

VÝZNAM MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI A METODY JEJÍHO STANOVENÍ U PACIENTŮ S NĚKTERÝMI HEMATOLOGICKÝM MALIGNITAMI

THE SIGNIFICANCE OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE AND METHODS OF ITS DETECTION IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

ČERNÝ J., TRNĚNÝ M., KLENER P.

I. INTERNÍ KLINIKA - KLINIKA HEMATOLOGIE A NEFROLOGIE 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY A VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICE, PRAHA

Souhrn: Rychlý vývoj cytogenetiky, průtokové cytometrie a molekulární biologie rozšiřuje možnosti detekce minimální reziduální nemoci. V obecné části je uveden stručný přehled nejčastěji užívaných laboratorních technik. Ve specializované části jsou pak shrnuty literární údaje o klinickém významu detekce reziduální nemoci u některých hematologických malignit.

Klíčová slova: minimální reziduální nemoc, cytogenetika, průtoková cytometrie, molekulární biologie, polymerázová řetězová reakce, molekulární kompletní remise, transplantace krevetvorných kmenových buněk, monoklonální protilátka

Summary: The rapid development of cytogenetics, flow cytometry and molecular biology broadens the spectrum of options for minimal residual disease detection. A brief overview of the most frequently used laboratory techniques is given in the general part. The specialized part summarizes the data from literature concerning the clinical significance of the minimal residual disease detection in certain hematological malignancies.

Key words: minimal residual disease, cytogenetics, flow cytometry, molecular biology, polymerase chain reaction, molecular complete remission, transplantation of hematopoietic stem cells, monoclonal antibody

Úvod

Prakticky všechna onkologická onemocnění představují klonální proces, kdy se určitá část buněčné populace, klon, vymkla kontrolním mechanismům růstu. V hlavní roli se zde uplatňují specifické změny v genomu buňky (primární změny). Jejich přítomnost může vyvolat nádorovou transformaci normální buňky v nádorovou buňku určitého typu (např. translokace t(9;22) u chronické myeloidní leukémie, CML). V patologicky změněném genomu dochází v průběhu času nadále k mutacím (sekundární změny). Jejich výsledkem je vznik subklonů buněk, které jsou čím dál tím méně ovlivnitelné vnitřními fyziologickými mechanismy kontroly růstu buněk, stejně tak jako jsou i méně citlivé k protinádorové terapii. Sekundární změny jsou tedy zodpovědné za rezistenci, progresi onemocnění (např. mutace proteinu p53). Předpokladem vyléčení nemocného s onkologickým onemocněním je úspěšné zničení maligního klonu buněk, tj. navození „kvalitní“ kompletní remise onemocnění.¹ Kvalitu remise můžeme měřit s různou citlivostí. Podle vybrané metodiky můžeme hovořit o kompletní remisi klinické (clinical complete remission, CCR), cytogenetické, imunologické, nebo molekulární (molecular complete remission, MCR).

CCR je možno definovat jako vymizení známek onemocnění pod úroveň detekovatelnou při použití běžných vyšetřovacích metod (radiodiagnostických i laboratorních). Obecně platná kritéria klinické kompletní či parciální remise (partial remission, PR) jsou pak ještě upravována jednotlivými pracovními skupinami jako je tomu např. pro ne Hodgkinské lymfomy (NHL).² U hemato-onkologických pacientů lze dosáhnout s vysokou pravděpodobností CCR, dochází však také ve vysokému procentu k návratu nemoci, relapsu. Relapsy jsou ve své

konečné fázi nejčastější příčinou selhání protinádorové terapie. Předpokládá se, že k rekurenci onkologických onemocnění přispívají reziduální maligní buňky. Subklinickým zbytkům nádoru se říká minimální reziduální nemoc (minimal residual disease, MRD). Rozsah a vývoj MRD v průběhu onemocnění lze sledovat s různou citlivostí laboratorních technik. Metody:

- *cytogenetické* (cytogenetika; popř. fluorescein in situ hybridization, FISH), mohou detekovat 1 nádorovou buňku mezi 10^2 buňkami normálními
- *imunologické* (imunofenotypizace; průtoková cytometrie, fluorescein activated cell sorting, FACS), vykazují vyšší citlivost tj. 10^{-2} - 10^{-3}
- *molekulární* jsou nejcitlivější (zejména polymerase chain reaction, PCR nebo reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR), citlivost 10^{-3} - 10^{-6}

Tak jako je možné označit stav pacienta bez detekovatelné MRD jako molekulární kompletní remise (molecular complete remission, MCR) lze podobně definovat i molekulární nebo také PCR relaps, což je označení užívané situace, kdy je zejména pomocí kvantitativní PCR zjištěna expanze patologického klonu o 1 log bez závislosti na intervalu od předchozího vyšetření bez známek klinického relapsu.³

Cytogenetika

Chromozomální analýza lidských buněk používá jednak klasických cytogenetických metod, kdy se na metafázických chromozómech hodnotí jejich počet, velikost, tvar a strukturu chromozómů.⁴ DNA sond (prób) identifikujících určitý úsek DNA lze použít i pro buňky v interfázi. Zprvu radioaktivně značené sondy byly nahrazeny sondami fluorescenčními (FISH), což

umožnilo rozvoj cytogenetiky. Dnes jsou k dispozici tzv. barvicí sondy specifické pro každý chromozóm, kterými lze odhalit několik aberací najednou a mimo jiné také delece a amplifikace genetického materiálu.

Technika *komparativní genomické hybridizace (comparative genomic hybridization, CGH)* porovnává barvení chromozómů nádorových a normálních buněk. Pokud není ztráta nebo nadbytek DNA, daný úsek chromozómu je žlutý (rovnováha mezi červenou a zelenou barvou). V případě imbalance se daný úsek zbarví červeně nebo zeleně. Z této metodiky vychází i tzv. *microarrays*. Novější metodou je tzv. *multibarevná FISH (multicolor FISH, M-FISH)*,^{5,6} kdy se jednou či více barvami označené chromozómy normálních buněk porovnávají s chromozómy buněk nádorových. Touto metodou lze tedy identifikovat změněné chromozómy, avšak bližší specifikace vyžaduje použití specifické DNA próby.

