

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ И МОНИТОРИРОВАНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

И.А. Демидова

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Ключевые слова: острый лейкоз, опухолевые маркеры, минимальная остаточная болезнь

Введение

Изучение патогенеза опухолевых заболеваний системы крови привело к открытию одного из ведущих принципов онкогенеза в целом: причиной формирования злокачественного клона является нарушение функционирования нормальных генов в результате хромосомных aberrаций, мутаций отдельных генов или блокирования нормальной регуляции функционирования генов в связи с эпигеномными (не связанными непосредственно с повреждением структуры генов) событиями [1].

Молекулярная биология гемобластозов как отдельное научное направление стала развиваться в связи с успехами цитогенетики, которая, начавшись как дисциплина описательная, в дальнейшем позволила успешно идентифицировать гены, участвующие в хромосомных нарушениях. Картирование генома человека также дало дополнительный мощный толчок к развитию молекулярной биологии в онкологии в целом и онкогематологии в частности.

В последние годы во всем мире продолжается активная исследовательская работа по идентификации генетических аномалий при гемобластозах и изучению их влияния на процессы жизнедеятельности клетки. Известно большое количество генетических нарушений, ведущих к развитию определенных видов опухолевых заболеваний крови. Детекция аномальных генов в настоящее время является обязательным условием для установления диагноза целого ряда гемобластозов. Более того, выявление определенных транслокаций и мутаций позволяет достаточно уверенно предполагать особенности течения заболевания, судить в ряде случаев о прогнозе и подбирать адекватную терапию. Особое значение приобрело развитие основанной на полученных знаниях так называемой прицельной терапии, дающей возможность проводить коррекцию имеющихся нарушений на генетическом или биохимическом уровне. Самыми яркими примерами лекарственных препаратов, применяемых как «прицельная терапия», являются полностью транс-ретиноевая кислота (АТРА) и иматиниба мезилат (Гливек), позволившие внести революционные изменения в терапию острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) и хронического миелолейкоза [2, 3].

Задача данного обзора достаточно узка — мы попытались осветить современные представления о генетических основах острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) и представить данные о молекулярно-биологических методах контроля резидуальной опухоли в процессе терапии.

Основные методики, используемые при молекулярно-биологических исследованиях в гематологии

Молекулярно-биологические исследования прочно вошли в диагностическую практику современной гематологии. В связи с этим понимание основных молекулярных методов стало необходимой частью образования практических гематологов. Количество разнообразных методик весьма велико, однако мы рассмотрим только основные принципы наиболее распространенных из них и остановимся на практических областях применения молекулярных методов при диагностике ОМЛ.

Блоттинг (гибридизация) ДНК и РНК

Основной метода гибридизации (блоттинга) является фиксирование специально синтезированной нуклеотидной последовательности (пробы), комплементарной исследуемому участку нуклеиновой кислоты. Проба несет на себе флюоресцентную или радиоактивную метку, свечение которой определяется при помощи рентгеновской пленки или специальных приборов. Наличие свечения означает успешную гибридизацию пробы, что говорит о полной комплементарности структуры исследуемого участка РНК или ДНК искусственной пробе и позволяет таким образом расшифровать его последовательность. В случае возникновения мутаций успешная гибридизация, как правило, невозможна.

Блоттинг РНК (нозерн-блоттинг) не применяется в практической диагностике гемобластозов. Блоттинг ДНК (Саузерн-блоттинг) применяется достаточно редко.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР — это метод, который позволяет синтезировать определенные фрагменты ДНК из огромного количества геномной ДНК, содержащейся в клетке. В основе метода лежит естественный процесс репликации или дотраивания второй цепи ДНК. В специальную реакционную смесь вносят определенное количество исследуемой ДНК. Для того чтобы инициировать процесс репликации, создают специальные условия, вызывающие разрушение связей между двумя цепочками ДНК (фаза тепловой денатурации при 95°C). Далее к одноцепочечной ДНК прикрепляются праймеры, служащие «затравкой» для дотраивания второй цепи (фаза «отжига»). Праймеры — это короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, или олигонуклеотиды, которые присоединяются к участкам, ограничивающим нужные районы ДНК, по принципу комплементарности. Затем начинает действовать ДНК-полимераза, катализирующая дотраивание второй цепи к участку ДНК между праймерами из дезоксинуклеотидтрифосфатов, находящихся в реакционной смеси

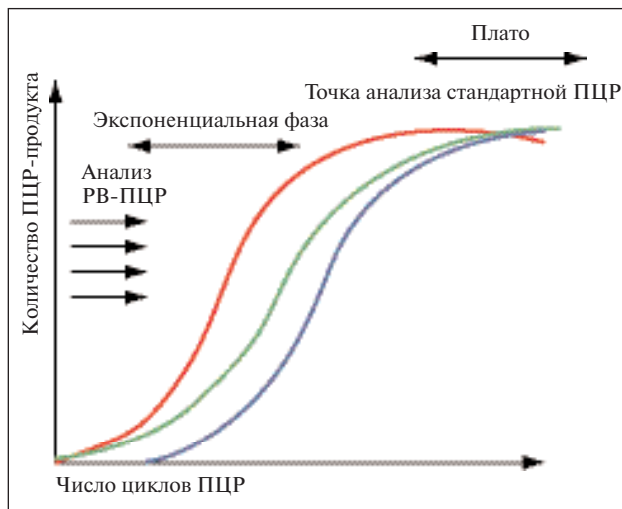


Рис. 1. Экспоненциальная амплификация в ПЦР

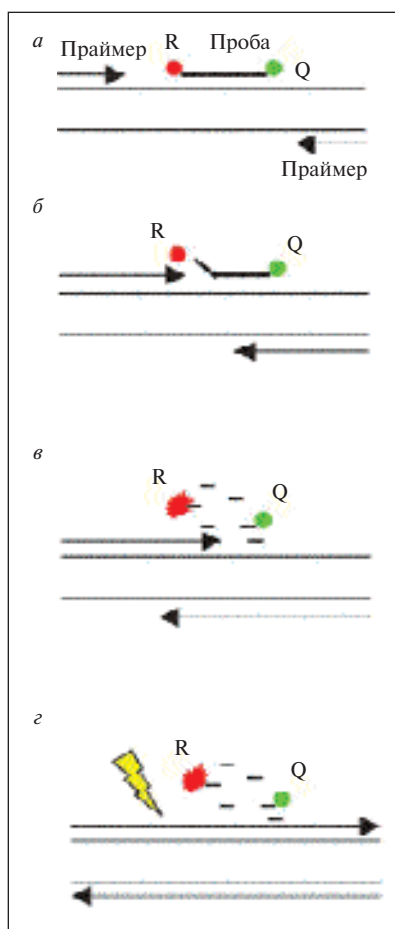


Рис. 2. Схематическое изображение реакции РВ-ПЦР (тип TaqMan probe): а — гибридизация пробы на участок ДНК между праймерами (R — излучающий флуорохром, Q — гаситель); б — расщепление связи ДНК — проба во время фазы синтеза второй цепи; в — гидролиз пробы в результате эндонуклеазного действия Taq-полимеразы, освобождающее излучающий флуорохром при продолжении фазы синтеза; г — регистрация сигнала под воздействием лазерного излучения при завершении фазы синтеза второй цепи ДНК

