения достаточно только качественного определения МРОБ, поз-

тому целесообразнее использовать результаты определения химерных транскриптов методами ОТ-ПЦР/ПЦР-РВ вследствие более высокой чувствительности метода.

Оценка прогностической роли выявления МОБ в ходе лечения по протоколу MLL-Baby показала, что наличие МОБ в точке наблюдения 4 в костном мозге ведет к достоверному снижению БСВ и повышению кумулятивной вероятности развития рецидива (рис. 6). При разделении пациентов по группам риска протокола MLL-Baby сохранялись достоверные различия в величинах БСВ и кумулятивной вероятности развития рецидива между МОБ-положительными и МОБ-негативными пациентами в точке наблюдения 4 в костном мозге (Рис. 7). В то же время использование периферической крови для выявления МОБ у данной группы пациентов себя не оправдало. Технически это выполнимо, однако значимой прогностической роли выявления МОБ в периферической крови не имело. При проведении многофакторного анализа единственным значимым фактором являлось сохранение МОБ в точке наблюдения 4 в костном мозге (ОО=7,326 (95% ДИ 2,378–22,565)) (табл. 3).

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

Обсуждение

МОБ — как уже отмечалось ранее — это сохранение в организме пациента опухолевых клеток в количествах, не распознаваемых стандартными цитологическими методами. Но даже в том случае, если в образцах КМ, взятых во время терапии, количество опухолевых клеток ниже уровня чувствительности цитологического метода (<1%), они вносят существенный вклад в неблагоприятный исход заболевания [46–51]. МОБ — это один из современных вариантов оценки ответа опухоли на химиотерапию, и оценка МОБ находит свое применение не только при лечении ОЛ, но и ряда солидных опухолей, лимфом, множественной миеломы.

Большое количество усилий было приложено для стандартизации всех этапов количественного анализа при определении специфических для каждого больного перестроек генов иммуноглобулинов (Ig) и Т-клеточных рецепторов (TCR) методом ПЦР. Это дало возможность определить требования к количеству вносимого в реакцию материала, сформулировать основные понятия и принципы, разработать алгоритмы данного вида лабораторной диагностики в условиях проведения многоцентровых исследований [52, 53]. Данный метод широко применяется при мониторинге МОБ у детей и взрослых с ОЛЛ в европейских странах [28, 46, 49, 54]. На основании результатов, получаемых при мониторинге МОБ, уже сегодня проводится стратификация пациентов с ОЛЛ, получающих терапию по многим современным протоколам [50, 55–57]. Он также хорошо себя зарекомендовал не только при *de novo* ОЛЛ, но и при рецидивах ОЛЛ [58, 59].

Из недостатков определения МОБ методом выявления индивидуальных перестроек Ig/TCR следует отметить то, что проведение такого исследования технически сложно, растянуто по времени и относительно дорого [28, 29, 48], что затрудняет его использование для решения клинических задач в условиях нашей страны.

Еще одним подходом для мониторинга МОБ является использование сиквенса зоны разрыва в *MLL* и гене-партнере [60] для создания пациент-специфичной тест-системы с оценкой методом ПЦР-РВ [57, 61, 62]. К преимуществам данного метода следует отнести возможность абсолютного подсчета МОБ (по сравнению с использованием РНК/кДНК), а также прямую взаимосвязь между количеством химерного гена с участием *MLL* и опухолевых клеток лейкозного клона (по сравнению с перестройками *Ig/TCR*). В целом последовательность выполнения и интерпретации результатов очень близка к тому, что было предложено для перестроек *Ig/TCR* Европейской рабочей группы по изучению МОБ при ОЛЛ (*ESG-MRD-ALL*, в настоящее время — *EuroMRD*) для перестроек *Ig/TCR* [52]. Данный подход технически выполним и позволил с успехом проводить мониторинг МОБ как у детей первого года жизни [57], так и взрослых [61] с наличием перестроек *MLL*. Проведенный сравнительный анализ определения МОБ по перестройкам *Ig/TCR* и индивидуальной структуре зоны разрыва в ДНК при образовании химерного гена с участием *MLL* показал хорошую степень сопоставимости двух методов [57].