Cytogenetická odpověď např. u CML představuje procento jader negativních pro danou cytogenetickou změnu, tj. t(9;22) historicky Philadelfský chromozóm (Ph). Podle stupně se odpověď dělí následovně: žádná, minimální (1% až 32% Ph neg), minor (33% až 65% Ph neg), major (66% až 99% Ph neg) a kompletní (100% Ph neg).⁷

Imunofenotypizace

Průtoková cytometrie používá značení povrchových nádorových antigenů pomocí monoklonálních protilátek vážících se specificky na tyto povrchové znaky.⁸ Většina analýz FACSem závisí tedy na detekci povrchových antigenů buněk, nejčastěji tzv. CD (cluster differentiation). V případě B buněčných lymfoproliferací se ještě k určení klonality využívá exprese lehkých imunoglobulinových řetězců.⁹ Přestože jsou tyto techniky citlivější než morfologické metody mají svá omezení. Vzhledem k variabilitě povrchových znaků nádorových elementů mají některé metody informativní hodnotu jen u vybraných případů.¹⁰ Významným pokrokem u metod monitorování MRD pomocí FACS je uplatnění vícebarevné fluorescence, které umožní analýzu značně velkého množství buněk a identifikaci i jen velmi malé buněčné subpopulace. Tuto metodiku lze použít v široké míře, je kvantitativní a zachovává si i dobrou sensitivitu (10-5).¹¹

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR)

Metody PCR mají mnoho podob a modifikací. Mohou být *kvantitativní* (plus, minus) nebo také *kvantitativní (Q-PCR)*. Mezi klasické postupy patří *jednostupňová PCR*, kdy je cyklicky (30x- 50x) množena vybraná sekvence ohraničená párem primerů. Tato metodika pracuje s citlivostí zhruba 10^{-3} - 10^{-5} . *Dvoustupňová PCR (nested PCR)* využívá navíc tzv. vnitřních primerů, které rozpoznávají úseky genetické informace již v předem namnožených sekvencích z *jednostupňové PCR*. Tím se může zvýšit citlivost na přibližně 10^{-5} - 10^{-6} .¹² Nevýhodou je nutnost znát dva páry primerů, které vymezují hledanou sekvenci, což sebou mimo jiné přináší také pracnější optimalizaci reakce. Mezi *jednostupňovou* a *dvoustupňovou PCR* se svou citlivostí může za určitých podmínek vmezeřit i tzv. „*touchdown PCR*“, u které je cyklační program upraven tak, aby ani při vysokém počtu cyklů nedocházelo ke vzniku nespecifit.¹³

Metoda *RT-PCR* detekuje přítomnost nádorové mRNA, která je v prvním kroku přepsána do cDNA a dále již je množení cílové sekvence stejně jako u klasické PCR.¹⁴

Skutečnost, že přítomnost některých markerů nádorových buněk byla detekována u jedinců bez onkologického onemocnění¹⁵ a u pacientů v dlouhodobé kompletní remisi,^{16,17} vedla k rozvoji kvantitativních metodik. Rozsah MRD lze hodnotit *semikvantitativně* (nárůst, pokles, stagnace) nebo *absolutně*, kdy je možno určit počet patologických buněk v daném vzorku. PCR metodika *limitujícího ředění* určuje koncentraci (ředění) cílové sekvence ve vzorku, při které ješ-

tě lze detekovat PCR pozitivitu při znalosti citlivosti reakce.¹⁸ Tato metoda byla využita k *semikvantitativním* stanovením MRD a její výsledky byly v soulase s klinickým obrazem.^{19,20} Pro přesnější kvantifikace pak byla navržena *komparativní PCR* užívající koamplifikace CDRIII jako patologického markeru a H-ras onkogenu jakožto referenčního markeru (interní standard). Obě metodiky poskytují soulasné výsledky a vývoj hladin buněk nesoucích sledovaný marker byl v soulase s klinickým obrazem.²⁰⁻²² Nevýhodou koamplifikačních reakcí (*multiplex PCR*) je však snížení citlivosti detekce na 10^{-2} - 10^{-3} .

Absolutní kvantitativní PCR metody jsou představovány *kompetitivními (většinou nested) PCR* nebo *RT-PCR*,²³ které s citlivostí 10^{-5} - 10^{-6} patří mezi k nejužívanějším. *Kompetitivní PCR* je založena na porovnávání množství produktů PCR při známé koncentraci templátu (externí standard) v pozitivní kontrole.²⁴ Při provedení reakce v ředící řadě, lze pak získat množství templátu ve vzorku, tj. počet nádorových buněk v měřeném vzorku. Uvedená metodika je dobře propracována a doporučována pro monitorování MRD u leukémií zejména CML.^{3,25} Možnost, jak odlišit PCR pozitivní nemocné, kteří po léčbě setrvávají v dlouhodobé CCR od nemocných ohrožených relapsem naznačují studie s nejnovější metodikou tzv. „*realtime PCR*“ u akutních lymfoblastových leukémií (ALL),²⁶ množství myelomu (MM)²⁷ anebo folikulárních lymfomů (FL).²⁸ Tato technika využívá 5'-3' nukleázové aktivity Taq polymerázy a fluorescenčně značenou cílovou DNA próbu.²⁹ Během reakce je próba odštěpována, což vyvolá fluorescenci, která je přímo úměrná množství cílových sekvencí.