(фаза синтеза). Реакционные циклы, состоящие из трех перечисленных фаз, повторяются многократно (обычно 25—30 раз). Таким образом, подобрав соответствующие праймеры, можно размножить (амплифицировать) строго определенный участок в специфических температурных условиях, моделируемых специальным прибором — амплификатором или термоциклером — и за 2—3 ч получить ПЦР-продукт в количестве, которое легко можно выявить методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. С помощью метода ПЦР возможно выявить последовательности ДНК, строго специфичные для генетических аномалий, и таким образом определить наличие данного нарушения при диагностике или присутствии патологического клона во время лечения (минимальную остаточную болезнь — МОБ).

Обратная транскриптазная реакция

Сущность обратной транскриптазной реакции (ОТ) заключается в построении с заранее полученной из клеток матричной РНК (имеющей гораздо меньшие размеры за счет отсутствия считывания РНК с регуляторных последовательностей ДНК — интронов) так называемой комплементарной ДНК (кДНК). Реакция происходит с помощью обратной транскриптазы, выделенной из некоторых вирусов. Этот метод используется преимущественно в тех случаях, когда размер искомого фрагмента геномной ДНК превышает несколько тысяч пар оснований и, следовательно, не может быть исследован в ПЦР из-за своих размеров. кДНК, образующаяся в результате ОТ, гораздо меньше соответствующего ей участка геномной ДНК и может быть использована для проведения ПЦР. Сочетание ОТ и ПЦР (ОТ-ПЦР) наиболее широко используется при диагностике специфических транслокаций.

Гнездная ПЦР (nested PCR)

Этот вид ПЦР используется в тех случаях, когда количество ДНК, несущей специфическую аномалию, крайне мало из-за общей низкой клеточности образца (например, при ОПЛ) или минимального содержания в образце клеток опухолевого клона. Гнездная ПЦР представляет собой «дублированную» реакцию. Материал, полученный при первой ПЦР, используется вновь для амплификации (при этом применяются праймеры с посадкой на продукт первой ПЦР), и в конце второй реакции количество полученного продукта многократно увеличивается, что позволяет успешно использовать этот метод для контроля за МОБ.

ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) позволяет количественно оценить число исходных копий ДНК или кДНК в образце, что невозможно при проведении обычной ПЦР. Причиной этого является то, что ПЦР, пройдя экспоненциальную фазу, выходит на стадию «плато», т.е. приводит к образованию определенного, не нарастающего далее количества продукта через некоторое число амплификационных циклов (наиболее часто — 25—30). В результате этого свойства ПЦР образцы с различным исходным содержанием матрицы к концу 30-го цикла могут показывать одинаковый результат (рис. 1).

Особенностью метода РВ-ПЦР, отличающей его от обычной ПЦР, является возможность количественного измерения ПЦР-продукта во время экспоненциальной фазы процесса амплификации. Для этого используется детекция флуоресцентных сигналов во время и/или после каждого цикла ПЦР. Существует несколько разновидностей РВ-ПЦР (с использованием гибридационных проб — beacon probes, гидролизующихся проб, или специфического флуоресцентного красителя SYBR Green). Наиболее распространенным является вид, использующий гидролизующиеся пробы (TaqMan probe) и основанный на 5'-3'-экзонуклеазной активности *Thermus aquaticus* (Taq) ДНК-полимеразы (т.е. на ее способности расщеплять все фрагменты ДНК, не представляющие собой двойной спирали). Помимо праймеров в реакции задействована олигонуклеотидная проба, комплементарная участку амплифицируемой последовательности и соединенная с двумя флуорохромами: на 5'-конце расположен излучающий флуорохром, на 3'-конце — гаситель флуоресценции. Пока проба интактна и оба флуорохрома находятся в непосредственной близости, излучения сигнала не происходит. При начале амплификации проба удаляется

с цепи ДНК Taq-полимеразой и расщепляется за счет ее экзонуклеазной активности. Таким образом излучающий флюорохром освобождается из-под действия гасителя, и излучение может быть зарегистрировано прибором (рис. 2). С увеличением количества ПЦР-продукта с каждым циклом происходит соответствующее увеличение количества регистрируемых сигналов в соответствии с исходным количеством ДНК (соответствие определяется с помощью построения калибровочной кривой).

Генетические аномалии при острых миелоидных лейкозах

Основными молекулярными событиями, ведущими к формированию лейкоэмического клона при миелоидных лейкозах, являются либо возникновение специфических транслокаций, зачастую с вовлечением протоонкогенов, либо мутации генов, участвующих в контроле пролиферации и дифференцировки миелоидной ткани [4]. Для миелоидных опухолей наиболее характерными являются реципрокные транслокации, при которых происходит обмен генетическим материалом между различными хромосомами с образованием патологических хромосомных структур, самой известной из которых является филадельфийская хромосома [5]. На молекулярном уровне в процессе такой транслокации образуется так называемый химерный ген, состоящий из активных доменов двух генов-участников перестройки и ведущий к экспрессии химерного белка, который способен, как правило, либо блокировать миелоидную дифференцировку, либо стимулировать бесконтрольную клеточную пролиферацию за счет следующих событий:

- нарушение функционирования ядерных рецепторов (характерный пример — ОПЛ, при котором в транслокации вовлекается ген, кодирующий рецептор ретиновой кислоты *RARA* на хромосоме 17);

- подавление транскрипции (считывания РНК с ДНК) за счет связывания ключевого белкового комплекса CBF (core binding factor), что характерно для острых лейкозов с транслокациями, вовлекающими хромосомы 21 и 16 (гены *RUNX1*, бывший *AML1*, и *CBFB*);

- репрессия генов гомеобокса (характерно для ОМЛ с транслокациями, в которых участвует ген *MLL* — mixed lineage leukemia, расположенный на хромосоме 11);

- аутокринная активация тирозинкиназ (*BCR-ABL*-позитивные миелоидные лейкозы, мутации гена *FLT3*).