Третьим из существующих методов мониторинга МОБ является применение ОТ-ПЦР и/или ПЦР-РВ для выявления химерных транскриптов. Химерные транскрипты, выявляемые методом ОТ-ПЦР, или величина МОБ, определяемая при проведении ПЦР-РВ, используется в качестве фактора ответа на терапию относительно редко. Одной из причин этого является то, что химерные гены встречаются в среднем только у 40% пациентов с ОЛЛ. Однако, в случаях выявления химерных транскриптов, они являются высокочувствительными (10-4-10-6) и стабильными маркерами [28, 29]. Поэтому, данный вариант мониторинга МОБ нашел свое применение в группах, выделенных именно по наличию конкретного химерного гена. Так в работе *L. Elia et al.* при выявлении химерных транскриптов *MLL-AF4* методами ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ у 17 взрослых пациентов с ОЛЛ было показано, что у пациентов достигших МОБ-негативности кумулятивная вероятность развития рецидива была ниже, чем у тех, кто оставался *MLL-AF4*-позитивным (44% и 88% соответственно) [62]. Позднее этой же группой исследователей был проведен анализ 12 случаев ОЛЛ, включая 1 пациента младше 1 года и 3-х — старше 1 года, с наличием химерного транскрипта *MLL-MLLT1*. Интересно, что у 5 пациентов в этой группе, включая пациента первого года жизни, получавшего терапию по протоколу *Interfant-99*, было выявлено длительное персистирование химерного транскрипта *MLL-MLLT1*, а также повторное его выявление после достижения МОБ-негативности без последующего развития клинико-гематологического рецидива [63]. Все это свидетельствует в пользу того, что определение МОБ путем выявления химерных транскриптов с участием *MLL* должно быть использовано в целевых группах, каковой являются дети первого года жизни, как для получения новых данных о биологии опухоли, так и для оценки клинической значимости этого метода, что и было продемонстрировано нами.

Четвертым методом определения МОБ является многоцветная проточная цитометрия. При определении МОБ методом проточной цитометрии позитивными считаются образцы, в которых на точечных графиках определяется группа из 10 и более клеток, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, соответствующие лимфоцитам/лим-

фобластам. Максимальная чувствительность метода (анализ 1 000 000 клеток) составляет 0,001%, то есть, возможно выявить одну опухолевую клетку среди 100 000 нормальных. В то же время далеко не во всех случаях клеток в образце достаточно для достижения такой чувствительности. Поэтому минимально достаточной рутинной чувствительностью обычно принято считать 0,01%, для достижения которой необходим анализ 100 000 клеток. Если по тем или иным причинам не удастся собрать достаточное количество клеток, а опухолевые клетки не выявляются, исследование считается не выполненным.

Результаты определения МОБ методом проточной цитометрии при ОЛЛ у детей первого года жизни на данный момент представлены лишь в одной публикации группы Interfant, в которой исследовался 51 пациент, получавший терапию по протоколам Interfant-99 и Interfant-06 в рамках итальянской группы АЕОР. МОБ определяли на 15-й и 33-й дни индукционной терапии. Авторами работы был сделан вывод о том, что определение МОБ методом проточной цитометрии на 15-й день терапии может быть с успехом использовано в комбинации с другими прогностическими факторами для стратификации пациентов [64].

ЛИТЕРАТУРА

1. Cimino G., Moir D-T, Canaani O. et al. Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations // *Cancer Res.*—1991.—Vol.51, N 24.—P.6712–6714.
2. Ziemmin-van der Poel S., McCabe N., Gill H.J., et al. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias // *Proc Natl Acad Sci USA.*—1991.—Vol.88, N 23.—P.10735–10739.
3. Tkachuk D., Kohler S., Cleary M. Involvement of a homolog of *Drosophila tritorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias // *Cell.*—1992.—Vol.71, N 4.—P.691-700.
4. Шориков Е. В. Результаты программного лечения острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.09, 14.00.29.—М, 2005.—34с. [Shorikov E.V. Treatment results of acute lymphoblastic leukemia in infants PhD thesis, Moscow, 2005 34 P.
5. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial // *Lancet.*—2007.—Vol. 370.—P.240-250.
6. Hilden J., Dinndorf P., Meerbaum S., et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group // *Blood.*—2006.—Vol.108, N 2.—P.441-451.
7. Ferster A., Bertrand Y., Benoit Y. et al. Improved survival for acute lymphoblastic leukaemia in infancy: the experience of EORTC-Childhood Leukaemia Cooperative Group // *Br J Haematol.*—1994.—Vol.86, N 2.—P.284–290.
8. Silverman L., McLean T., Gelber R. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium // *Cancer.*—1997.—Vol.80, N 12.—P.2285-2295.
9. Lauer S., Camitta B., Leventhal B. et al. Intensive alternating drug pairs after remission induction for treatment of infants with acute lymphoblastic leukemia:

A Pediatric Oncology Group pilot study // *J Pediatr Hematol Oncol.*—1998.—Vol.20, N 3.—P.229-233.