Jak již bylo naznačeno dříve PCR je představována amplifikační unikátní genové sekvence, která se nachází v genomu patologické buňky. Taková sekvence může být jednak specifická pro dané onemocnění (t(9;22) u CML; t(14;18) u FL; t(11;14) u lymfomů z buněk plášťové zóny, MCL apod.). Nebo může být dokonce typická pro daný buněčný klon (CDRIII klonální restrukturační genu pro těžký imunoglobulinový řetězec u B lymfocytů nebo klonální restrukturační genu pro receptor T lymfocytů u lymfoproliferativních onemocnění).³⁰ Postupy založené na PCR detekci klonálního IgH jsou považovány za metody s dobrou citlivostí, avšak i ty lze aplikovat např. jen u asi 70-80% pacientů, protože bývá mutacemi IgH genů často změněno místo pro navázání tzv. konsensusu primerů. Citlivost PCR detekce IgH rearanžmá je snižována přítomností normálních lymfocytů, pozadí (max. 10^{-4}). PCR techniky, které používají primery specifické pro pacienta (allele-specific oligonucleotide ASO-PCR) mají větší sensitivitu (až 10^{-6}).³¹ Jedná se ovšem o postupy náročné na pracnost a finance a výsledky nejsou ihned dostupné. Proto není použití ASO-PCR ideální pro standardní monitoring léčebné odpovědi. Kombinací ASO-PCR spolu s „*real-time*“ PCR lze získat kvantitativní výsledky s citlivostí 10^{-5} .³²

Materiál vhodný k vyšetření a monitorování MRD

Sledování MRD zvláště pak u leukémií je prováděno z kostní dřeně (bone marrow, BM) nebo periferní krve (periferal blood, PB) již déle než deset let. U NHL je však situace složitější, neboť není zcela jasné z jakého histologického materiálu vyšetření provádět. Lymfom vzniká nejčastěji v lymfatické uzlině (LN), avšak existuje i mnoho extranodálních lymfomů. Otázkou, ve které tkáni monitorovat přítomnost MRD u NHL se zabývalo několik autorů s rozdílnými závěry. Gribben, ale i další autoři popisují významnější vliv pozitivivity v BM nad pozitivitou v PB na prognózu nemocných s NHL,^{33,34} zatímco jiní upřednostňovali monitorování v PB.^{35,36} Lopez-Guillermo koreloval výsledky PCR vyšetření BM a PB po léčbě s klinickou odpovědí u folikulárních lymfomů (FL). Jeho pozorování jsou uvedena v tabulce 1 a vyplývá z nich, že PCR nálezy v PB se cca v 70% shodují s nálezy v BM a naopak.³⁶ To, že je celá tato problematika komplexnější a že právě u NHL se více uplatňuje vliv rozdílnosti kompartmentů dokreslil

Tabulka 1: Shoda mezi terapeutickou odpovědí na molekulární úrovni v PB a v BM v různých časových intervalech od léčby (čísla uvedena v procentech), (BM - kostní dřeň; PB - periferní krev; n - počet pacientů)

	3-5 měsíců (n = 57)	6-8 měsíců (n = 41)	9-14 měsíců (n = 35)
PB(+)/BM(+) nebo PB(-)/BM(-)	70	66	77
PB(+)/BM(-)	13	5	9
PB(-)/BM(+)	17	24	14

i Gupta svým pozorováním, kdy došlo po terapii monoklonální protilátkou anti-CD20 k vymizení lymfomových elementů z periferní krve, avšak objevil se relaps v uzlině.³⁷ Množství t(14;18) pozitivních buněk v PB před zahájením standardní terapie nekoreluje s výsledkem léčby.³⁸ U nemocných s bulky postižením cirkuluje v periferní krvi méně t(14;18) pozitivních buněk než u ostatních nemocných, což je vysvětlováno zvýšenou expresí adhezních receptorů (např. L-selectin) na povrchu lymfomových buněk v případě bulky NHL. Takové buňky také preferují tzv. „homing“ spíše do uzliny než do kostní dřeně či cirkulaci v periferní krvi.³⁹ Skutečnost, že nádorové buňky nemusí být vyplavovány z tkáňových depot do oběhu je však vyrovnána tzv. „sampling errorem“ (odběrová jehla mine patologické ložisko) při vyšetřování BM nebo jiných solidních tkání.

U NHL existuje obecná shoda v tom, že uzlina by měla být vyšetřena při stanovení diagnózy a MRD bývá často monitorována během onemocnění v BM spolu s PB.^{35,36} Ostatní tkáně (LN, periferní kmenové buňky, slezina, sliznice, kůže, mozkomíšň mok, atd.) mají jistě významnou úlohu v individuálních případech či spíše konkrétních situacích (stanovené diagnózy či relapsu apod.), ale nelze jejich vyšetřování praktikovat rutinně.

Praktický význam stanovení MRD

Stanovení MRD má mimořádný význam též při transplantační terapii. Nejpravděpodobnější příčinou rekurence je persistence nádorových buněk v organismu, nelze však vyloučit ani podíl infiltrace autologního štěpu.^{40,41} Tento fakt vedl jednak k intenzivnímu výzkumu klinického významu různých metod čištění (purgingu)⁴² a také ke snaze použít AlloSCT u většího počtu pacientů. Fakt, že infiltrace BM je nejvýznamnější faktor ovlivňující čistotu (puritu) štěpu, který je pacientovi v rámci autologní transplantace krevetvorných buněk podán (autologous stem cell transplantation, ASCT), byl popsán u mnoha onkologických diagnóz. Existují práce popisující, že čistota štěpu může být ovlivněna jednak použitým mobilizačním režimem,⁴³ intenzitou předléčení (užitou indukční terapií) a riziko znečištění roste s vyšším počtem separací.⁴⁰ Studie zabývající se kontaminací štěpů krevetvorných kmenových buněk (peripheral blood stem cells, PBPC) nádorovými elementy vedly ke zjištění, že doba výskytu maximálního počtu krevetvorných kmenových a progenitorových buněk vyplavených z kostní dřeně do periferní krve o několik hodin předchází nebo se prakticky shoduje s maximem vyplavování buněk nádorově transformovaných.^{40,44,45} Další studie ukázaly, že přítomnost nádorových elementů v podávaném štěpu má na prognózu pacienta negativní dopad.^{45,46}

Metodiky molekulární biologie umožňují sledovat vývoj onemocnění a tím i předvídat prognózu nemocného a zároveň pomáhají při studiu patogeneze maligních onemocnění, která bývá představována genetickou lézí vedoucí k nádorové transformaci.