Особо хотелось бы отметить важность мутаций генов, не вовлеченных в транслокации, но являющихся за счет изменения функций медиаторами процессов, описанных выше. К ним относятся час-

тичная tandemная дупликация гена *MLL* в случае соматической мутации 11q23, внутренняя tandemная дупликация гена *FLT3*, ведущая к активации киназного каскада за счет мимикрии под нормальный киназный рецептор, мутации генов *CEBPA* и *RUNX1 (AML1)*, подавляющих транскрипцию за счет связывания комплекса CBF, мутации гена *NPM*, приводящие к блоку трансляции белков в рибосомах [6—8].

Мы рассмотрим наиболее часто встречающиеся при ОМЛ транслокации и специфические мутации, определение которых имеет значение не только для прогноза, но и для выбора терапии (табл. 1).

Значение выявления химерного гена *PML/RARA* при ОПЛ и его роль в блоке миелоидной дифференцировки

На рис. 3 изображена нормальная регуляция миелоидной дифференцировки путем активации рецептора ретиновой кислоты α (*RAR α*). В неактивном виде рецептор образует подавляющий транскрипцию комплекс вместе с другим рецептором этого же семейства (*RXR*),

Таблица 1. Транслокации, определение которых имеет практическое значение при миелоидных опухолях

Генетическая аномалия	Гены, участвующие в перестройке	Функция протеина	Частота встречаемости при ОМЛ
t(15;17) t(11;17) t(11;17) t(5;17) t(17;17)	<i>PML/RARA</i> <i>PLZF/RARA</i> <i>NuMa/RARA</i> <i>NPM/RARA</i> <i>STAT5b/RARA</i>	Рецептор ретиновой кислоты	95% М3 Менее 5% М3 Менее 1% М3 Менее 1% М3
t(8;21) t(3;21) t(6;21)	<i>AML1/ETO</i> <i>AML1/Evi1</i> <i>AML1/MTG16</i> <i>RUNX1 mut</i>	Транскрипционный фактор	20% М2 Менее 1% М2 и МДС Менее 1% М2 и МДС 3—5% М2 без цитогенетически определяемых хромосомных аномалий
inv 16 t(16;16)	<i>CBFB/MYH11</i>	Транскрипционный фактор	Практически 100% М4 Ео
t(9;22)	<i>BCR/ABL</i>	Тирозинкиназа	Крайне редко
t(6;11) t(9;11) t(10;11) t(11;19) 11q23	<i>AF6/MLL</i> <i>AF9/MLL</i> <i>AF10/MLL</i> <i>MLL/ENL</i> <i>MLL/ITD</i>	Транскрипционный фактор	До 15—20% М4 и М5, включая суммарно все нарушения <i>MLL</i> . До 11% ОМЛ без цитогенетически выявляемых хромосомных аномалий
t(3;5)	<i>NPM/MLF</i>	Регулятор трансляции	1—2% всех ОМЛ
	<i>FLT3/ITD</i>	Рецептор тирозинкиназы	До 30% при М3, также при ОМЛ без цитогенетически выявляемых хромосомных аномалий
	<i>CEBPA mut</i>	Транскрипционный фактор	16% М2 без цитогенетических хромосомных аномалий
	<i>NPM mut</i>	Регулятор трансляции	30% всех ОМЛ, до 60% ОМЛ без цитогенетически выявляемых хромосомных аномалий

Примечание. МДС — миелодиспластический синдром.

ядерными помощниками — корепрессорами (SMRT, N-CoR, Sin3a) и белком гистондеацетилазой HDAC. Этот комплекс соединяется со специфическим участком ДНК (RARE — retinoid acid responsive element), полностью блокируя считывание РНК с генов, регулирующихся геном *RAR*. В естественной ситуации рецептор связывается со своим нормальным лигандом — ретиновой кислотой, и связь с корепрессорами разрушается. Далее происходит присоединение коактиваторов транскрипции (P300, CBP), что приводит к активации генов, регулирующих нормальную миелоидную дифференцировку [9].

При образовании транслокации t(15;17), ведущей к появлению химерного белка PML/RARA, возникает прочная связь рецептора с корепрессорами, не разрушающаяся в присутствии физиологических концентраций ATRA. ДНК освобождается лишь в присутствии фармакологических концентраций ATRA, превышающих физиологическую в тысячи раз. Только это делает возможной нормальную транскрипцию и дальнейшую миелоидную дифференцировку [10]. Тот же механизм справедлив для транслокации t(5;17), вовлекающей гены *NPM* и *RARA*. Совершенно другая ситуация возникает при ОПЛ с транслокацией t(11;17) — *PLZF/RARA* и t(11;17) — *STAT5b/RARA*. Ген *PLZF*, так же как и *STAT5b*, имеет собственные зоны контакта с комплексом корепрессоров, и добавление ретиновой кислоты не приводит к освобождению зависимых генов для нормальной экспрессии [11]. Сложность диагностики при ОПЛ заключается в том, что морфологические и цитохимические методы не позволяют различать между собой разные виды характерных транслокаций. Стандартная цитогенетика зачастую неэффективна, так как при ОПЛ клетки костного мозга в обычной краткосрочной культуре делятся плохо, и материала не хватает для подтверждения диагноза ОПЛ и дифференцирования транслокаций. Все вышеуказанные транслокации возможно определять с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) или метода ОТ с проведением далее так называемой гнездовой ПЦР.

Таким образом, определение транслокаций при ОПЛ крайне необходимо не только для установления правильного диагноза, но и для определения первичной резистентности к стандартной для ОПЛ терапии ATRA и, соответственно, к определению прогноза — благоприят-

ного при t(15;17) и t(5;17) и неблагоприятного при всех остальных видах транслокаций.

Значение определения транслокаций, участвующих в репрессии комплекса CBF

Образование нормального комплекса CBF, ведущего к активации промотора гена макрофагального колоние-стимулирующего фактора (M-CSF), играет важнейшую роль в миелоидной дифференцировке и напрямую зависит от формирования связи между белками-продуктами генов *c/EBPα*, *AML1(RUNX1)* и *CBFβ* (рис. 4). Поэтому все транслокации, вовлекающие хотя бы один из перечисленных генов, такие как t(8;21) или *inv 16*, превращают указанный комплекс из активатора в репрессор транскрипции, нарушая присоединение PU.1, линейно-специфического белка, необходимого для усиления функции промотора M-CSF, и таким образом блокируют миелоидную дифференцировку. Блокада происходит с участием ядерных корепрессоров и гистондеацетилаз, тех же, что были описаны в предыдущем разделе, касающемся лейкемогенеза при ОПЛ. Надо отметить, что любые мутации генов-участников комплекса CBF, таких как *c/EBPα*, *RUNX1*, даже при отсутствии цитогенетически определяемых нарушений ведут к формированию лейкемического фенотипа, т.е. к нарушению дифференцировки и бесконтрольной пролиферации. Тем не менее, по современной классификации, обнаружение данных нарушений относит этот тип лейкоза в благоприятную группу (при условии проведения соответствующей терапии).

