

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛНОСТЬЮ ТРАНСРЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ЦИТОЗИН-АРАБИНОЗИДА И СНИЖЕННЫХ ДОЗ АНТРАЦИКЛИНОВ

Е.В. Самочатова¹, Д.Д. Байдильдина^{1,2}, М.А. Масчан^{1,2}, Н.Н. Савва³, О.П. Хлебникова⁴,
А.В. Шамардина⁵, Ю.Е. Марейко³, Г.А. Цаур^{4,6}, Т.О. Ригер^{4,6}, М.М. Шнейдер¹,
Ю.В. Румянцева¹, Т.В. Наседкина⁷, Т.В. Савицкая³, А.А. Масчан^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии/онкологии и иммунологии; ²Российская детская клиническая больница, Москва; ³Республиканский научно-практический центр детской гематологии/онкологии, Минск, Республика Беларусь; ⁴Областная детская клиническая больница, отдел гематологии/онкологии, Екатеринбург; ⁵Областная детская клиническая больница, Нижний Новгород; ⁶ГУЗ СО Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург; ⁷НИИ молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория биочипов, Москва

Использование полностью трансретиновой кислоты (all-trans retinoic acid — ATRA) резко улучшило результаты терапии острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ). Высокая эффективность российского протокола ОПЛ-93—98 у 62 детей и подростков с ОПЛ (бессобытийная — БСВ и общая — ОВ выживаемость составили $84 \pm 5\%$ при частоте рецидивов 7%) была достигнута за счет применения высоких суммарных доз даунорубицина (495 мг/м^2) и разовых доз ATRA (45 мг/м^2). В связи с этим в протоколе ОПЛ-2003 сделана попытка уменьшить как острую, так и долгосрочную токсичность терапии за счет снижения суммарной дозы даунорубицина до 405 мг/м^2 и разовой дозы ATRA до 25 мг/м^2 при регулярном контроле минимальной резидуальной болезни с помощью молекулярного мониторинга специфического транскрипта PML/RAR α . Анализ результатов лечения 61 больного (возраст от 1,3 года до 17 лет; медиана — 11,3 года) показал, что, несмотря на уменьшение интенсивности протокола, эффективность терапии в целом не снизилась — БСВ и ОВ составили 79 ± 6 и $93 \pm 3\%$ соответственно. Достоверное влияние на прогноз вероятности развития рецидива имеет молекулярная резистентность, т.е. сохранение транскрипта PML/RAR α перед фазой поддерживающей терапии: вероятность рецидивирования в этой группе составляет 57%, тогда как различий по всем показателям эффективности между больными в зависимости от инициального лейкоцитоза нет. Всем 6 пациентам с рецидивами на протоколе ОПЛ-2003 проведена терапия триоксидом мышьяка и у всех получена не только клинико-гематологическая, но и молекулярная ремиссия, после достижения которой им были назначены миелоаблятивная терапия и аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Вторая ремиссия продолжается от 3 до 24 мес. Таким образом, снижение суммарной дозы антрациклинов и уменьшение дозы ATRA не ухудшили результатов терапии ОПЛ. Мониторинг минимальной резидуальной болезни перед началом поддерживающей терапии и в процессе ее проведения — обязательный компонент успешного лечения пациентов с ОПЛ. Триоксид мышьяка является эффективным препаратом для лечения рецидивов ОПЛ.

Ключевые слова: острый промиелоцитарный лейкоз, дети и подростки, рецидив, молекулярный мониторинг

EFFICIENCY OF THERAPY FOR ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA IN CHILDREN, BY USING ALL-TRANS RETINOIC ACID, ARA-C AND LOWER DOSES OF ANTHRACYCLINES

E.V. Samochatova¹, D.D. Baidildina^{1,2}, M.A. Maschan^{1,2}, N.N. Savva³, O.P. Khlebnikova⁴, A.V. Shamardina⁵, Yu.E. Mareiko³,
G.A. Tsaur^{4,6}, T.O. Riger^{4,6}, M.M. Shneider¹, Yu.V. Rumyantseva¹, T.V. Nasedkina⁷, T.V. Savitskaya³, A.A. Maschan^{1,2}

¹Federal Research Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow; ²Russian Children's Hospital, Moscow;

³Republican Centre for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus; ⁴Unit of Hematology and Oncology, Regional Children's Hospital, Yekaterinburg; ⁵Regional Children's Hospital, Nizhni Novgorod; ⁶Center of Specialized Health Cares «Institute of Medical Cellular Technologies», Yekaterinburg; ⁷Laboratory of Biochips, V.A. Engelgardt Research Institute of Molecular Biology, Moscow

The use of all-trans retinoic acid (ATRA) drastically improved the results of therapy for acute promyelocytic leukemia (APL). The high efficiency of the Russian protocol APL-93—98 applied to 62 children and adolescents with APL (event-free and overall survival (EFS and OS) were $84 \pm 5\%$ respectively with a relapse rate of 7%) was achieved, by administering the high cumulative dose of daunorubicin (495 mg/m^2) and single doses of ATRA (45 mg/m^2). In this connection, the APL-2003 protocol attempted to reduce both acute and chronic toxicity of the therapy, by decreasing the cumulative dose of daunorubicin to 405 mg/m^2 and the single dose of ATRA to 25 mg/m^2 under regular control of minimal residual disease via molecular monitoring of the specific transcript PML/RAR α . Analysis of the results of treatment in 61 patients aged 1.3 to 17 years (median 11.3) showed that despite of the reduced protocol intensity, the efficiency of therapy did not generally reduce — EFS and OS were 79 ± 6 and $93 \pm 3\%$, respectively. The likelihood of the development of a relapse was significantly affected by molecular resistance, i.e. the retention of the transcript PML/RAR α before a phase of maintenance therapy: the recurrence risk in this group was 57% whereas there were no differences in all cure rates between the patients depending on baseline leukocytosis. All 6 patients with relapses were treated with arsenic trioxide, resulting in not only clinical and hematological, but also molecular remissions; thereafter the patients received myeloablative therapy and autologous hemopoietic stem cell transplantation. The second remission lasted 3 to 24 months. Thus, reducing the cumulative dose of anthracyclines and the dose of ATRA did not make the results of the therapy for APL worse. The monitoring of minimal residual disease before and during maintenance therapy is a mandatory component of successful treatment in APL patients. Arsenic trioxide is an effective agent for the treatment of APL relapses.