Poznatky vysvětlující biologické chování jednotlivých hematologických malignit se pozvolna začínají odrážet i v zavádění nových léčebných způsobů do klinické praxe. Např. u CML se v poslední době k léčbě používá inhibitor specifické nádorové tyrosinkinázy STI 571 (imatinib mesylat).⁴⁷

ALL (akutní lymfoblastová leukémie)

CCR je definována jako přítomnost méně než 5% blastů v KD, což může představovat 0 až 10^{10} leukemických buněk. Pro sledování MRD se využívá detekce translokací t(12;21) (u dětí), případně t(14;18). Asi u 3-5% dětí a 25% dospělých s ALL lze detekovat t(9;22). Uvádí se, že zmíněné metodiky pracují s citlivostí až 10^{-6} . V některých případech se používá PCR detekce klonální restruktury IgH nebo T receptoru (dohromady až u 95% případů).^{30,48} Zhruba u 20-30% nemocných však dochází během onemocnění ke klonálnímu vývoji, který představuje riziko falešné PCR negativity, proto se doporučuje kombinace s další technikou (FACS).⁴⁹ PCR detekce MRD pomáhá při hodnocení odpovědi na terapii a tím nabývá důležitou prognostickou hodnotu. Pacienti, u kterých nedojde k negativizaci PCR během prvního roku mají vysoké riziko relapsu.⁵⁰ Vymizení fúzních transkriptů BCR-ABL po transplantaci kostní dřeně (TKD) a jejich znovubyvojení před relapsem bylo pozorováno u nemocných s *bcr-abl* pozitivní ALL.⁵¹ Zdá se, že kvantifikace MRD i z pouhého jednoho vzorku může mít určitou prediktivní hodnotu u nemocných s ALL (viz Tab.č. 2).⁵⁰ Stejně tak semikvantitativní metodiky monitorování MRD dokáží předpovědět klinický relaps.⁵² Persistence MRD u nemocných s akutní lymfoblastovou leukémií (ALL) po terapii znamenala vysoké riziko relapsu nemoci.⁵³ Prospektivní analýza ukázala, že u nemocných bez detekovatelné leukémie docházelo v 8% k relapsu, zatímco u ostatních nemocných se nemoc vrátila ve 40% případů. Avšak ani absence MRD po indukční terapii není uznána jako dostatečná podmínka pro přerušeni nebo ukončení léčby.

Tabulka 2: Výše MRD v jednom vzorku a riziko relapsu u pacientů s ALL.

Úroveň MRD	Relapsů
> 10-3	100%
10-3 až 2×10^{-5}	40%
< 10^{-5}	0% (setrvali v remisi)

CLL (chronická lymfatická leukémie)

CLL je onemocnění s indolentním průběhem, které však má variabilní prognózu v závislosti na rizikových faktorech. Medián přežití je asi 6 let a 20% pacientů přežije 10 let. Zatímco se věkový medián v čase diagnózy pohybuje asi kolem 65 let, 30% nemocných CLL je méně než 60 let. CLL není vyléčitelná konvenčními postupy a při přítomnosti nepříznivých prognostických faktorů je přežití kratší než 3 roky. Taková prognóza není akceptovatelná zejména pro mladší nemocné, proto se neustále hledají účinnější léčebné postupy, které by byly schopné eradikovat onemocnění či navodit dlouhodobou remisi.

Dvě nejúčinnější používané metody pro sledování MRD u CLL jsou založeny buď na FACS nebo PCR. PCR detekce CDRIII patří mezi nejcitlivější metody sledování MRD u CLL a při použití tzv. konsensus primerů ji aplikovat u asi 70-80% pacientů. Robertson pozoroval, že nemocní s CLL léčení fludarabinem mohou dosáhnout MCR (stanovené duálním FACS vyšetřením a analýzou Ig genů pomocí Southern-blotu). Kvalita remise měla prediktivní hodnotu ve smyslu trvání léčebné odpovědi.⁸ Vuillier jako jeden z prvních prezentoval, že nemocní s CLL mohou dosáhnout PCR negativity.⁵⁴ Později Provan demonstroval, že persistující PCR pozitivita po ASCT znamená vyšší riziko relapsu. Naopak se ukázalo, že většina pacientů s negativní PCR je i bez známek onemocnění. ASCT tedy představuje jednu z terapeutických možností, která se může stát u určité skupiny nemocných s pokročilou CLL kurabilní.⁵⁵ Magnac popsal výsledky monitorování MRD u 12 nemocných po dosažení CR (doba sledování 17- 60 měsíců; viz Tabulka 3). Vzhledem k malému počtu sledovaných nemocných je třeba brát výsledky rezervovaně, avšak potvrdilo se, že HDT má větší

Tabulka 3: Výsledky monitorování MRD u 12 nemocných s CLL po dosažení CR. Standard- 8 x fludarabin (4-12 cyklů) a 1x CHOP, 3 x salvage (refrakterní na standardní chemoterapii)- ESHAP (3-6 cyklů).

Počet nemocných	Terapie	PCR- vs. PCR+	Relaps	Úmrtí
9	Standard	1/8	1/2	0/2
3	Salvage+ ASCT	3/0	0/0	0/0

potenciál k indukci MCR a také, že nemocní bez reziduální nemoci měli lepší prognózu.⁵⁶ Dokonce i při použití nečistěného štěpu PBPC lze indukovat MCR. Ve studii italských autorů bylo celkem 20 nemocných v CR po terapii fludarabinem transplantováno nečistěným PBPC. 75% pacientů dosáhlo MCR (15/20) a tyto pacienti měli lepší prognózu onemocnění.⁵⁷ Nedávno byla publikována práce, ve které byla MRD sledována pomocí citlivé metodiky FACS po terapii fludarabin + ASCT nebo monoklonální protilátky anti-CD52 + ASCT. Jako MRD- byli označeni nemocní s méně než 0.05% CLL buněk v BM. Terapií bylo dosaženo celkem u 76% (19/25) nemocných MRD-, zatímco zbývajících 24% (6/25) bylo MRD+. Event free survival (EFS) byl statisticky významně horší u MRD+ pacientů než u MRD- ($p=0.0001$). Podobně i celkové přežití (overall survival, OS) bylo statisticky významně zkráceno u MRD+ skupiny oproti nemocným MRD- ($p=0.007$). U všech MRD+ nemocných i pacientů s nízkými úvodními hladinami reziduální nemoci docházelo k postupnému nárůstu CLL buněk.¹¹