Обычно транслокации t(8;21) или *inv 16* и др. довольно легко определяются при стандартном цитогенетическом исследовании (СЦИ). ПЦР в данной ситуации более необходима для контроля за МОБ во время терапии лейкоза, хотя значение факта определения транслокации t(8;21) в ремиссии ОМЛ до сих пор однозначно не определено [12, 13].

Так же как и при ОПЛ используется ОТ-ПЦР. При определении мутаций генов *c/EBPα*, *RUNX1* с наибольшей эффективностью может быть применена только ПЦР. Если учесть, что данные aberrации суммарно встречаются примерно в 15–20% М2 без цитогенетически выявляемых нарушений, становится ясной необходимость выявления этих мутаций, тем более что, по последним данным, обнаружение таких аномалий без сочетания с другими цитогенетическими нарушениями относит этот тип лейкоза из группы промежуточного в группу благоприятного прогноза [14].

Определение транслокаций, ведущих к активации тирозинкиназ и киназных рецепторов

Самой известной транслокацией, приводящей к аномальной активации киназного каскада и неконтролируемой клеточной пролиферации, является филаделфийская хромосома, или t(9;22), ведущая к образованию химерного гена *BCR/ABL* (рис. 5). В зависимости от локализации точки разрыва на хромосоме 22 образуется химерный онкоген

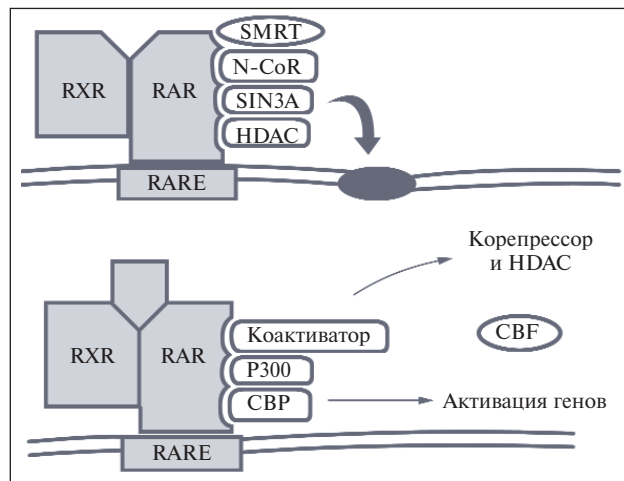


Рис. 3. Нормальная регуляция миелоидной дифференцировки путем активации рецептора ретиновой кислоты



Рис. 4. Образование комплекса CBF

различной длины (от 190 до 230 кД). Продукт этого гена (тирозинкиназа) ведет к фосфорилированию огромного количества протеинов (RAS, PI-3, Grb2, Crkl), участвующих в процессе сигнальной трансдукции — передаче сигнала с рецепторов клеточной мембраны ядерному генетическому материалу. Активация такого количества различных сигнальных путей ведет к независимой от ростовых факторов пролиферации, нарушению адгезии клеток к стромальному окружению и устойчивости к апоптозу — программированной клеточной гибели. При ОМЛ встречается как тип транслокации с точкой разрыва M-bcr, ведущий к образованию протеина размером 210 кД (p210), так и m-bcr с образованием протеина p190. Данная транслокация обычно определяется при СЦИ. Однако в настоящее время общепринятыми методами выявления аномалии и дальнейшего контроля за МОБ являются FISH и ПЦР в реальном времени (после проведения ОТ), позволяющие оценивать количество аномального транскрипта и таким образом определять эффективность проводимой терапии.

Другим вариантом аутокринной стимуляции киназного каскада является мутация гена *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase receptor), кодирующего тирозинкиназный рецептор. Образование так называемой внутренней тандемной дупликации в структуре гена ведет к изменению третичной структуры рецептора таким образом, что он мимикрирует под обычный рецептор, уже активированный специфическим лигандом. Это ведет к активации протеинкиназ ERK2 и AKT, приводит к неконтролируемой пролиферации и обычно ассоциируется с выраженным лейкоцитозом. Обнаружение этой мутации возможно только с помощью ПЦР. В этом случае возможно использование как обычной ПЦР на геномной ДНК, так и ОТ-ПЦР. Следует особо отметить, что выявление этого нарушения у пациентов с t(15;17) или у больных без явных нарушений кариотипа резко ухудшает прогноз и переводит этих пациентов в группу неблагоприятного течения ОМЛ [15].

По данным последних исследований, все виды нарушений, связанных с активацией киназных сигнальных путей, являются независимым отрицательным прогностическим признаком.

Значение выявления транслокаций, ведущих к нарушению экспрессии генов гомеобокса

К генам гомеобокса относят целый ряд генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые принимают участие в регуляции эмбрионального развития. Эти гены имеют высокомолекулярную структуру у большинства эукариот, от самых низших до наиболее высокоорганизованных. Наиболее значимым геном-регулятором экспрессии генов гомеобокса у млекопитающих является ген *MLL* (mixed lineage leukemia). Партнерами этого гена являются гены-регуляторы транскрипции, поэтому любые мутации, вовлекающие *MLL*, ведут к подавлению транскрипции генов гомеобокса. Точный механизм лейкемогенеза в данном случае пока до конца не определен. *MLL* участвует в образовании более 25 различных транслокаций, которые (кроме

t(4;11)) обычно характерны для ОМЛ M4/M5. Все они могут быть определены как методом стандартной цитогенетики, так и ПЦР. Наиболее известным и распространенным нарушением является соматическая мутация 11q23, приводящая к образованию частичной внутренней тандемной дупликации, в которой участвуют экзоны со 2 по 6 или со 2 по 8. Подобное нарушение определяется в случаях трисомии хромосомы 11 и в 11—20% случаев ОМЛ без цитогенетических нарушений. В этих случаях абберация может быть обнаружена только с помощью ПЦР. Следует отметить, что любое нарушение структуры гена *MLL* однозначно определяет неблагоприятный вариант течения ОМЛ [16].