Key words: acute promyelocytic leukemia, children, adolescents, recurrence, molecular monitoring

Одним из самых значимых событий в онкогематологии явилось открытие в конце XX в. возможности получения полной клинико-гематологической ремиссии у больных промиелоцитарным лейкозом (вариант М3 острого миелолейкоза — ОМЛ по Франко-Американо-Британской — ФАБ классификации) при использовании препарата с нецитотоксическим действием полностью трансретиноевой кислоты (all-trans retinoic acid — ATRA). Во многом благодаря эмпирическим успехам в лечении были расшифрованы патогенетические звенья развития заболевания и механизмы терапевтического действия ретиноидов на молекулярно-генетическом уровне [1, 2]. Проблема раннего выявления и лечения рецидивов острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) стала особенно актуальной только в последнее десятилетие, когда начало выздоравливать подавляющее большинство больных этим вариантом ОМЛ и стали очевидными особенности рецидивов ОПЛ на фоне комбинированной терапии ATRA и применения химиопрепаратов — их поздний характер и чувствительность к ATRA. Ранее, как и при рецидивах любых других форм ОМЛ, больные имели минимум шансов на успешное лечение. Открытие специфической хромосомной транслокации, расшифровка тонких молекулярных механизмов патогенеза ОПЛ и экстраординарная эффективность геннонаправленной дифференцировочной терапии поставили целый ряд задач, без решения которых дальнейший прогресс в лечении ОПЛ невозможен. Главными среди этих проблем, общих для заболеваний с уникальными молекулярными характеристиками, для которых существует таргетная терапия (например, хронический миелолейкоз — ХМЛ и иматиниб), являются изменения смысла, вкладываемого в понятия ремиссии, рефрактерности, рецидива и минимальной резидуальной болезни (МРБ) [3]. Соответственно, появилась необходимость переоценки значения традиционных факторов риска, а мониторинг МРБ и молекулярного рецидива (МР) быстро занял одно из центральных мест в оценке эффективности противолейкемической терапии.

До «эры ATRA» выживаемость взрослых больных ОПЛ, получавших лечение, не отличавшееся от терапии других форм ОМЛ, составляла 45—50% (данные группы БФМ, протокол AML 86) [4]. Исследование целесообразности включения ATRA в терапию ОПЛ, проведенное в 1991—1993 гг. Европейской группой (Франция, Бельгия, Швейцария, протокол APL 91), показало убедительное преимущество сочетанного применения цитостатической терапии (цитозин-арабинозид — АгаС и даунорубин «7+3») и ATRA: долгосрочная выживаемость составила 62% против 17% в группе пациентов, получавших только химиотерапию (ХТ) без ATRA, при кумулятивном риске развития рецидива (cumulative incidence of relapse — CIR) 32% против 78% [5]. В последующие 10 лет исследования, предпринятые несколькими кооперативными группами, позволили настолько оптимизировать принципы комбинированной терапии, что результаты долгосрочной выживаемости достигли 80—90%, а CIR снизился до 4—18% [6]. На основании простейших показателей инициальной гемограммы — лейкоцитоза и тромбоцитоза — были выделены группы прогностического риска. Позднее оказалось, что для прогноза риска реци-

вирования при ОПЛ первостепенное значение имеет контроль состояния ремиссии в процессе терапии на молекулярно-генетическом уровне при определении специфического для лейкоэмических клеток транскрипта *PML/RARα* [7].

При выполнении протоколов лечения ОПЛ с ATRA, состоящих из курса индукции ремиссии и нескольких курсов консолидации, всегда включающих антрациклины (даунорубин, митоксантрон или идарубин) ± АгаС (в некоторых протоколах в высоких дозах) в комплексе с продолжительным приемом ATRA, гематологическая, равно как и полная цитогенетическая ремиссия, констатируются уже после индукции практически у 100% больных. В то же время молекулярно-генетическая ремиссия (т.е. отсутствие транскрипта *PML/RARα*) регистрируется у половины пациентов после 1-го курса консолидации, а у остальных — только после 2-го курса постремиссионной терапии [8]. Показано, что персистенция транскрипта после 3-го курса терапии с ATRA и ХТ с применением антрациклинов в высокой суммарной дозе (495—650 мг/м² в пересчете на даунорубин), т.е. через 75—90 дней от начала терапии, позволяет прогнозировать риск рецидива у взрослых больных ОПЛ с вероятностью 60—80% независимо от того, к какой группе риска пациент был отнесен в дебюте заболевания [9]. Соответственно, тактика дальнейшего лечения и наблюдения больного должна планироваться в зависимости от показателя МРБ в данной точке протокола.

Благодаря регулярному молекулярно-генетическому контролю в процессе длительного наблюдения больных ОПЛ в ремиссии после терапии с ATRA было открыто явление МР. В подавляющем большинстве случаев при как минимум двукратном обнаружении специфического транскрипта при исследовании костного мозга (КМ) больного ОПЛ, до этого находившегося в молекулярной ремиссии, через 1—4 мес развивается гематологический рецидив. Исследования с историческим контролем показывают, что лечение МР дает лучшие результаты, чем терапия развернутого гематологического рецидива не в последнюю очередь потому, что пациент с МР находится в хорошем соматическом состоянии, без коагулопатии, инфекций и т.д. [10]. Рекомендации по срокам проведения контрольных анализов для выявления транскрипта *PML/RARα* в КМ в ремиссии и длительности наблюдения больных ОПЛ после завершения терапии разноречивы и в качестве методических рекомендаций не сформулированы. Также не существует и однозначных научно обоснованных рекомендаций по терапии МР, равно как абсолютной неизвестности и объем терапии МР и гематологического рецидива ОПЛ. Особенностью рецидивов ОПЛ при современной терапии являются поздние сроки их развития. Если раньше, как и другие рецидивы ОМЛ, они развивались в течение 1-го года ремиссии, то теперь это, как правило, конец 2-го года и позже, после отмены поддерживающего лечения; до 10% рецидивов регистрируются более чем через 2 года (до 10 лет) после констатации ремиссии [11]. Нередки экстрамедуллярные локализации рецидива с поражением центральной нервной системы, кожи и подкожной клетчатки, чего почти никогда не случалось при терапии без ATRA.

Представленные данные касаются взрослых пациентов. Тактика терапии ОПЛ, включая рецидивы, у детей и подростков не получила пока должного освещения.

Многоцентровое исследование эффективности и токсичности протокола терапии ОПЛ у детей и подростков с включением АТРА с проспективной оценкой результатов проводится в России и Беларуси в течение более 14 лет [12]. В данной публикации представлены результаты протоколов ОПЛ-93—98 и ОПЛ-2003 для детей и подростков с акцентом на анализ частоты, тактики и результатов лечения рецидивов ОПЛ с учетом факторов риска.

Материалы и методы

Впервые протокол для лечения детей и подростков с ОПЛ на основе Европейских протоколов APL 91 и APL 93 был разработан в НИИ детской гематологии МЗ РФ в 1993 г. [13]; в 1998 г. протокол модифицирован посредством добавления курсов АТРА в поддерживающую терапию. Дозы, режим введения препаратов и результаты терапии не отличались в версиях ОПЛ-93 и 98, что позволило объединить их результаты (протокол ОПЛ-93—98) [14]. АТРА (Весаноид, «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.») в дозе 45 мг/м² больные начинали принимать немедленно по установлении диагноза до достижения полной продолжительной ремиссии (ППР). Первый курс постремиссионной ХТ «7+3» проводился без АТРА, а курс интенсификации (АгаС в дозе 1 г/м² и даунорубицин) сочетался с 2-недельным приемом АТРА. Курсы АТРА в дозе 25 мг/м²/сут длительностью 2 нед проводились каждые 3 мес на первом году поддерживающей терапии 6-меркаптопурином (6-МП) и метотрексатом (версия ОПЛ-98). Суммарная доза даунорубицина составляла 495 мг/м² [12, 13]. В целях уменьшения токсичности терапии при сохранении высокой эффективности для лечения детей и подростков был предложен протокол ОПЛ-2003, где использовались основные элементы предшествующего протокола — общее построение, число и состав курсов ХТ. Принципиальным было снижение суммарной дозы даунорубицина до 405 мг/м² за счет уменьшения разовой дозы в курсах консолидации и интенсификации до 45 и 30 мг/м² соответственно при неизменной дозе 60 мг/м² в индукции. Дозировка

АТРА во всех курсах была также уменьшена до 25 мг/м²/сут [13,14]. Стержнем исследования был мониторинг МРБ, осуществлявшийся с помощью молекулярного транскрипта *PML/RARα* в КМ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) как во время проведения интенсивной фазы протокола, так и в ходе поддерживающей терапии [15].