AML (akutní myeloidní leukémie)

Pravděpodobnost navození CCR se u dospělých nemocných pohybuje mezi 70-80%. Podobně je však také vysoká také pravděpodobnost relapsu (60-70%).⁵⁸ Persistence MRD je studována pomocí vysoce sensitivních PCR detekcí specifických translokací [t(6;9), t(15;17), t(8;21) apod.]. K monitorování MRD se také využívá i RT-PCR detekci transkriptů *AML1/ETO* u akutní myeloblastové leukémie [AML M2; t(8;21)]⁵⁹ a *PML/RAR-alfa* u akutní promyelocytární leukémie (APL, M3).⁵⁹⁻⁶¹ Protože však pouze malá část nemocných s AML má PCR detekovatelný marker je MRD často sledována pomocí FACS.⁴⁹ Práce publikované v první polovině devadesátých let nepřinesly zcela jasnou odpověď na význam MRD u AML. Při stabilním množství MRD zachyceném v průběhu CCR nemusí u nemocných dojít k relapsu ani při opakované PCR pozitivitě. To platí zejména pro AML M2.⁶² Naproti tomu u AML M3, akutní promyelocytární leukémie [APL; t(15;17); *PML/RAR-alfa*] je pozitivita zjištěná pomocí RT-PCR opět spojena s vysokým rizikem relapsu.⁶⁰ Stejně tak varující je trvalý nárůst molekulárního markeru, který může být spojen s pozdějším návratem onemocnění.⁶³ Z prací novějších je možno zmínit např. multicentrickou studii "AIDA" Trial (GIMEMA-AIEOP), v níž byla MRD monitorována pomocí RT-PCR pro *PML/RAR-alfa* s citlivostí 10^{-4} . Z 21 pacientů, u nichž došlo během CR ke konverzi z PCR- na PCR+ a PCR+ se opakovala ve dvou po sobě následujících vzorcích, dospělo 20 nemocných k relapsu (95%).⁶⁴ Výsledky randomizovaných studií EORTC/GIMENA AML-10 a EORTC/GIMENA AML-13 přinářející shrnu-

Tabulka 4: Vliv hladiny MRD stanovené po ukončení indukce nebo konsolidace na počet relapsů. (MRDInd+/- přítomnost či nepřítomnost MRD po indukční terapii, MRDCons+/- přítomnost či nepřítomnost MRD po konsolidační terapii; * nesignifikantní, ** $p < 0,001$)

Po ukončení	Indukce	Indukce	Konsolidace	Konsolidace
MRD (buněk)	(MRDInd+) $\geq 4,5 \times 10^{-4}$	(MRDInd-) $< 4,5 \times 10^{-4}$	(MRDCons+) $\geq 3,5 \times 10^{-4}$	(MRDCons-) $< 3,5 \times 10^{-4}$
Celkem pacientů	(n= 26)	(n= 30)	(n= 22)	(n= 29)
Počet relapsů (%)	15 (58)*	12 (40)	17 (77)**	5 (17)

Tabulka 5: Vliv hladiny MRD stanovené po ukončení indukce a v následném sledování po konsolidaci na počet relapsů. (MRDInd+/- přítomnost či nepřítomnost MRD po indukční terapii, MRDCons+/- přítomnost či nepřítomnost MRD po konsolidační terapii; * $p < 0,001$ **, $p < 0,007$)

Skupina pacientů	MRD Ind+		MRD Ind-	
Celkem pacientů	n = 21		n = 30	
Po konsolidaci pacientů	MRDCons+/ 14	MRDCons-/ 7	MRDCons+/ 8	MRDCons-/ 22
Počet relapsů (%)	10 (71)*	0(0)	7 (87)**	5 (23)

jí a pro AML subjednotky obecně platné výsledky monitorování úrovně MRD u pacientů po indukční a konsolidační terapii byly publikovány nedávno (viz Tabulka 4). Vyšší hladina MRD korelovala s kratším obdobím bez relapsu (relaps free survival; RFS) a horším OS.

Sledování vývoje MRD u pacientů po ukončení konsolidace ukázalo podobné výsledky (viz. Tabulka 5).⁶⁵ Použití PCR pozitivního štěpu k transplantaci u AML je spojeno s rizikem rekurence onemocnění po TKD.^{40,66}

CML (chronická myeloidní leukémie)

CML je z hlediska molekulární biologie asi nejlépe prostudované onemocnění. Objevení tzv. Philadelfského chromozómu (Ph) v roce 1960 jako první chromozómalní aberace spojené s určitým typem leukémie doplněné o pozdější upřesnění, že se jedná o translokaci t(9;22), která dá vzniknout fúznímu genu *bcr-abl*, znamenalo významný přelom ve studiu biologie nádorů.

Skutečnost, že pomocí interferonu-alpha (IFN-alpha) lze navodit u CML cytogenetickou remisi byla dále ověřena v prospektivní studii Italské kooperativní skupiny pro CML, jejíž výsledky byly průběžně publikovány.⁷ Také se ukázalo, že pacienti v cytogenetické remisi po IFN-alpha mají delší přežití v porovnání s chemoterapií. Studie Italské kooperativní skupiny pro CML neměla design plánovaný pro určení kinetiky a trvání cytogenetických odpovědí, proto byla provedena retrospektivní analýza dat. Také bylo pozorováno, že schopnost cytogenetické odpovědi na terapii IFN bylo možné předpovědět na základě Sokalova indexu,⁶⁷ hematologické odpovědi a že většina cytogenetických odpovědí nastala během prvního roku. Při dosažení pouze minoritní cytogenetické odpovědi (Ph neg, 33% až 65%), byla taková odpověď nestabilní a trvala krátce, zatímco medián trvání kompletní a majoritní odpovědi (Ph neg, 66% až 100%) byl asi 60 měsíců.⁷ Tato data jsou v soulase se pozorováním z klinických studií na M.D. Anderson.⁶⁸