10. Tomizawa D., Koh K., Sato T. et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group // *Leukemia.*—2007.—Vol.22, N 11.—P.2258-2263

11. Dördelmann M., Reiter A., Borkhardt A. et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* – 1999. – Vol.94, N 4. – P. 1209-1217

12. Biondi A., Rizzari C., Valsecchi M.-G. et al. Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies // *Haematologica.*—2006.—Vol.91, N 4.—P.534-537

13. Frankel L., Ochs J., Shuster J.J. et al. Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493) // *J Pediatr Hematol Oncol.*—1997.—Vol.19, N 1.—P.35-42

14. Chessells J., Harrison C., Watson S. et al. Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987-1999 // *Br J Haematol.*—2002.—Vol.117, N2.—P.306-314

15. de Zen L., Bicciato S., te Kronnie G. et al. Computational analysis of flow cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification // *Leukemia.*—2003.—Vol.17, N 8.—P.1557-1565

16. Borkhardt A., Wuchter C., Viehmann S. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia - combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases // *Leukemia.*—2002.—Vol.16, N 9.—P.1685-1690.

17. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников // *Вопросы диагностики в педиатрии.*- 2012.-№5.-С.31-36 [Popov A.M., Verzhbitskaya T. Yu., Tsaur G. A. et al. Methodology of flow cytometry application for minimal residual disease monitoring in childhood CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostics in Pediatrics* 2012;(5):31–5. (In Russ.)].

18. Попов А. М., Вержбицкая Т. Ю., Цаур Г. А. и др. Изменения иммунофенотипа опухолевых blasts при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-MB-2008. *Иммунология* 2010;(2):60–4. [Popov A. M., Verzhbitskaya T. Yu., Tsaur G. A. et al. Changes in blasts immunophenotype in CD10-positive children acute lymphoblastic leukemia by 15th day of induction therapy according ALL-MB-2008 protocol. *Immunologiya = Immunology* 2010;(2):60–4. (In Russ.)].

19. Pui C.-H., Carroll W., Meshinchi S. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update // *J Clin Oncol.*—2011.—Vol.29, N 5.—P.551-565

20. Biondi A., Cimino G., Pieters R. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia // *Blood.*—2000. —Vol.96, N 1.—P.24-33

21. Chen C.-S., Sorensen P., Domer P, et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are

associated with specific biologic variables and poor outcome // *Blood*.—1993.—Vol. 81, N 9.—P.2386-2393.

22. Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe Against Cancer Program // *Leukemia*.—2003.—Vol.17. N 12.—P. 2474-2486.

23. Gabert J., Beillard E., van der Velden V. et al Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program // *Leukemia*.—2003.—Vol. 17, N 12.—P.2318–2357.

24. van Dongen J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease // *Leukemia*.—1999.—Vol.13, N 12.—P.1901-1918

25. Zaliova M., Fronkova E., Krejcikova K. et al. Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring // *Leukemia*.—2009.—Vol.23, N 5.—P.944-951.

26. Taube T., Eckert C., Körner G. et al. Real-time quantification of TEL-AML1 fusion transcripts for MRD detection in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods // *Leuk Res*.—2004.—Vol.28, N 7.—P.699-706.

27. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др Сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии и выявления химерного транскрипта полимеразной цепной реакцией у детей, больных В-линейным острым лимфобластным лейкозом // *Гематология и трансфузиология*. 2010; 55(2): 3-9. [Popov A.M., Tsauro G.A. Verzhbitskaya T. Yu. et al Comparison of the results of evaluating the minimal residual disease by flow cytometry and by detecting of chimeric transcript by the polymerase chain reaction in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia *Gematologija i transfuziologija*=Hematology and Transfusiology. 2010; 55(2): 3-9. (in Russ)]

28. Brüggemann M., Schrauder A., Raff T. et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the second international symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008 // *Leukemia*.—2010.—Vol.24, N 3.—P.521–535

29. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia // *Leukemia*.—2007.—Vol.21, N 4.—P.622-626

30. Fechina L., Shorikov E., Tsauro 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.—Vol.110, N 11.—P.832A.—Abstract 2828.