Оба протокола выполнялись больным с диагнозом ОПЛ в рамках многоцентрового проспективного исследования в детских специализированных клиниках гематологии/онкологии России и Республики Беларусь (прил. 1) в период с декабря 1994 г. по декабрь 2007 г. Всего зарегистрировано более 130 пациентов, из анализа исключены 13 случаев вследствие ошибки в диагнозе, несоответствия определением протокола и нарушений его проведения, не обусловленных медицинскими показаниями. В протокол ОПЛ-93—98 вошли 66 больных, в анализ включены 62; в протокол ОПЛ-2003 — 70 и 61 соответственно. Анализ результатов обоих исследований сделан по данным, полученным на 01.09.2008 г.

Диагностика заболевания включала морфоцитохимическую оценку клеток КМ согласно критериям ФАБ-классификации [1] и подтверждение диагноза при демонстрации транслокации t(15;17) при стандартном кариотипировании и/или обнаружении РНК *PML/RARα* методом гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТПЦР) [16]. Лаборатории, где проводились диагностические исследования, указаны в прил. 2. С 2000 г. большинству пациентов, за исключением больных из Минска и Уральского региона, проводили молекулярный мониторинг транскрипта на биочипах, порог чувствительности метода составляет 10⁻⁴ (см. прил. 2). У 1 больного в 2 независимых лабораториях не выявлены характерные для ОПЛ транслокации t(15;17) и t(11;17) и транскрипт *PML/RARα*, при том, что лейкоэмические клетки имели типичные морфологические и цитохимические признаки, а данные гемограммы и характерная коагулопатия подтверждали МЗ-вариант ОМЛ. Поскольку терапия в данном случае была изменена посредством добавления дополнительных курсов поли-ХТ (ПХТ) с высокодозовым цитозаром и вепезидом, пациент был исключен из анализа

эффективности обсуждаемого протокола. Ретроспективно всех больных, включенных в анализ, разделили на группы низкого, высокого и очень высокого риска на основании показателя инициального числа лейкоцитов крови и динамики исследования транскрипта *PML/RARα* в КМ. Группу низкого риска составили пациенты с инициальным лейкоцитозом ≤10 000/мкл и отсутствием транскрипта перед началом поддерживающей терапии; группу высокого риска — больные с лейкоцитозом >10 000/мкл и отсутствием транскрипта. К группе очень высокого риска отнесены пациенты с позитивным анализом на транскрипт после 3-го курса терапии независимо от других пока-

Таблица 1. Характеристика больных ОПЛ, получавших терапию по протоколам ОПЛ-93—98 и ОПЛ-2003

Характеристика	ОПЛ-93—98	ОПЛ-2003
Продолжительность наблюдения, годы (медиана)	7,9 (1,9—13,7)	2,6 (0,9—5,5)
Число больных		
Зарегистрировано	66	70
Исключены из анализа:	4	9
— смерть до лечения	2	7
— несоответствие протоколу	2	2
Включены в исследование	62	61
Возраст, годы (медиана)	10,3 (1—19)	11,3 (1,3—18)
Пол, мальчики/девочки	32/30	35/26
Лейкоциты		
≤10 000/мкл	39	48
10 000—50 000/мкл	18	9
>50 000/мкл	5	4

зателей. Результаты мониторинга транскрипта получены у 67 пациентов.

Характеристика больных и результаты лечения по двум протоколам с учетом группы риска представлены в табл. 1 и 2. Результаты терапии — БСВ и ОВ — оценены по методу Каплана — Майера [17]. Для сравнения кривых выживаемости использовался непараметрический log-rank-критерий. Оценку CIR проводили согласно методике J. Kalbfleisch, R. Prentice с помощью специальной программы R. Для сравнения рисков использовали метод Грея [18, 19]. Данные о больных с развившимся рецидивом, тактика и результаты их терапии представлены в табл. 3.

Гематологическая ремиссия констатировалась при нормализации гемограммы и редукции содержания лейкоэмических промиелоцитов в миелограмме до <5%; молекулярная ремиссия — при наличии критериев гематологической ремиссии и отсутствии транскрипта *PML/RARα* в КМ. Гематологический рецидив считался документированным при появлении любого количества атипичных промиелоцитов в периферической крови или >20% в миелограмме или выявлении >5% атипичных промиелоцитов в миелограмме при молекулярно-биологическом подтверждении на основании ПЦР. Критериями МР было двукратное выявление транскрипта *PML/RARα* в КМ (с интервалом 2–3 нед) после получения отрицательных результатов у больного в состоянии клинко-гематологической ремиссии при проведении ПЦР-диагностики мето-

дом, аналогичным используемому при инициальной верификации диагноза.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Access, GraphPad Prism 5.0, STATISTICA 6.0. Оценивался уровень достоверности *p*, различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05.

Результаты

Протокол ОПЛ-93—98. Из 62 больных, включенных в анализ, было 32 мальчика и 30 девочек в возрасте от 1 года до 19 лет (медиана — 10,3 года). Группу низкого риска составили 39 (63%) больных, группу высокого риска 23 (37%), из них с лейкоцитозом >50 000/мкл — 5 (8%) пациентов. Цитогенетическое и/или молекулярно-биологическое подтверждение варианта М3 с обнаружением t(15;17) и/или транскрипта *PML/RARα* сделано у 60 (97%) человек.

Мониторинг транскрипта на этом протоколе проводился 29 больным нерегулярно и часто бессистемно, статус минимальной остаточной болезни перед началом поддерживающей терапии известен лишь в 15 случаях. Позитивный результат получен в 4 наблюдениях, все эти пациенты находятся в состоянии ремиссии на протяжении >6 лет. Эти данные не позволяют объективно определить больных очень высокого риска и оценить значение этого показателя при лечении по протоколу ОПЛ-93—98. При этом в 11 случаях в процессе мониторинга после отрицательных результатов молекулярного анализа был выявлен транс-

Таблица 2. Результаты терапии больных ОПЛ по протоколам ОПЛ-93—98 и ОПЛ-2003

Показатель	ОПЛ-93—98			ОПЛ-2003		
	низкий	высокий	очень высокий	низкий	высокий	очень высокий
Всего больных в анализе	39	62 23	Н.д.	43	61 11	7
Смерть в индукции	2	2	Н.д.	2	2	0
СРК		6			0	
Достижение гематологической ремиссии	37	21	Н.д.	41	11	7
Смерть в ремиссии	0	2	Н.д.	1	1	0
Потеряны из-под наблюдения	1	0	0	0	0	0
Наличие транскрипта <i>PML/RAR</i> перед поддерживающей терапией	Н.д.	Н.д.	Н.д.	5	2	7
Рецидив гематологический (%)	2	2	Н.д.	1 (+2)* (2,4)	1 (+2)* (9)	4 (57)
Рецидив гематологический + экстрамедуллярный	Нет	Нет	Нет	Нет	2*	2
Достижение 2-й ремиссии	1	1	Н.д.	1 (+2)*	1 (+2)*	4
Живы в 1-й ремиссии (%)	34 (87)	17 (74)	Н.д.	39 (91)	9(72,7)	3 (43)
Живы во 2-й ремиссии	0	0	Н.д.	1	1	4
БСВ, %		84±5 <i>p</i> =0,68			79±6	
ОВ, %		84±5 <i>p</i> =0,21			93±3	

Примечание. СРК — синдром ретиновой кислоты; БСВ — бессобытийная выживаемость; ОВ — общая выживаемость. Н.д. — нет данных. *Больные, инициально отнесенные в группу риска по числу лейкоцитов крови, затем по выявлении транскрипта перед поддерживающей терапией перенесенные в группу очень высокого риска.