Pro detekci transkriptu fúzního genu *bcr-abl*, který se vyskytuje až u 95% CML lze využít nested RT-PCR.⁶⁹ První studie ukázaly, že pozitivní PCR detekce aspoň ve dvou po sobě následujících vzorcích může předpovědět relaps,⁶⁹ zatímco jedna pozitivní PCR se může ještě konvertovat na negativitu během 6-9 měsíců a pacient dále setrvá v CCR.⁷⁰ PCR negativita doprovází silnou reakci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GVHD) v prvních 3-4 měsících po allogenní transplantaci. Na druhou stranu někteří autoři pozorovali PCR pozitivitu po téměř 10 let u některých nemocných bez návratu onemocnění,¹⁷ což může být vysvětlováno samotným přirozeným průběhem onemocnění, kdy chronická fáze CML může trvat roky. Tato fakta přiměla vědce ke zpřesnění kvantitativních metodik pro sledování MRD po transplantaci u nemocných s CML a vedla k vývoji kompetitivní nested RT-PCR.⁷¹ Na základě studií sledujících klinický význam molekulárního monitorování navrhla EICML Group (European Investigators on CML) doporučení pro použití PCR vyšetření u CML. Vzestup MRD o 1 log představuje PCR relaps a klinický relaps se může objevit během 1-2 měsíců, proto se doporučuje zkrátit

následující intervaly PCR vyšetření.³ Podle sdělení některých autorů je PCR relaps událostí relativně dobře zvládnutelnou pomocí infuze dárcevských lymfocytů. Studie používající genetického značení ukázaly, že by se na relapsech po autologních transplantacích krvetočných buněk mohla podílet právě MRD v reinfundovaných štěpech PBPC, proto se zhruba do konce 90. let u CML doporučovalo hledat dárce a provést transplantaci allogenní (AlloSCT).⁷² V současné době se předpokládá, že do léčebných protokolů zasáhne i nový lék STI 571, neboť se očekávají slibné výsledky studií u pacientů s CML.

MM (Mnohočetný myelom)

Klonální restruktura genu pro těžký imunoglobulinový řetězec (IgH, tj. CDRIII, complementarity detemining region) bývá používána jako nádorový marker u nemocných MM k detekci reziduálních myelomových buněk zejména pak po ASCT.⁷³⁻⁷⁶ V současné době se standardní součástí léčby pokročilých stádií MM stala vysokodávkovaná chemoradioterapie s následnou ASCT⁷⁷⁻⁷⁹ a v rámci klinických studií pak AlloSCT.⁸⁰⁻⁸¹ Ve většině dosud publikovaných souborech pacientů navodila AlloSCT kompletní remisi u 30-50% případů,⁷⁸ ta však neznamenala vyléčení.^{77,80} Významnou úlohu sehrává přítomnost tzv. graft-versus-myeloma efektu,⁸² což přispívá k prodloužení období bez relapsu (RFS, relapse-free survival) v porovnání s autotransplantacemi.⁸³ Nízká pravděpodobnost relapsu s sebou však nese vysoké riziko peritransplantační mortality (40-50%).⁸¹ I přes existenci prací zabývajících se aplikací AlloSCT a jejím vlivu na MRD, není zatím úloha MCR jednoduše hodnotitelná.^{74,76} Molekulární remise jsou prakticky vyjmečné po autologních transplantacích,⁷⁴ a proto je v současnosti velmi obtížné stanovit význam MCR u nemocných s MM.

NHL (Nehodgkinské lymfomy)

U NHL je molekulární monitorování subklinické choroby rovněž možné díky přítomnosti specifických interchromozómálních translokací, na nichž se podílí některé onkogeny. K nejprostudovanějším patří *bcl-2* onkogen vstupující do t(14;18) u folikulárních (follicular lymphoma, FL) a některých difuzních velkobuněčných lymfomů (diffuse large cell lymphoma, DLCL), dále onkogen *bcl-1* podílející se na t(11;14) u lymfomů z plášťové zóny (mantle cell lymphoma, MCL). Nadto se uvádí, že u zhruba 90% malignit z B-lymfocytů lze pomocí PCR detekovat klonální rearanžmá genu pro těžký imunoglobulinový řetězec (IgH).³⁴ U lymfomů z T buněk se používá PCR detekce klonálního rearanžmá genu pro TCR.³⁰

Po konvenční terapii je MRD detekovatelná prakticky u všech nemocných s NHL.^{85,86} Nicméně při použití intenzivního standardního chemoterapeutického režimu CHOD-Bleo/ESHAP/NOPP u pacientů s nízkomaligním lymfomem došlo u 68% pacientů s PCR pozitivní na *bcl-2* ke konverzi na PCR negativitu ve (13/19).⁸⁷ Cabanillas později prezentoval novější data z dlouhodobého sledování této skupiny nemocných, kde bylo dosaženo u 88% CCR a 72% MCR. Pravděpodobnost 5-letého přežití bez příznaků onemocnění (disease free survival, DFS) byla 73% pro PCR- a 28% pro PCR+ skupinu pacientů, avšak žádná z křivek přežití nedosáhla plateau.⁸⁸ Použití chemoterapeutického režimu FMD (Fludarabin, Mitoxantron, Dexamethasone) přineslo 68% odpovědi na molekulární úrovni (17/25), přičemž PCR- bylo dosaženo ve 32% (8/25).⁸⁹ Vysokodávkovanou terapii s následnou ASCT lze navodit PCR negativitu u značného procenta nemocných s nízkomaligními NHL, v rozpětí 42-70%.^{34,46,90,92,93} Gribben se svými kolegy jako jeden z prvních publikoval vliv MRD po vysokodávkované terapii s následným podáním imunologicky čistěného štěpu na prognózu pacientů s NHL nízkého a středního stupně malignity (viz Tabulka 6).⁹² V nedávném novém hodnocení dat této studie byl ve 12 letech OS 69% a DFS 42%.⁹¹ Ve skupině PCR negativních pacientů po ASCT byl DFS 85% ve 12 letech pozorování, zatímco ve skupině PCR pozitivních pacientů jen 20%. Tato data spolu s dalšími pozorováními jiných