Мутации гена *NPM*

Ген нуклеофозмина (*NPM1*) в последнее время привлекает все более пристальное внимание исследователей ввиду частой (50—60%) выявляемости мутаций этого гена при ОМЛ с нормальным кариотипом. В норме продукт этого гена играет ключевую роль в биогенезе протеосом и, таким образом, опосредованно влияет на синтез протеинов в клетке. Ген *NPM1* участвует в ряде реципрокных транслокаций, характерных для анаплазированной Т-клеточной лимфомы t(2;5), редко встречающихся форм МДС с транслокацией t(3;5) и крайне редкого типа ОПЛ с t(5;17). Для ОМЛ более характерны мутации *NPM1*, наиболее частой из которых является дупликация тетрауклеотида TCTG в позиции 956—959 в экзоне 5 (75—80% случаев). Во всех случаях мутаций или транслокаций с участием *NPM1* происходит изменение нормального внутриядерного расположения белка на цитоплазматическое и нарушается его взаимодействие с генами-партнерами (*TP53* и *ARF*), что инактивирует их как опухолевые супрессоры. Тем не менее обнаружение мутаций *NPM1*, как правило, ассоциируется с благоприятным течением ОМЛ (за исключением случаев ассоциации с мутациями гена *FLT3*) [17]. В настоящее время продолжается активное изучение этого гена с целью уточнения его роли в лейкемогенезе и возможного использования его как маркера при исследовании МОБ.

Использование молекулярных методов

для оценки прогноза и ответа на терапию

Как упоминалось выше, детекция молекулярных аномалий у больных ОМЛ имеет значение не только для установления правильного диагноза, но и для опре-

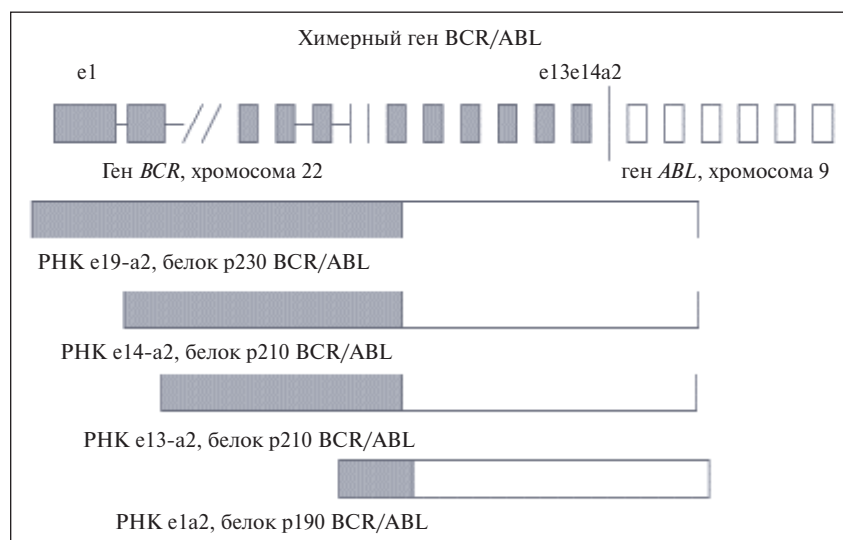


Рис. 5. Образование химерного гена BCR/ABL и его продуктов

деления прогноза течения заболевания, выбора адекватной терапии и проведения контроля за течением лейкоза (выявление МОБ).

В течение последних лет выделяют три группы по течению ОМЛ и ответу на стандартную терапию [18]:

— группа благоприятного прогноза, к которой относятся ОМЛ, несущие транслокации $t(8;21)$, $inv\ 16$ (ОПЛ с $t(15;17)$ относят в отдельную группу);

— группа промежуточного прогноза, обычно ОМЛ, не несущие цитогенетически выявляемых хромосомных aberrаций;

— группа неблагоприятного прогноза — ОМЛ с транслокациями $t(9;22)$, всеми аномалиями, вовлекающими ген *MLL*, и рядом других аномалий (таких как $del\ 5q$, $5q-$, $7q-$, аномалии хромосомы 3, комплексные хромосомные aberrации).

В последнее время уделяется особое внимание группе пациентов с ОМЛ, не несущих цитогенетически определяемых аномалий и составляющих от 40 до 60% от общего количества пациентов, страдающих этим заболеванием. Молекулярно-биологические исследования позволили выделить в этой популяции подгруппы с генетическими нарушениями, ассоциирующимися с более благоприятным прогнозом (несущие мутации генов *CEBPA* и *RUNX1*, *NPM*), или, наоборот, определяющие неблагоприятный прогноз течения заболевания (*EVII*, *PTD-MLL*, *FLT3-ITD*) [19, 20]. Кроме того, одно из последних направлений изучения структуры молекулярных нарушений при ОМЛ — выявление сочетания цитогенетически выявляемых мутаций с описанными выше молекулярными аномалиями и оценка влияния этих сочетаний на прогноз заболевания.

Исследование МОБ при миелоидных опухолях в течение последних лет приобрело особое значение в связи с открытием новых препаратов, обладающих прямым воздействием на некоторые звенья патогенеза острых лейкозов (ATRA, ингибиторы тирозинкиназ, ингибиторы гистондеацетилаз).

В настоящее время выделяют четыре основных метода определения МОБ, каждый из которых имеет свои

достоинства и недостатки (табл. 2): СЦИ, FISH, мультипараметрическая цитофлюорометрия (МЦФ), различные виды ПЦР (включая РВ-ПЦР)

Задачей данного раздела является описание значения молекулярно-биологических методов в определении МОБ при разных генетических аномалиях, ведущих к формированию лейкомического клона.

Значение определения МОБ в группе ОМЛ с наиболее часто выявляемыми молекулярными маркерами (транслокации $t(8;21)$, $inv16/t(16;16)$, $t(15;17)$)

Использование качественной ОТ-ПЦР для определения химерного транскрипта *AML1/ETO* при ОМЛ, несущем транслокацию $t(8;21)$, привело к появлению работ, показывающих возможность существования патологического клона у большого числа больных, находящихся в длительной ремиссии. Использование высокочувствительных методик, позволяющих выявлять 1 клетку на 10^5 — 10^6 , доказало сохранение экспрессии химерного онкогена *AML1/ETO* у пациентов не только после проведенной химиотерапии, но и после трансплантации костного мозга [12, 20]. Биологическое значение этого факта оставалось неясным; предполагалось, что $t(8;21)$ является лишь одним событием в многоступенчатом патогенезе ОМЛ [21]. Однако почти одновременно появились сообщения о том, что у большинства больных в долгосрочной ремиссии *AML1/ETO* все же не определяется [22, 23]. Причины появления этих конфликтующих между собой данных стали ясны, когда при сопоставлении состава исследуемых групп, проводимого лечения и чувствительности используемых методов обнаружилась их явная неоднородность. Одним из последних исследований с использованием качественной ОТ-ПЦР стало многоцентровое исследование, опубликованное F. Morschauer и соавт. [24]. В этой работе использовались два вида качественной ОТ-ПЦР: двухэтапная (гнездная) с чувствительностью 10^6 и одноэтапная с чувствительностью 10^5 . У 14 больных из 51 в длительной ремиссии патологический транскрипт не определялся обоими методами. У остальных пациентов при проспективном исследовании была обнаружена зависимость возникновения рецидива