Таблица 3. Рецидивы ОПЛ: протоколы ОПЛ-93—98 и ОПЛ-2003 в сравнении с результатами протоколов Еврогруппы APL-91, 93 и 2000

Показатель	ОПЛ-93—98			Всего	ОПЛ-2003			APL-91	APL-93	APL-2000	
	Всего	Группа риска низкий	высокий		низкий	высокий	очень высокий			Л< 10 000/ мкл	Л> 10 000/ мкл
Включено пациентов	62	37	21	61	43	11	7	54	576	95	74
Срок наблюдения, мес	36—144			7—40					153	24	24
Рецидивы, абс. число (%)	4 (6,9)	2 (5)	2 (9)	6 (10,6)	1 (2,5)	1 (11)	4 (57)	20 (31)	80 (13,4)	8 (8,5)	5 (7)
Сроки от начала лечения, мес	11—28			3—36			23	9	3—36		
Даунорубицин, суммарная доза, мг/м²	495			405				495	495	495	495
Лечение рецидива:											
ПХТ + ATRA	4			0				20	+	+/-	+/-
ПХТ + ATRA+ АТО	0			6				0	+/-	+/-	+/-
ПХТ+ATRA + АТО+ ГО	0			4				—	—	+/-	+/-
+ ауто-ТГСК	0			6							
+ облучение локальных инфильтратов	0			2			2	0	0	0	0
2-я ремиссия	2			6			1	1	4		
Живы	0			6			1	1	4		
БСВ, %	84±5			79±5				63	76,3	82,2	
ОВ, %	84±5			93±3				76	85	91,5	

Примечание. АТО — триоксид мышьяка (асадин) 0,15 мг/кг внутривенно; ГО — гемтузумаба озогомицин (миелотарг); ауто-ТГСК — аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; Л — лейкоциты.

крипт, как правило, в низком титре — однократно и даже повторно, не только в процессе лечения, но и после его отмены. Развития гематологического рецидива не зафиксировано ни в одном из этих случаев в течение уже более 5 лет.

В процессе лечения СРК развился у 6 пациентов, в 2 случаях — с летальным исходом. Всего от осложнений в процессе индукционного курса протокола умерли 4 больных, ремиссия достигнута у 58 (93,5%) детей. В состоянии гематологической ремиссии от инфекционных осложнений умерли 2 пациента. Случаев рефрактерности ОПЛ не зафиксировано.

Рецидив (во всех случаях КМ) развился у 4 больных в сроки от 12 до 29 мес с момента констатации ремиссии. Еще у 1 пациента с врожденным гидронефрозом почки и хронической почечной недостаточностью, вследствие чего терапия была изменена за счет снижения дозирования даунорубицина в индукции и исключения высокодозового цитозара из 3-го курса ХТ, в процессе молекулярно-генетического мониторинга на 32-м месяце ремиссии после негативных анализов повторно выявлен транскрипт *PML/RARα* в нарастающем титре и констатирован МР. По решению лечащего врача больному проведена терапия рецидива: курс «7+3» + ATRA (дозы аналогичны курсу индукции протокола ОПЛ-93—98) с достижением повторной молекулярной ремиссии, затем полностью повторена поддерживающая терапия согласно протоколу; к моменту анализа ремиссия продолжается >5 лет. Больной определен как получивший непрограммную терапию.

Из 4 пациентов, у которых развились рецидивы при терапии по протоколу ОПЛ-93—98, 2 относятся

к группе высокого и 2 — низкого риска. Все больные с гематологическим рецидивом умерли: 2 — от прогрессии заболевания, не достигнув повторной ремиссии, в 2 других случаях была получена краткосрочная ремиссия. У одного ребенка, получившего курс FLAG (флу-дарабин, цитарабин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) с ATRA, через 4 мес развился повторный рецидив, лечение которого было неэффективным; второй больной умер от сердечной недостаточности во 2-й ремиссии после повторения интенсивной фазы протокола ОПЛ-93 на этапе поддерживающей терапии; суммарная доза антрациклинов (даунорубицин + митоксантрон) составила 990 мг/м² в пересчете на даунорубицин. Характеристика рецидивов и их лечение представлены в табл. 3.

На 01.09.2008 г. (медиана наблюдения — 7,9 года) ремиссия продолжается у 51 пациента, БСВ и ОВ составили 84±5% при частоте рецидивов 6,5% (рис. 1). Из 37 больных группы низкого риска, достигших ремиссии, при лечении по протоколу ОПЛ-93—98 рецидивировали 2 (5,4%), из 21 человека группы высокого риска — также 2 (9,5%), исследования транскрипта перед поддерживающей терапией у этих больных не проводились (рис. 2). 5-летний CIR составил 0,05±0,003 — низкий риск и 0,12±0,012 — высокий риск (рис. 3).

Протокол ОПЛ-2003. На 01.01.2008 г. терапию по данному протоколу получил 61 человек (35 мальчиков и 26 девочек) в возрасте от 1,3 года до 18 лет (медиана — 11,3 года). На основании инициальной гемогаммы 48 (79%) больных отнесены к группе низкого, 13 — высокого риска развития рецидива; пациентов