Tabulka 6: Analýza MRD u pacientů s nízkým (LG) a středním stupněm (IG) NHL léčených pomocí ASCT. (kont. PCR- pacienti s kontinuální PCR negativitou, kont. PCR+ pacienti s kontinuální PCR pozitivitou, PCR+ → PCR- pacienti, u kterých došlo ke konverzi na PCR negativitu, PCR- → PCR+ pacienti, u kterých byla opět detekována PCR pozitivita, PCR+/PCR- pacienti, u kterých byla střídavě zachycena PCR negativita či pozitivita)

Po ASCT	Kont. PCR-	kont. PCR+	PCR+ → PCR-	PCR- → PCR+	PCR+ / PCR-
Pacientů	43% (58)	26% (35)	14% (19)	10% (14)	6% (8)
Relapsů	0%	71% (25)	0% (19)	47% (6)	25% (2)

Tabulka 7: Navození MCR u nemocných s NHL pomocí monoklonální protilátky anti-CD20 s nebo bez chemoterapie.

(LG- low grade; IG- intermediate grade; HG- high grade; FL- folikulární lymfom; MCL- mantle cell lymphoma (lymfom z buněk plášťové zóny); R- rituximab (anti-CD20); CHOP- Cyklofosamid, Vinkristin, Adriamycin, Prednison; Mit- Mitoxantron; Cy- Cyklofosamid; DFS- disease free survival.)

Autor	NHL	Terapie	MCR	Počet relapsů	Poznámka
Czuczman ⁹⁶	LG	R-CHOP	88% (7/8)	na	
Solal-Celigni ⁹⁷	FL	R	57% (17/30)	6% (1/17)	za 1. rok
Emmanouilides ⁹⁸	LG	Mit+ Cy+ R	71% (5/7)	na	
Vose ⁹⁹	IG + HG	R-CHOP	85% (11/13)	na	předpoklad >DFS a OS
Foran ¹⁰⁰	MCL	R-CHOP	48% (11/23)	na	medián DFS 16 měs.

autorů ukazují, že eradikace molekulárního markeru z organismu pacienta snižuje riziko relapsů po ASCT a nemocní, kteří jsou PCR- mají prodloužený DFS.^{34,46,91,93} PCR detekce *bcl-2* je uznávána jako potenciální marker dlouhodobého sledování u transplantovaných nemocných s FL. Pracovní skupina z MD Anderson považuje PCR monitoring v periferní krvi spolu s hodnotami beta-2-mikroglobulinu za významný prognostický faktor u pacientů s FL po léčbě. Hladina t(14;18) pozitivních buněk v PB před zahájením standardní terapie nemá vliv na její výsledek.³⁸

V poslední době lze MCR u CD20 pozitivních NHL lze navodit i pomocí nové terapeutické modality, kterou je monoklonální protilátka anti-CD20 (rituximab).^{86,94,95} Použití anti-CD20 protilátky spolu s chemoterapií nebo i jen v monoterapii vedlo k dosažení MCR u pacientů s NHL ve vysokém procentu u indolentních i agresivních lymfomů, s čímž je spojena lepší prognóza onemocnění (viz Tabulka 7).⁹⁶⁻¹⁰⁰ Podávání anti-CD20 protilátky vede k vysokému procentu PCR negativit v BM.^{86,94,95} Tohoto faktu lze využít při mobilizaci periferních progenitorových buněk v rámci tzv. in vivo purgingu.¹⁰¹ Důležitý je jistě i fakt, že anti-CD20 protilátka navodí PCR negativitu v BM bez ovlivnění doby přihojení štěpu při následné ASCT.¹⁰² Kromě prvních zpráv zveřejnil také první slibná data Magni ve studii porovnávající in vivo purging s použitím chemoterapie s anti-CD20 protilátkou a chemoterapie samotné. Chemoimunoterapie byla úspěšná v 93% CD20+ MCL a FL. Chemoterapií samotnou bylo možno získat 40% PCR negativních PBPC produktů (p < 0.007).⁴³ výše zmíněná práce navázala na předešlý výzkum Corradiniho, který použitím samotné tzv. vysokodávkované sekvenční chemoterapie (HDS) pro čištění in vivo dosáhl PCR negativních sběrů PBPC u 12% (1/9) pacientů s MCL a 42% (8/19) nemocných se FL.⁴⁶ Nedávno byly prezentovány výsledky našeho pracoviště, které se týkaly srovnání pacientů v PCR negativních a PCR pozitivních pacientů po léčbě pomocí ASCT nebo anti-CD20 pro-

tilátkou pro B- buněčné lymfoproliferativní onemocnění (B-LPD). Nemocní v MCR měli statisticky významně lepší prognózu.^{103,104} U skupin nemocných PCR negativních versus pozitivních po léčbě nemusí být při porovnání základních klinických charakteristik nalezeny statisticky signifikantní rozdíly.^{103,104} Zdá se tedy, že pravděpodobnost konverze na PCR negativitu či případné vyléčení může být dána biologickými charakteristikami onemocnění. Tento pohled je v současné době také ještě podporován i novými studiemi, které srovnávají profil exprese genů pomocí tzv. microarrays a tento profil je nezávislým prognostickým faktorem.^{105,106}