Таблица 2. Сравнение различных методов определения МОБ

Метод	Процент информативности при ОМЛ	Относительная чувствительность	Преимущества	Недостатки
СЦИ	70	$1-5 \times 10^{-2}$	Определяет специфические маркеры, дополнительные нарушения при клональной эволюции	Малая чувствительность, трудоемкость
FISH	40—60	10^{-2} , 10^{-5} (для D-FISH)	Определяет специфические маркеры, возможно использование в интерфазных ядрах, возможность количественного определения	Трудоемкость, высокая стоимость, высокие пороговые значения для обычной FISH
МЦФ	>50	10^{-2} — 10^{-2}	Относительно высокая чувствительность, возможность количественного определения, быстрота	Ложнонегативные результаты из-за изменения фенотипа в процессе клональной эволюции опухоли
ПЦР (+РВ-ПЦР)	Специфические маркеры — 30—40; другие молекулярные маркеры, ассоциированные с ОМЛ (<i>WT-1</i> , <i>PRAME</i>) — до 80—90	10^{-3} — 10^{-6}	Высокая чувствительность, возможность количественного определения, быстрота, возможность автоматизации и стандартизации	Ложнопозитивные результаты (контаминация), снижение чувствительности из-за низкого качества РНК, низкой экспрессии РНК, неполноценной обратной транскрипции

от обнаружения *AML1/ETO* в ранние сроки (до консолидационной терапии) с помощью одноэтапной ПЦР.

Тем не менее в настоящее время качественное выявление МОБ имеет ограниченное применение при обследовании пациентов с *t(8;21)*. К. Toba и соавт. [25] одними из первых разработали количественное определение числа копий *AML1/ETO*. Использование высокочувствительной конкурентной ПЦР позволило авторам определять до трех копий транскрипта *AML1/ETO* в исследуемой РНК. В своей работе авторы показали, что во время индукционной терапии количество химерного транскрипта уменьшается на 2–3 log, а во время консолидационной терапии — еще на столько же. У пяти больных было обнаружено повышение числа копий *AML1/ETO* до 10^5 на 1 мкг РНК в костном мозге и до 10^3 – 10^4 в периферической крови за 3–6 мес до возникновения гематологического рецидива. Таким образом, регулярное количественное исследование образцов костного мозга и периферической крови в ходе терапии и дальнейшего наблюдения помогло определить пороговые значения, выделяющие группу больных, которым угрожает рецидив ОМЛ.

В последнее время получило распространение количественное определение *AML1/ETO* с помощью РВ-ПЦР (с использованием унифицированной методики, предложенной BioMed Concerted Action). В целом опубликованные результаты соответствуют упомянутым выше, однако имеющихся данных пока недостаточно для создания четких рекомендаций по выявлению МОБ и определения ее значения для развития рецидива [26, 27].

Данные о молекулярном мониторинге пациентов с *inv16* ограничены малым числом наблюдений. D. Saxton и соавт. [28] опубликовали данные о двух пациентах, находящихся в ремиссии более 1 года, которые были негативны при качественном ПЦР-анализе. J. Poige и соавт. [29], в свою очередь, привели результаты исследования, в котором у трех пациентов с *inv16* сохранялась позитивность при ПЦР-анализе от 3 до 6 мес с момента диагностики [29]. Тем не менее постоянной ПЦР-позитивности у больных в длительной ремиссии не выявлялось.

В настоящее время качественное определение данной аномалии при контроле за МОБ имеет ограниченное значение. Данные, полученные G. Marcucci и соавт. [30] при исследовании МОБ у пациентов с транскриптом *CBFB/MYH11* с помощью РВ-ПЦР, выявили следующую зависимость: определение более 10 копий *CBFB/MYH11* у пациентов после завершения химиотерапии ведет к более короткой ремиссии и высокому риску развития рецидива [30]. Тем не менее как и в случае ОМЛ с *t(8;21)* необходимо дальнейшее накопление унифицированных данных для установления четких критериев контроля МОБ при этом виде лейкоза.

Наличие специфического молекулярного маркера злокачественного клона *t(15;17)* позволяет не только достоверно установить диагноз ОПЛ, но и наблюдать за ответом на специфическую терапию у каждого пациента [31]. За последние годы было опубликовано немало исследований, посвященных мониторингу МОБ у больных ОПЛ. Большие надежды возлагались на то, что отслеживание МОБ с помощью молекулярно-биологических методов позволит точнее выявлять больных, которым показана более интенсивная терапия ОПЛ. Использование ОТ-ПЦР для определения химерного транскрипта гена *PML-RARA* (чувствительность 10^{-4}) позволило определить, что

более 90% больных, получавших длительную терапию АТРА в комбинации с цитостатиками, становятся ПЦР-негативными. Тем не менее дальнейшее наблюдение за пациентами показало, что негативный результат ПЦР нельзя отождествлять с излечением ОПЛ, так как у части ПЦР-негативных пациентов (20–30%) развивается рецидив заболевания [32]. Общим выводом упомянутых выше исследований стало наблюдение, что сохранение транскрипта *PML-RARA* после окончания консолидации является достоверным прогностическим признаком рецидива. Однако необходимо отметить, что часть работ были ретроспективными, чувствительность ОТ-ПЦР варьировала, нельзя было исключить некоторой селекции пациентов и разнородности терапии. В связи с этим особое внимание исследователей привлекло раннее отслеживание МОБ и определение скорости снижения количества опухолевых транскриптов при ОПЛ. Исследование английской группы MRC, в котором экспрессия *PML-RARA* и *RARA-PML* определялась после каждого курса химиотерапии, показало, что скорость уменьшения экспрессии аномального транскрипта является независимым прогностическим фактором при ОПЛ [33].

Полученные данные нуждаются в подтверждении в проспективных исследованиях на больших группах больных, получающих одинаковое лечение. Тем не менее не вызывает сомнения, что отслеживание МОБ на молекулярном уровне поможет выделить группу пациентов с высоким риском развития рецидива в процессе терапии и дальнейшего наблюдения. Такие пациенты должны подвергаться более тщательному наблюдению за МОБ по окончании консолидации. Возможно, что именно в этой группе больных целесообразно проведение дополнительного курса консолидации, включая аллогенную или аутологичную трансплантацию костного мозга (ТКМ) в первой ремиссии.

Прогностическая ценность молекулярного мониторинга после завершения терапии была доказана исследованиями итальянской группы GIMEMA. Было установлено, что возобновление транскрипции аномального гена, выявленной повторными исследованиями костного мозга (3 раза в месяц), после завершения лечения с большой долей вероятности предсказывает рецидив ОПЛ. С использованием такой стратегии в данной группе больных было предсказано более 70% рецидивов. Более того, у 81% этих пациентов химерный транскрипт стал определяться в течение первых 6 мес после снятия с терапии. В среднем с момента выявления молекулярного рецидива до момента наступления гематологического рецидива проходило 3 мес (1–14 мес) [34].