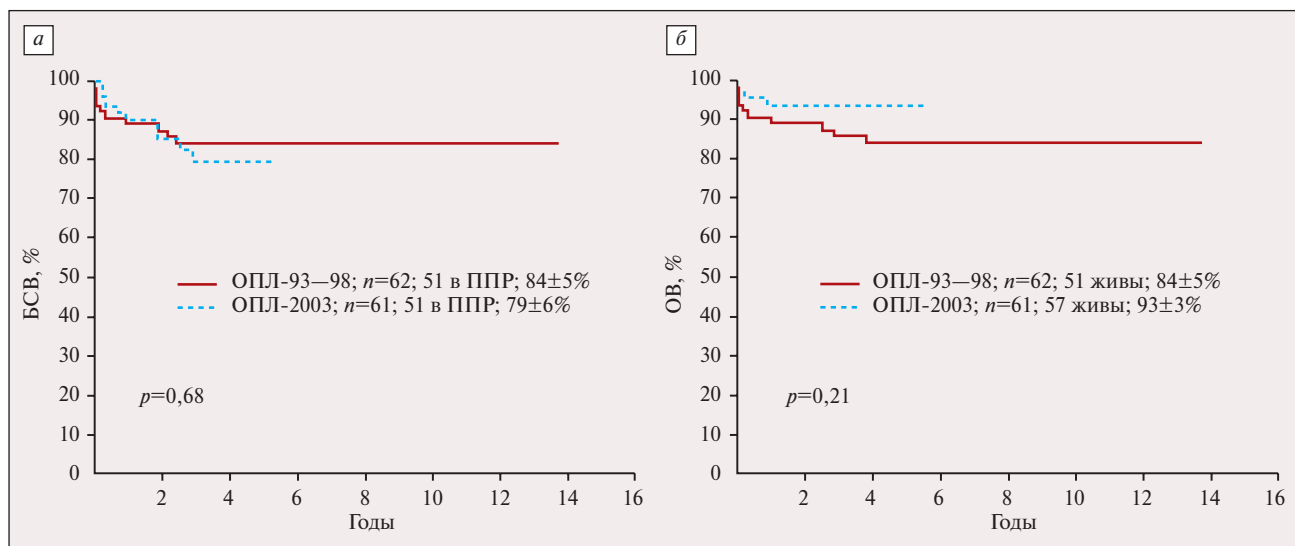


Рис. 1. Выживаемость пациентов с ОПЛ в зависимости от протокола терапии: а — БСВ; б — ОВ

с лейкоцитами крови $>50\ 000/\text{мкл}$ было 4 (7%). Молекулярный мониторинг транскрипта проводился в 38 (67,2%) случаях; у 7 больных перед началом поддерживающего лечения был выявлен транскрипт *PML/RAR α* , 5 из них изначально были в группе низкого риска, 2 — высокого; эти больные составили группу очень высокого риска рецидива. Характеристика пациентов и результаты их терапии представлены в табл. 1 и 2.

В ранние сроки лечения — в процессе индукции ремиссии — умерли 2 пациента, оба от инфекционных осложнений. Случаев тяжелого СРК не зафиксировано. Резистентных к лечению пациентов не выявлено, за исключением случаев длительной персистенции молекулярного транскрипта при исследовании КМ, что, по сути, можно определить как молекулярную резистентность. Гематологическая ремиссия была получена у 59 (96,7%) больных. 2 пациента умерли после достижения ремиссии: в одном случае — после осложнений, обусловленных высокими дозами АгаС, в другом — от гриппа на этапе поддерживающей терапии.

У 6 из 59 больных через 3—34 (медиана — 21,8) мес после достижения ремиссии развились рецидивы, что составляет 9,8% при сроках наблюдения от 2 до 67 (медиана — 31,2) мес (см. табл. 3). 3 из этих больных принадлежали к группе низкого и 3 высокого риска. У 2 пациентов из каждой группы перед началом поддерживающей терапии молекулярная ремиссия не достигнута. Всем больным с рецидивом проведена терапия на основе триоксида мышьяка с АТРА в различных сочетаниях с цитостатиками, в основном цитозаром, 5 пациентов дополнительно получали антрациклины. У 5 больных использовали гемтузумаб озогамидин (Милотарг, «Вайет», США). Всем 6 пациентам после достижения молекулярной ремиссии выполнена ауто-ТГСК; во всех случаях, по данным ПЦР, трансплантат не был «контаминирован» резидуальными лейкоэмическими клетками.

У 1 больного из группы очень высокого риска за несколько месяцев до КМ рецидива возникли подкожные инфильтраты, лейкоэмическая природа которых была впоследствии доказана гистологически, вследст-

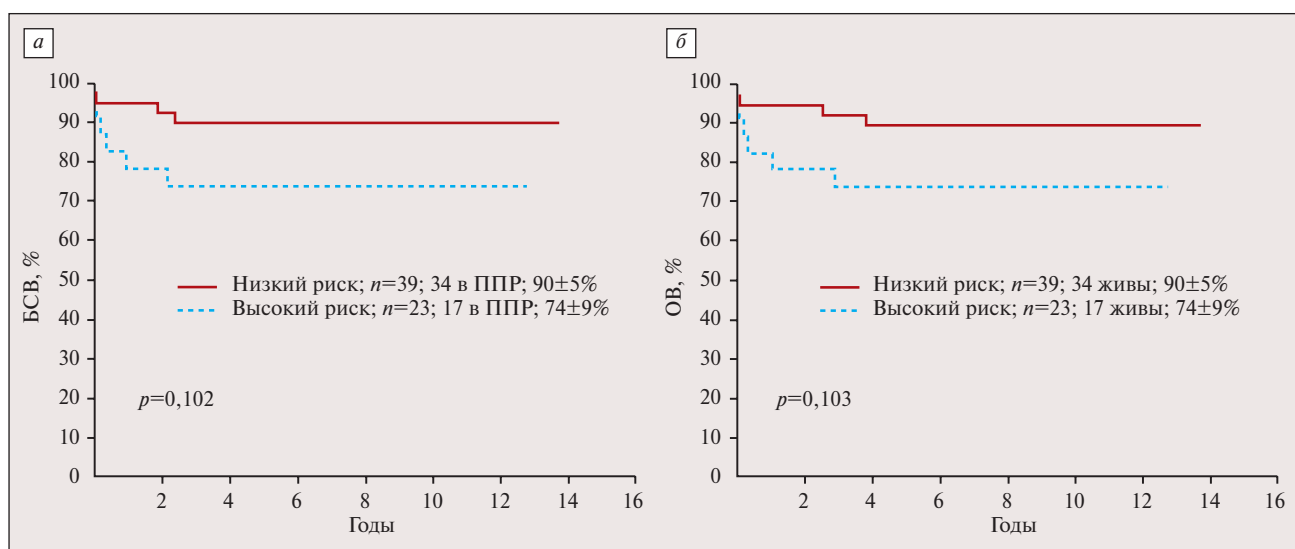


Рис. 2. Выживаемость пациентов с ОПЛ на протоколе ОПЛ-93—98 в зависимости от группы риска: а — БСВ; б — ОВ