31. Meyer C., Kowarz E., Hofmann J. et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias // *Leukemia*.—2009.—Vol.23, N 8.—P.1490-1499.

32. Pieters R. Biology and treatment of infant leukemias / in: Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research // Ed C.-H. Pui. Totowa: Humana

Press, 2003.—P.61-73.

33. Reaman G. Biology and treatment of infant leukemias / in: Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research // Ed C.-H. Pui. Totowa: Humana Press, 2003.—P.75-83.

34. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Попов А.М. и др. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая характеристика острых лейкозов у детей первого года жизни // Клиническая онкогематология. 2011; 4 (2): 134-141. [Tsauro G.A., Fleischman E.V., Popov A.M. et al. Cytogenetics and molecular genetics of infant acute leukemias // Klinicheskaja onkogematologija=Clinical Oncohematology 2011; 4 (2): 134-141]

35. Цаур Г.А., Попов А.М., Алейникова О.В. и др. Характеристика перестроек 11q23 (MLL) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом // Онкогематология. — 2011.— №3. — С.57-64. [Tsauro G.A., Popov A.M., Aleinikova O.V., Boychenko E.G., Verzhbitskaya T.Yu., Volochnik E.V. et al. Detection of 11q23 (MLL) rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia. Oncogematologia=Oncohematology. 2011; 3: 57-64. (in Russ)]

36. Цаур Г.А., Плеханова О.М., Гиндина Т.Л. и др. Применение метода флуоресцентной гибридизации in situ для выявления перестроек гена MLL при острых лейкозах у детей первого года жизни // Медицинская генетика.-2012.-№ 7.- С. 35-45 [Tsauro G.A., Plekhanova O.M., Gindina T.L. et al Detection of MLL gene rearrangements in infants under 12 month of age with acute leukemias by fluorescence in-situ hybridization. Meditsinskaya genetika=Medical genetics. 2012; 7: 35-45. (in Russ)]

37. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Гиндина Т.Л. и др. Характеристика перестроек 11q23/MLL при остром миелоидном лейкозе у детей первого года жизни // Клиническая онкогематология. — 2012; 5(4): 365-370. [Tsauro G.A., Fleischman E.V., Gindina T.L. et al. Detection of 11q23 (MLL) rearrangements in infant acute myeloid leukemia // Klinicheskaja onkogematologija=Clinical Oncohematology 2012; 5(4): 365-370 (In Russ.)]

38. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Плеханова О.М. и др Редкие перестройки хромосомного района 11q23 и гена MLL при острых лейкозах у детей первого года жизни // Вопросы диагностики в педиатрии. 2012; 6: 16-24. [Tsauro G.A., Fleischman E.V., Plekhanova O.M. Rare 11q23/MLL rearrangements in infant acute leukemia. Voprosy diagnostiki v pediatrii = Diagnostics in Pediatrics 2012; 6: 16-24 (In Russ.)].

39. Balgobind B., Raimondi S., Harbott J. et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study // Blood.—2009.—Vol.114, N 12.—P.2489-2496.

40. Pui C.-H., Gaynon P., Boyett J. [et al.] Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region // Lancet.—2002.—Vol.359.—P.1909–1915

41. Meyer C., Hofmann J., Burmeister T. et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013 // Leukemia.—2013.—Vol.27, N 11.—P.2165-2176.

42. Felix C., Hosler M., Slater D. et al. MLL genomic breakpoint distribution within the breakpoint cluster region in de novo leukemia in children // J. Pediatr. Hematol. Oncol.—1998.—Vol.20, N 4.— P.299-308

43. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и соавт. Особенности монито-

ринга минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах методом проточной цитометрии у детей первого года жизни. // Детская Онкология. 2008; 2.: 32-35. [Popov A.M., Verzhbitskaya T. Yu., Tsauro G.A. et al. Peculiarities of minimal residual disease monitoring by flow cytometry in infants with B-lineage acute lymphoblastic leukemia Detskaja Onkologija=Pediatric Oncology 2008; 2.: 32-35 (in Russ)].

44. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни острым лимфобластным лейкозом // Онкогематология. 2010;. 2: 46-54. [Tsauro G.A., Nasedkina T.V., Popov A.M. et al. Time to molecular remission as prognostic factor in infant acute lymphoblastic leukemia Oncogematologia=Oncohematology. 2010;. 2: 46-54. (in Russ)]

45. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями // Вестник Уральской медицинской академической науки.– 2011. - №4. – С. 107-111. [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 ural'skoj medicinskoj akademicheskoi nauki= Bulletin of the Ural Medical Academic Research 2011; 4: 107-111. (in Russ)]

46. Dongen van J., Seriu T., Panzer-Gruemayer R. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. Lancet. 1998; 352: 1731-1738.

47. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia Blood. 2002; 99(6): 1952-1958.

48. Campana D. Minimal residual disease studies in acute leukaemia. Am. J. Clin. Pathol. 2004;122: S47-S57.

49. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G., et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2008; 22(4): 771 -782.

50. Borowitz M., Devidas M., Hunger S. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. Blood. 2008; 111(12): 5477-5485.

51. Цаур Г.А., Попов А.М., Наседкина Т.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни, определенной путем выявления химерных транскриптов у детей первого года жизни, больных острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколу MLL-Baby // Гематология и трансфузиология 2012; 57(4). 12-22. [Tsauro G.A., Popov A.M., Nasedkina T.V. et al. Prognostic significance of minimal residual disease detected by PCR for fusion gene transcripts in infant acute lymphoblastic leukemia treated by MLL-baby protocol. Gematologija i transfuziologija=Hematology and Transfusiology. 2012; 57(4). 12-22. (in Russ)]

52. van der Velden V., Cazzaniga G., Schrauder A. et al. Analysis of minimal

residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data // *Leukemia*.—2007.—Vol.21, N 4.—P.604-611.

53. van der Velden V., Panzer-Grumayer E.R., Cazzaniga G. et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting // *Leukemia*.—2007.—Vol.21, N 4.—P.706-713.

54. van der Velden V., Corral L., Valsecchi M.G. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol // *Leukemia*.—2009.—Vol.23, N6.—P.1073-1079.

55. Garand R., Beldjord K., Cavé H., et al. Flow cytometry and IgH/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL // *Leukemia*.—2013.—Vol.27, N 2.—P.370-376.

56. Schrappe M., Valsecchi M.-G., Bartram C. et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study // *Blood*.—2011.—Vol.118, N 8.—P.2077-2084.

57. van der Velden V., Corral L., Valsecchi M.-G. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol // *Leukemia*.—2009.—Vol.23, N6.—P.1073-1079.

58. Eckert C., Biondi A., Seeger K. et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet*.—2001.—Vol.358.—P.1239-1241

59. Bader P., Kreyenberg H., Henze G. et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group // *J Clin Oncol*.—2009.—Vol.27, N 3.—P.377-384.

60. Meyer C., Schneider B., Reichel M. et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes // *Proc Natl Acad Sci USA*.—2005.—Vol.102, N. 2.—P.449-454.

61. Burmeister T., Meyer C., Schwartz S. et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations // *Leukemia*.—2006.—Vol.20, N 3.—P.451-457.

62. Elia L., Gottardi E., Floriddia G. et al. Retrospective comparison of qualitative and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction in diagnosing and monitoring the ALL1-AF4 fusion transcript in patients with acute lymphoblastic leukaemia // *Leukemia*.—2004.—Vol.18, N 11.—P.1824-1830.

63. Elia L., Grammatico S., Paoloni F., et al. Clinical outcome and monitoring of minimal residual disease in patients with acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/ENL fusion gene // *Am J Hematol*.—2011.—Vol.86, N 12.—P.993-997

64. Popov A., Buldini B., de Lorenzo P. et al. Identification of low risk group in infants with acute lymphoblastic leukemia by flow cytometric minimal residual disease measurement at day 15 of Interfant-99 and Interfant-06 protocols treatment // *Blood*.—2013.—Vol.122, N 21.—Abstract 1333.