Следует отметить, что отслеживание МОБ является актуальным и для пациентов, которым проведена аллогенная или аутологичная ТКМ. При обследовании 15 больных, которым проводилась ауто-ТКМ во второй ремиссии, результаты ОТ-ПЦР непосредственно перед трансплантацией ассоциировались с длительностью безрецидивной выживаемости после трансплантации. У всех семи больных, экспрессировавших *PML-RARA* до ТКМ, впоследствии развивался рецидив, тогда как у 7 из 8 ПЦР-негативных больных наблюдалась длительная ремиссия. В этом исследовании мобилизация клеток костного мозга проводилась в период второй морфологической ремиссии (трансплантат и костный мозг пациентов были ПЦР-негативными) [35].

Известным фактом является относительно низкая чувствительность ОТ-ПЦР при ОПЛ (10^{-4} по сравнению

с 10^{-6} при определении *BCR-ABL* при хроническом миелоидном лейкозе). Недостаточная чувствительность реакции может зависеть от ряда причин, основными из которых считаются относительно низкая экспрессия *PML-RARA* и нестойкость РНК, приводящая к ее быстрому разрушению в процессе обработки и хранения образца [33].

Ввиду относительно низкой чувствительности обычных методов гнездовой ОТ-ПЦР были предприняты попытки ее повышения с целью выделить подгруппу больных с высоким риском развития рецидива [36—38]. Эти методы оказались слишком трудоемки для того, чтобы применять их в крупных мультицентровых исследованиях, но они предвосхищали появление количественных методик, основанных на РВ-ПЦР для определения тактики лечения больных ОПЛ.

Ряд исследователей использовали РВ-ПЦР для выявления транскриптов сливного гена *PML-RARA*. В. Cassinat и соавт. [39] представили предварительные данные о различной скорости достижения ремиссии после терапии АТРА и химиотерапии. Отслеживание МОБ у 15 больных в исследовании А. Mitterbauer и соавт. [40] помогло предсказать рецидив у пяти больных с усилением экспрессии *PML-RARA*. Эффективность выявления МОБ методом Taqman РВ-ПЦР оказалась выше полученной методом традиционной гнездовой ОТ-ПЦР, несмотря на то что чувствительность обоих методов была сопоставима (10^{-4}). Это исследование выявило преимущество РВ-ПЦР в выявлении низкокачественной РНК, которая могла служить причиной ложноотрицательных результатов обычной ПЦР. В таких образцах удавалось обнаруживать даже очень низкую экспрессию *PML-RARA* и *RARA*, использовавшегося в качестве контрольного гена. Соотношение экспрессий давало возможность объективно оценить количество химерного транскрипта в образце. Выявление транскриптов *PML-RARA* в конце консолидации предсказывало надвигающийся рецидив. Особое значение имела позитивность после третьего курса химиотерапии: риск развития рецидива у этих пациентов был значительно выше по сравнению с теми, у кого *PML-RARA* на этом этапе не выявлялся (60 против 15%). В настоящее время не подвергается сомнению использование метода РВ-ПЦР как ведущего при мониторинговании МОБ в больших клинических исследованиях при ОПЛ.

Данные об отслеживании МОБ с использованием редко встречающихся молекулярных маркеров представляют собой либо описания случаев, либо работы, включающие небольшое количество пациентов, разнородно леченных и обследованных неунифицированными методиками [41—43], и поэтому в данном обзоре рассматриваться не будут.

Мониторирование МОБ при ОМЛ с использованием сурrogатных молекулярных маркеров

Известно, что лишь около 30—40% миелоидных лейкозов несут стабильно выявляемые хромосомные aberrации, могущие быть маркерами патологического клона при детекции МОБ. В последние годы особое внимание уделяется поиску альтернативных генов, экспрессирующихся у большинства пациентов с ОМЛ, как потенциальных маркеров лейкемических клеток.

Одним из таких генов является *WT-1*, другим — *PRAME*, однако изучение последнего пока находится в стадии разработки [44].

Ген *WT-1* (Wilm's tumor gene) расположен на хромосоме 3 и является опухолевым супрессором. Мутации *WT-1* ведут к развитию опухоли Вильмса у детей. *WT-1* высоко экспрессируется у 90% пациентов с ОМЛ (за исключением М5). По данным К. Inoue и соавт. [45], экспрессия *WT-1* в лейкемических клетках на 2—3 порядка выше, чем в клетках здорового костного мозга, где он либо не определяется, либо уровень экспрессии крайне низок. Опубликован целый ряд работ, посвященных детекции МОБ с использованием гена *WT-1*. Используя полуколичественную ПЦР, К. Inoue и соавт. [45] определили, что уровень экспрессии *WT-1* при ОМЛ гораздо выше у пациентов при первичной диагностике и в рецидиве, чем во время ремиссии. Более того, уровни экспрессии данного гена в течение ремиссии оказались прогностически значимыми для предсказания гематологического рецидива. С другой стороны, А. Gaiger и соавт. [46] с помощью количественной методики показали отсутствие прогностической значимости высокой экспрессии *WT-1* в ремиссии. Возможно, данное несоответствие связано с использованием методик, обладающих разной чувствительностью. Получены предварительные данные о применении РВ-ПЦР, позволяющие предполагать прогностическое значение уровня экспрессии *WT-1* в течение ремиссии ОМЛ. Однако для окончательных выводов опубликованного материала пока недостаточно [47, 48].

Таким образом, можно утверждать, что внедрение методов молекулярной биологии для детекции МОБ при ОМЛ в ряде случаев помогает не только прогнозировать дальнейшее течение болезни, но и корректировать проводимую терапию. Разумеется, требуется стандартизация методик, включая РВ-ПЦР, для правильной оценки полученных данных. Опубликованные недавно рекомендации Biomed Concerted Action по РВ-ПЦР помогут созданию унифицированных протоколов обследования больных в разных лабораториях и организации международных исследовательских групп, способных обследовать большое число пациентов и сделать определенные выводы о значении детекции МОБ при разных вариантах ОМЛ.

Л и т е р а т у р а

1. Westbrook C. The molecular basis of neoplasia. In: Hematology: basic principles and practice. R. Hoffmann (ed). Philadelphia, Elsevier Inc.; 2005. p. 941—52.
2. Tallman M.S., Nabhan C., Feusner J.H., Rowe J.M. Acute promyelocytic leukemia: Evolving therapeutic strategies. Blood 2002;99:759—72.
3. Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J. et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Eng J Med 2001;344:1031—7.
4. Schoh C., Haferlach T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. Curr Onc Rep 2002;4:390—7.
5. Rowley J.D. A new consistent chromosome abnormality in chronic myeloid leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining [letter]. Nature 1973;243:290—3.
6. Schnittger S., Kinkelin U., Schoh C. et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavourable subset of AML. Leukemia 2000;14:796—804.
7. Tiede C., Steudel C., Mohr B. et al. Analysis of FLT-3 activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB-subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 2002;99:4326—35.