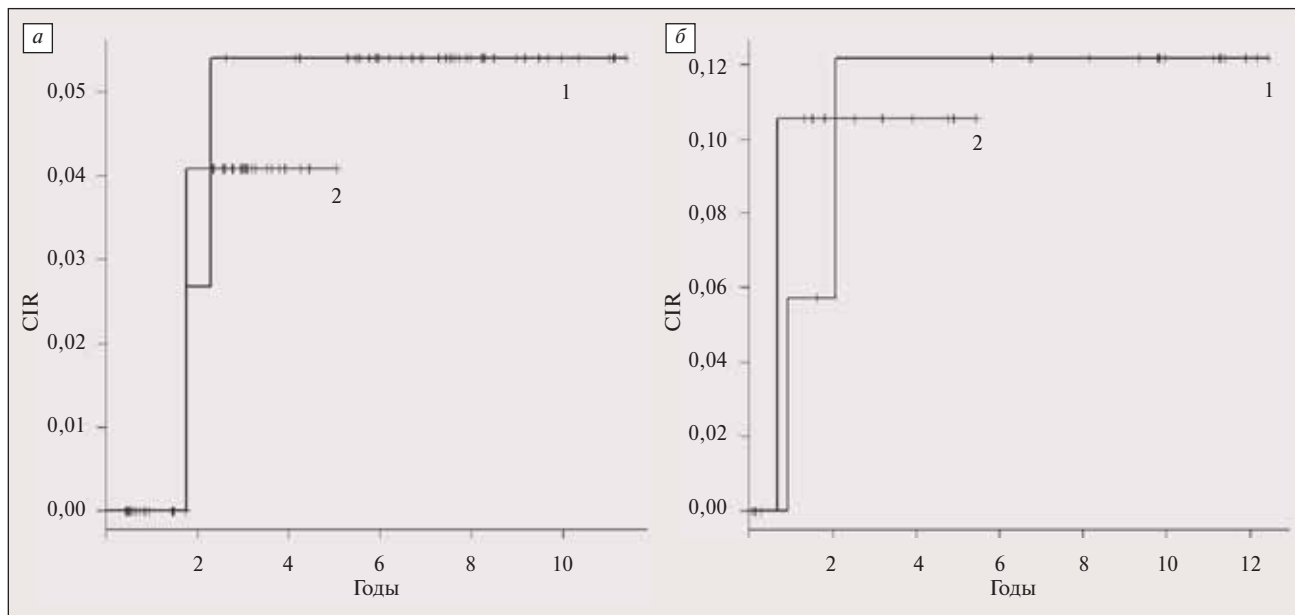


Рис. 3. 5-летний CIR рецидивов у пациентов с ОПЛ различных групп риска в зависимости от протокола терапии: а — пациенты группы низкого риска (в скобках 95% доверительный интервал — ДИ): 1) ОПЛ-93—98: $n=37$, без рецидива 35, $\text{hazard} = 0,05 (-0,02—0,13)$; 2) ОПЛ-2003: $n=41$, без рецидива 40; $\text{hazard} = 0,04 (-0,02—0,10)$; б — пациенты группы высокого риска (в скобках 95% ДИ): 1) ОПЛ-93—98: $n=21$, без рецидива 19; $\text{hazard} = 0,12 (-0,02—0,29)$; 2) ОПЛ-2003: $n=11$, без рецидива 10; $\text{hazard} = 0,11 (-0,07—0,32)$

вие чего после достижения клинико-гематологической и молекулярной ремиссии, но до проведения ТГСК ему было выполнено тотальное облучение кожи электронами в суммарной дозе 15 Гр. У другого пациента, также из группы очень высокого риска, при гематологической ремиссии в КМ в процессе проведения 3-го курса ПХТ развилась массивная инфильтрация кожи волосистой части головы, в клетках которой был обнаружен транскрипт *PML/RAR α* , на основании чего констатирован экстрамедуллярный рецидив. Молекулярная ремиссия достигнута в результате интенсивной противорецидивной терапии, включая 3 курса триоксида мышьяка и 2 введения гемтузумаба озогамидина (6 мг/м^2); после повторного появления инфильтратов в той же области больному локально проведен курс лучевой терапии электронным пучком (суммарная доза 30 Гр) и выполнена ауто-ТГСК.

В целом на момент анализа вторая клинико-гематологическая и молекулярная ремиссия продолжается от 3 до 29 мес у всех 6 рецидивировавших пациентов.

У 2 больных, достигших молекулярной ремиссии, отмечено однократное появление транскрипта с повторной спонтанной негативизацией. У обоих этих пациента не выявлен рецидив в течение >10 мес.

На 01.09.2008 г. (медиана наблюдения — 2,6 года) первая ремиссия продолжалась у 51 больного, БСВ составила $79 \pm 6\%$, ОВ — $93 \pm 3\%$; частота рецидивов — 10,3%. Из 43 больных группы низкого риска рецидив возник у 1 (2,3%) пациента, из 11 человек группы высокого риска — также у 1 (9,1%), из 7 больных очень высокого риска — у 4 (57,1%). 5-летний CIR составил $0,04 \pm 0,004$ — низкий риск и $0,11 \pm 0,015$ — высокий риск (см. рис. 3; рис. 4).

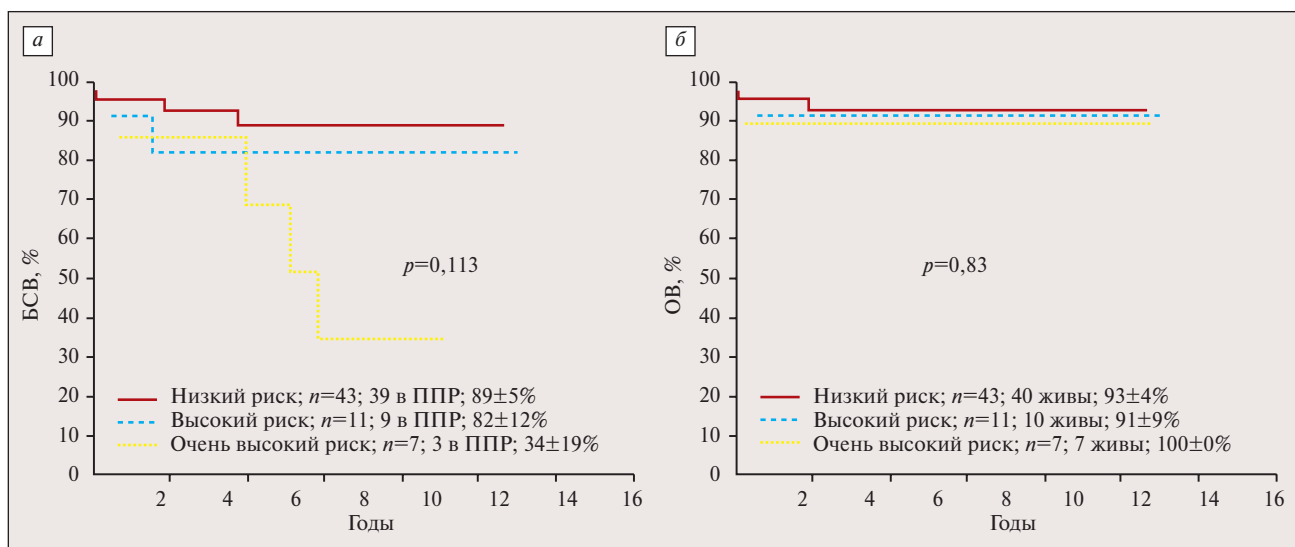


Рис. 4. Выживаемость пациентов с ОПЛ на протоколе ОПЛ-2003 в зависимости от группы риска: а — БСВ; б — ОВ

Таким образом, при одинаковом числе больных, получивших лечение по протоколам ОПЛ-93—98 или ОПЛ-2003, значимых отличий по возрастным и половым показателям не было. Больные низкого и высокого риска составили 63 и 37% против 79 и 21%, с лейкоцитами $>50\ 000/\text{мкл}$ — 8 и 4% на протоколах ОПЛ-93—98 и ОПЛ-2003 соответственно. Показатели эффективности терапии не имеют достоверных отличий: БСВ и ОВ составили в протоколах ОПЛ-93—98 и ОПЛ-2003 $84\pm5\%$ против $79\pm6\%$ ($p=0,68$) и $84\pm5\%$ против $93\pm3\%$ ($p=0,21$), см. рис. 1. При оценке этих показателей в зависимости от факторов риска (см. рис. 2, 4) становится очевидным значение молекулярного мониторинга: по результатам обоих протоколов не обнаружено достоверных различий прогноза у больных низкой и высокой групп риска в зависимости от инициального лейкоцитоза — притом что систематического контроля транскрипта на протоколе ОПЛ-93—98 не было. При анализе результатов протокола ОПЛ-2003 выявлены достоверно значимые различия больных группы очень высокого риска против всех остальных пациентов (как низкой, так и высокой групп риска) по показателю безрецидивной выживаемости: БРВ составляет 96 ± 4 , 90 ± 9 и $34\pm19\%$ соответственно ($p=0,0007$).

Обсуждение

Факторами, определяющими вероятность выздоровления у больных с гемопозитическими опухолями, являясь чувствительность (резистентность) к проводимой терапии, частота и тяжесть осложнений и побочных явлений при ее выполнении, частота развития рецидивов и возможность достижения повторной ремиссии. Включение АТРА в программы лечения ОПЛ снизило частоту первичной резистентности практически до нуля, при этом летальность, вызванная токсичностью терапии, составляет, при грамотно спланированной сопроводительной терапии, не более 5%. Так, по данным Европейского протокола APL-2000, результаты терапии больных ОПЛ с высоким инициальным лейкоцитозом достоверно улучшились вследствие снижения развития СРК при профилактическом использовании дексаметазона [20].

Основной задачей протокола лечения детей и подростков ОПЛ-93—98 было исследование эффективности применения АТРА в комбинации с антрациклинами и АгаС, оценка токсичности этой терапии, а также отработка деталей современной технологии диагностики и лечения этого особого варианта ОМЛ в условиях многопрофильных детских больниц.

В течение 7 лет многоцентровой работы по протоколу с использованием молекулярно-генетической диагностики получены вполне удовлетворительные показатели БСВ и ОВ больных ОПЛ этой возрастной группы, несмотря на выборочный характер молекулярного контроля эффективности терапии. Хотя в целом токсичность протокола можно определить как приемлемую, летальность вследствие развития СРК и высокая, потенциально кардиотоксичная доза антрациклинов явились основанием для попытки разработки протокола с меньшей токсичностью. В большинстве современных протоколов хорошие показатели излечения ОПЛ получены при использовании высоких доз антрациклинов: от $495\ \text{мг}/\text{м}^2$ в Европейских протоколах 1993 и 2000 гг. до 650 (испанский протокол Pethema 99

и итальянский AIDA) и $815\ \text{мг}/\text{м}^2$ в протоколе M.D. Anderson, США [9]. Такие кумулятивные дозы антрациклинов сопряжены с высоким риском отсроченной кардиотоксичности, что особенно важно у детей, которые, выздоравливая от злокачественных заболеваний, не должны страдать от побочных эффектов терапии. Хотя кардиотоксичность антрациклинов и является дозозависимой, «безопасной» дозы антрациклинов не существует, что делает актуальной проблему снижения их суммарных дозировок.

В исследовании 2003 г. сохранены прежний дизайн и использованы те же препараты, однако суммарная доза антрациклинов была значимо (на $90\ \text{мг}/\text{м}^2$) редуцирована, снижена до $25\ \text{мг}/\text{м}^2$ и суточная дозировка АТРА. Несмотря на такую дезэскалацию терапии, эффективность протокола ОПЛ-2003 оказалась сопоставимой с результатами предыдущего протокола и соответствует данным публикуемых международных исследований.

В последние годы была показана возможность объективно прогнозировать эффективность проводимой терапии ОПЛ. На основании оценки некоторых клинических показателей и результатов молекулярно-генетического контроля специфического для ОПЛ транскрипта в клетках КМ выделены факторы риска, наиболее значимыми из которых являются инициальный уровень лейкоцитов и достижение молекулярной ремиссии к началу поддерживающей терапии. Наиболее важно то, что персистенция молекулярного транскрипта после трех курсов цитозар + антрациклины + АТРА ассоциирована с высоким риском рецидива (57%), несмотря на то, что у всех 7 пациентов на фоне проведения поддерживающей терапии 6-МП, метотрексатом и АТРА молекулярная ремиссия все же была достигнута.

Очевидно, что пациентам группы очень высокого риска необходимо своевременно модифицировать терапию. На наш взгляд, наилучшим вариантом представляется применение триоксида мышьяка — препарата, высокоэффективного в лечении рецидивов ОПЛ с отличным от АТРА механизмом действия. Немаловажным обстоятельством является и отсутствие влияния на сократимость миокарда, присущее антрациклинам, а также многообразной токсичности, свойственной миелоаблативной ХТ. К сожалению, препараты триоксида мышьяка в России недоступны.

Учитывая значимость молекулярно-генетического анализа для диагностики и последующей коррекции терапии ОПЛ, их выполнение должно стать стандартом во всех клиниках, где лечат больных лейкозами. Подавляющему большинству пациентов на протоколе ОПЛ-2003 оно было проведено, однако мониторинг осуществлялся нерегулярно, и, к сожалению, у части больных отсутствовали молекулярно-генетические данные именно в той «точке» протокола, которая имеет важнейшее значение для прогноза — перед началом поддерживающей терапии. Следует отметить, что, несмотря на то что используемые в разных лабораториях различные методики определения МРБ чреваты ложноположительными результатами и, соответственно, неоправданной эскалацией терапии, в нашем исследовании молекулярная резистентность являлась высокочувствительным «предиктором» гематологического ре-

цидива независимо от лаборатории, где проводилось исследование.

В то же время однократное появление молекулярного транскрипта на фоне поддерживающей терапии, а также после ее окончания, по-видимому, не имеет такого драматического значения, поскольку 13 пациентов, у которых при выполнении мониторинга выявлялся транскрипт, остаются в ремиссии уже >5 лет без какой-либо терапии. В связи с этим проблема стандартизации чувствительности молекулярно-генетических методов, использующихся для принятия решения вопроса о коррекции терапии, является критической. Терапия же гематологических рецидивов у пациентов, получивших лечение по протоколу ОПЛ-93—98, не имела успеха, все больные умерли.

При анализе результатов терапии по протоколу ОПЛ-2003 можно заключить, что снижение суммарной дозы антрациклинов и дозы ATRA не ухудшило показателей БРВ у больных независимо от группы инициального риска. Среди причин неудач терапии пациентов с ОПЛ основной, помимо рецидивов, является летальность в первые дни госпитализации от геморрагических осложнений. Как правило, ранняя летальность ассоциирована с высоким инициальным лейкоцитозом: из 9 умерших детей, не успевших начать полноценное лечение, у 4 уровень лейкоцитов превышал 100 000/мкл; еще 4 пациента умерли от кровоизлияния в мозг, не получая должной трансфу-

зионной терапии. Остающаяся высокой ранняя летальность, составляя около 10%, свидетельствует не о недостаточной эффективности противолейкемической терапии, а о позднем поступлении пациентов и низком качестве сопроводительной терапии.

На основании имеющихся данных можно сделать следующие заключения по тактике и стратегии улучшения результатов терапии ОПЛ у детей и подростков.

Независимо от инициальных характеристик всем больным ОПЛ, помимо стандартных диагностических и лечебных мероприятий, обязательно должна проводиться оценка молекулярного транскрипта *PML/RARα* инициально и перед началом поддерживающей терапии. Пациентам с констатацией молекулярной ремиссии показано продолжить выполнение этапа поддерживающей терапии. В отсутствие молекулярной ремиссии (группа очень высокого риска рецидива) наиболее приемлемой тактикой является модификация терапии на основе триоксида мышьяка. Существуют и альтернативные подходы, например, интенсификация ХТ, использование гемтузумаба озогомицина, проведение аллогенной ТГСК.