8. Falini B., Nicoletti I., Martelli M. et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM-1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007;92(4):519—32.
9. Jepsen K. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 2000;102:753—63.
10. Lian R.J. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001;20:7204—15.
11. Chen Z. Fusion between novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- α locus due to variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *EMBO J* 1993;12:1161—7.
12. Nucifora G., Birn J., Erickson P. et al. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long term remission. *Blood* 1993;82:712—5.
13. Kusec R., Laczika K., Knob P. et al. AML/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of a patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 1994;8:73.
14. Leroy H., Roumier C., Huyghe P. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19(3):329—34.
15. Gale R.E., Hills R., Pizzey A.R. et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005;106(12):3768—76.
16. Johanson B., Mootman A.V., Secker-Walker L.M. Derivative chromosomes of 11q23 translocations in hematological malignancies. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 1998;12:828—33.
17. Falini B., Nicoletti I., Martelli M. et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+-AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007;109(3):874—85.
18. Grimwade D., Walker H., Oliver F. et al. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood* 1998;92:2322—33.
19. Leroy H., Roumier C., Huyghe P. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19(3):329—34.
20. Kusec R., Laczika K., Knob P. et al. AML/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of a patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 1994;8:735—9.
21. Liu Yin J.A., Toba K. Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemias: methodologies, clinical and biological significance. *Br J Haematol* 1999;106:578—90.
22. Kwong Y.L., Chan V., Wong K.F. et al. Use of polymerase chain reaction in the detection of AML1/ETO fusion transcript in t(8;21). *Cancer* 1995;75:821—5.
23. Satake N., Maseki N., Kozu T. et al. Disappearance of AML1/MTG8 (ETO) fusion transcript in acute myeloid leukemia patients with t(8;21) in long term remission. *Br J Haematol* 1995;91:892—8.
24. Morschauer F., Cayuela J.M., Martini S. et al. Evaluation of minimal residual disease using reverse transcriptase reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicentre study of 51 patients. *J Clin Oncol* 2000;18:788—94.
25. Toba K., Newton J., Nige S. et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000;95:815—9.
26. Wattjes M.P., Krauter J., Nige S. et al. Comparison of nested competitive RT PCR and real time RT PCR for the detection of AML MTG8 fusion transcript in t(8;21) positive AML. *Leukemia* 2000;14(2):329—35.
27. Krauter J., Wattjes M.P., Nige S. et al. Real time detection and quantitation of AML MTG8 fusion transcript in t(8;21) positive AML patients. *Br J Haematol* 1999;107:80—5.
28. Caxton D.F., Liu P., Hsu H.B. et al. Detection of fusion transcript generated by the inversion of 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994;83:750—6.
29. Poire J.M., Radford Weiss I., Rack K. et al. Detection of chromosome 16 CBFB/MYH11 transcript in myelomonocytic leukemia. *Blood* 1995;85:1313—22.
30. Marucci G., Galigiuri M.A., Dohner H. et al. Quantification of CBFB/MYH11 transcripts by real time PCR in patients with inv(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;15:1072—80.
31. Lo Coco F., Diverio D., Falini B. et al. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:12—22.
32. Mandelli F., Diverio D., Avvisati G. et al. Molecular remission in PML/RARA positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* 1997;90:1014—21.
33. Burnett K., Grimwade D., Solomon E. et al. Presenting white blood count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: results of the randomized MRC trial. *Blood* 1999;93:4131—43.
34. Diverio D., Rossi V., Avvisati G. et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase polymerase chain reaction of the PML/RARA fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter «AIDA» trial. *Blood* 1998;92:784—9.
35. Meloni G., Diverio D., Vignetti M. et al. Autologous bone marrow transplantation for acute promyelocytic leukemia in second remission: prognostic relevance of pretransplant minimal residual disease assessment by reverse transcriptase polymerase chain reaction of the PML/RARA fusion gene. *Blood* 1997;90:1321—5.
36. Grimwade D., Howe K., Langabeer S. et al. Minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by reverse transcriptase PCR: evaluation of PML/RARA and RARA/PML assessment in patients who ultimately relapsed. *Leukemia* 1996;10:61—6.
37. Tobal K., Liu Yin J.A. RT-PCR method with increased sensitivity shows persistence of PML/RARA transcripts in patients in long term remission of APL. *Leukemia* 1998;12:1349—54.
38. Tobal K., Moore H., Macheta M. et al. Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML/RARA transcripts with sensitive competitive RT PCR method. *Leukemia* 2001;15:1060—5.
39. Cassinat B., Zassadowski F., Balitrand N. et al. Quantification of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia with t(15;17) using real-time PCR. *Leukemia* 2000;14:324—8.
40. Mitterbauer A., Manhalter C., Jager U. et al. Quantification of minimal residual disease in patients with acute promyelocytic leukemia (APL) by real time quantitative PCR with specific fluorescent hybridization probes. *Blood* 2000;94(Suppl 1):313a.
41. Mitterbauer G., Zimmer C., Fonatsh C. et al. Monitoring of minimal residual disease in patients with MLL-AF9 positive acute myeloid leukemia by RT PCR. *Leukemia* 1999;13:519—24.
42. Mitterbauer G., Zimmer C., Pirc Danowinata H. et al. Monitoring of minimal residual disease in patients with MLL-AF6 positive acute myeloid leukemia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 2001;109:622—8.
43. Okoshi Y., Shimizu S., Kojima H. et al. Detection of minimal residual disease in patient having acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22) treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematologica* 2001;105:45—8.
44. Matsushita M., Ikeda H., Kizaki M. et al. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Br J Haematol* 2001;12:916—26.
45. Inoue K., Ogawa H., Yamagami T. et al. Long term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT-1 (Wilm's tumor gene) expression levels. *Blood* 1996;88:2267—78.
46. Gaiger A., Schmid D., Heinze G. et al. Detection of WT-1 transcript by RT PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:1886—9.
47. Kreuzer K.A., Saborowski A., Lupberger J. et al. Fluorescent 5'exonuclease assay for the absolute quantification of Wilm's tumor gene (WT-1) mRNA: implications for monitoring human leukemias. *Br J Haematol* 2001;14:313—8.
48. Kern W., Schoh C., Haferlach T., Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Clin Rev Oncol Hematol* 2005;56:283—309.