За 15 лет работы многоцентровой группы по межнациональному протоколу лечения ОПЛ у детей и подростков терапия проведена >140 больным и достигнуты очень высокие показатели излечения. Однако остаются нерешенные вопросы, ответ на которые можно получить только при условии совместных усилий многих клиник.

Приложение 1

Клиники — участницы исследования

Областная детская клиническая больница (отдел гематологии/онкологии); руководитель *Л.Г. Фечина*; координатор протокола ОПЛ *О.П. Хлебникова*, Екатеринбург
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением онкогематологии *Г.М. Сычева*, врач-гематолог *Н.В. Чаплыгина*, Курск
 Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии; директор Центра *О.В. Алейникова*, Минск, Республика Беларусь
 Морозовская детская клиническая больница №1; зав. отделением гематологии *К.Л. Кондратчик*; координатор протокола ОПЛ *О.А. Тиганова*, Москва
 Российская детская клиническая больница; зав. отделением общей гематологии *М.А. Масчан*; координатор протокола ОПЛ *Д.Д. Байдильдина*, Москва
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением гематологии *А.В. Шамардина*, Нижний Новгород
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением онкогематологии *Н.С. Осмульская*, Омск
 Областная детская клиническая больница; врач-гематолог *О.В. Курлова*, Тверь
 Чувашская республиканская детская клиническая больница; зав. отделением онкогематологии *Г.П. Павлова*, Чебоксары
 Научно-исследовательский институт детской онкологии/гематологии Российского онкологического центра РАМН; зав. детским отделением *А.В. Попа*, Москва
 Московский областной онкологический диспансер; зав. детским отделением *Е.В. Инюшкина*, Балашиха
 Городская больница №1; зав. отделением онкогематологии *Э.Г. Бойченко*, Санкт-Петербург
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением *Е.В. Башарова*, Челябинск
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением *А.Г. Безнощенко*, Рязань
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением *Т.В. Турובה*, Архангельск
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением *К.С. Асланян*, Ростов-на-Дону
 Дагестанская детская республиканская клиническая больница; зав. отделением *И.М. Юнусова*, Махачкала
 Государственная областная детская больница; зав. отделением онкогематологии *С.Ю. Умнова*, Иркутск
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением гематологии *О.Ю. Кузнецова*, Тула
 Областной клинический онкологический диспансер, Детский онкогематологический центр; руководитель центра *Н.А. Попова*, Волгоград
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением *О.В. Сурьянинова*, Ярославль
 Республиканская детская клиническая больница; зав. отделением онкогематологии *З.С. Гордеева*, Йошкар-Ола
 Областная детская клиническая больница; зав. отделением гематологии *Г.Р. Шаропова*, Нижневартовск

Приложение 2

Лаборатории, участвующие в диагностике случаев ОПЛ у детей и подростков

РДКБ, лаборатория цитологии; зав. лабораторией Л.В. Байдун; врачи-гематологи М.Э. Дубровина, С.А. Плясунова, Москва

Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии; лаборатория молекулярно-генетических исследований; зав. лабораторией Т.В. Савицкая; отдел АСУ О.И. Быданов — статистическая обработка, Минск

ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН; лаборатории биологических микрочипов; зав. лабораторией А.С. Заседателев, зав. группой анализа мутаций в геноме человека Т.В. Наседкина, научные сотрудники В.С. Жаринов, Н.А. Гусева, Москва

Областная детская клиническая больница; лаборатория молекулярной биологии Лабораторного отделения Отдела детской онкологии и гематологии ОДКБ №1; зав. лабораторией Г.А. Цаур, врачи Е.Р. Семенихина, Т.О. Ригер, биолог А.С. Иванова, цитогенетики М.В. Стригалева, О.М. Плеханова, Екатеринбург

Институт канцерогенеза ОНЦ РАМН; лаборатория цитогенетики с группой молекулярной генетики; вед. научный сотрудник Е.В. Флейшман, Москва

Л и т е р а т у р а

- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976;33:451—61.
- Castaigne S., Chomienne C., Daniel M.T. et al. All-transretinoic acid as a differentiating therapy for acute promyelocytic leukemias. *Blood* 1990;76(9):1710—7.
- Estey E. New Categories of Response in AML. *Ann Hematol* 2008;87:59—61.
- Buchner T., Hiddemann W., Wormann B. et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93(12):4116—24.
- Fenaux P., Chevret S., Guerci A. et al. Long-term follow-up confirm the benefit of all-trans retinoic acid in APL. European APL group. *Leukemia* 2000;14:1371—7.
- Ades L., Sans M., Chevret S. et al. Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood* 2008;111(3):1078—84.
- Lo Coco F., Avvisati G., Diverio D. et al. Molecular evaluation of response to all-trans-retinoic acid therapy in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1991;77:1657—9.
- Cassinat B., Zassadovski F., Balitrand N. et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia* 2000;14:324—8.
- Ades L., Chevret S., Raffoux E. et al. Is cytarabine useful in the treatment of APL? Randomized trial from the European APL Group. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5703—10.
- Lo Coco F., Diverio D., Avvisati G. et al. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:2225—9.
- Kelaidi C., Ades L., Chevret S. et al. Late first relapses in APL treated with all-trans-retinoic acid- and anthracycline-based chemotherapy: the European APL group experience (APL 91 and APL 93 trials). *Leukemia* 2006;20:905—7.
- Самочатова Е.В., Масчан А.А., Алейникова О.В. и др. Опыт лечения промиелоцитарного лейкоза у детей по протоколу с использованием трансретиноевой кислоты: результаты клиник России и Беларуси. *Гематол трансфузиол* 2000;45(1):6—10.
- Беспалова А.В., Самочатова Е.В., Алейникова О.В. и др. Результаты лечения острого промиелоцитарного лейкоза у детей и подростков по данным мультицентрового исследования (Беларусь — Россия), *Вопр гематол онкол иммунол у детей и подростков* 2005;4(1):25—31.
- Самочатова Е.В., Масчан А.А., Алейникова О.В. и др. Долгосрочные результаты комбинированного лечения острого промиелоцитарного лейкоза у детей и подростков с использованием геннонаправленной терапии. *Тер арх* 2007;(7):26—30.
- Nasedkina T.V., Zharinov V.S., Isaeva E.A. et al. Clinical screening of gene rearrangement in childhood leukemia using a multiplex PCR-microarray approach. *Clin Cancer Res* 2003;9:5620—9.
- Van Dongen J., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901—28.
- Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Stat Assoc* 1958;6:457—81.
- Kalbfleisch J., Prentice R. The statistical analysis of failure time data. New York: John Wiley & Sons, 1980.
- Gray R.J. A class of k-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* 1988;16: 1141—54.
- Ades L., Fenaux P. Treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) — an update of the French—Belgian—Swiss Group experience. *Ann Hematol* 2008;87:21—3.
- Bolufer P., Lo Coco F., Grimwade D. et al. Variability in the levels of PML-RAR alpha fusion transcript detected by the laboratories participating in an external quality control program using several reverse transcription polymerase chain reaction protocols. *Haematologica* 2001;86:570—6.