Závěr

Předpokladem vyléčení nemocného je nejenom dosažení kompletní remise, ale i eradikace zbytkové nemoci. V posledních letech se nakumulovaly doklady, že nemocní, kteří dosáhnu eradikace tumoru na úrovni PCR, mají lepší prognózu než pacienti s PCR pozitivitou. PCR status nemocných s NHL po ASCT je v současnosti vnímán jako statisticky významný prognostický faktor. Podobnou váhu má i stanovení MRD po indukční léčbě u akutních leukémií, u CML při terapii interferonem či AlloSCT. Na druhou stranu existují práce, které ukazují přítomnost některých markerů např. t(14;18), t(9;22) u jedinců bez onkologického onemocnění nebo u nemocných v dlouhodobé kompletní remisi. Pro tyto situa-

ce existují zatím většinou víceméně jen teoretická vysvětlení. Díky moderním metodám kvantifikace je však možno mapovat dynamiku MRD a tím významně přispět k vyhledávání rizikových pacientů, u kterých bude vhodné nasadit léčbu i bez klinických projevů nemoci a naopak bude možno určit pacienty, u kterých lze léčbu ukončit. Jakýkoliv marker onkologického onemocnění je nutno brát jako surogátní prognostický faktor, který znamená přítomnost určitého buněčného klonu, avšak nevyovídá nic o jeho biologickém chování, proto musí být hodnocen ve vztahu k určité konkrétní situaci (stav před léčbou, po léčbě, remise apod.). Molekulárně biologické sledování MRD je třeba chápat jako velmi užitečný doplněk běžných prognostických faktorů a indexů zejména v situaci, kdy tyto ztrácí svou rozlišovací schopnost (např. při dosažení klinické kompletní remise).

Poměrně naléhavá je nutnost vytvoření standardizovaných protokolů pro jednotlivé metody a patologické jednotky, což nebude jednoduché, neboť v oboru molekulární biologie dochází k velmi rychlému vývoji. Nicméně cesta ke změnám léčebných postupů povede nejspíše přes standardizaci molekulárně biologických metod monitorování MRD.

Pro určení prognózy pacienta bude důležitá nejen kde, v jakém množství a v jaké fázi onemocnění můžeme detekovat nádorové buňky, ale důležitá bude i poznat jejich biologický potenciál.

Literatura

- Gribben JG. Attainment of molecular remission- a worthwhile goal. *J Clin Oncol* 12: 1532-1534, 1994
- Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al.: Report of an International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Clin Onc* 17: 1244-1253, 1999
- Lion T: Clinical implications of qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis in the monitoring of patients with chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 14: 505, 1994
- Heim S, Mittelman F: *Cancer Cytogenetics* (ed 2). New York, NY, Wiley-Liss, 1995
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497, 1996
- Speicher MR, Ballard ST, Ward DC, et al.: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. *Nat Genet* 2: 368-375, 1996
- Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Long-Term Follow-Up of the Italian Trial of Interferon-alpha Versus Conventional Chemotherapy in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 92: 1541-1548, 1998
- Robertson LE, Huh YO, Butler JJ, et al: Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. *Blood* 80: 29-36, 1992
- Cabezudo E, Matutes E, Ramrattan M, et al: Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Leukemia* 11:1909-1914, 1997
- Jennings CD, Foon KA: Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90:2863-2892, 1997
- Rawstron AC, Kennedy B, Evans PAS, et al: Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 98: 29-35, 2001
- Martiat P, Maisin D, Philippe M et al.: Detection of residual BCR/ABL transcripts in chronic myelogenous leukemia patients in complete remission using polymerase chain reaction and nested primers. *Br J Haematol* 75: 355-358, 1999
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, et al: Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008, 1991
- Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, et al. Clinical significance of bone marrow metastases as detected using polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1996;14:1868-1876.
- Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, et al: Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85:2528-36, 1995
- Finke J, Slanina J, Lange W, Dolken G: Persistence of circulating t(14,18)-positive cells in long-term remission after radiation therapy for localized-stage follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 11: 1668-1673, 1993
- Pichert G, Alyea EP, Soiffer RJ, et al.: Persistence of myeloid progenitor cells expressing BCR-ABL mRNA after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 84: 2109-2114; 1994
- Ouspenskaia MV, Johnston DA, Roberts WM, et al: Accurate quantitation of residual B-precursor acute lymphoblastic leukemia by limiting dilution and PCR-based detection system: A description of the method and the principles involved. *Leukemia* 9: 321-8, 1995
- Slavičková A, Benešová E, Bradová V, Ullmannová V: Semikvantitativní sledování molekulárních markerů u ne Hodgkinských lymfomů. *Čas Lék Čes* 136: 221-225, 1997
- Slavičková A, Ullmannová V, Benešová E, Klenner P: Monitoring of residual disease in non-Hodgkin's lymphomas by quantitative PCR. *Molecular Biology of Hematopoiesis* 6, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, Chapter 23, 175-180, 1999
- Slavičková A, Ullmannová V, Klenner P: Optimized multiplex IgH/ras PCR: a tool for quantitative monitoring of B-lymphoproliferative disorders. *Biotechniques* 28:716-8, 720-1, 2000.
- Slavičková A, Ivánek R, Černý J, Šalková J, Trněný M: Clinical Relevance of Semi-Quantitative Monitoring of Lymphomas by Comparative PCR. *Clinical Laboratory* 47, 593, 2001
- Cross NCP, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes T, Goldman JM: Competitive Polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood* 82: 1929-1936; 1993
- Siebert PD, Larrick JW: PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques*, 14: 244-249, 1993
- Moravcová J, Lukašová M, Starý J, Haškovec C: Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* 12: 1303-1312, 1998
- Donovan JW, Ladetto M, Zou G, et al: Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 95:2651-2658, 2000
- Ladetto M, Donovan JW, Hargis S, et al: Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 6: 241-53, 2000
- Ladetto M, Sametti S, Donovan JW, et al: A validated real-time quantitative PCR approach shows a correlation between tumor burden and successful ex vivo purging in follicular lymphoma patients. *Exp Hematol* 29:183-93, 2001
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280, 1991
- Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van Leeuwen EF, et al.: IgH/TCR delta PCR oligonucleotide liquid hybridization, a fast and sensitive assay for monitoring minimal residual disease in childhood B-precursor ALL. *Leukemia* 9:216-222, 1995
- Voena C, Ladetto M, Astolfi M, et al: A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia* 11:1793-1798, 1997
- Pfützner T, Engert A, Wittor H, et al: A real-time PCR assay for the quantification of residual malignant cells in B cell chronic lymphatic leukemia. *Leukemia* 14:754-766, 2000
- Gribben JG, Neuberger D, Barber M, et al.: Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less

- predictive for relapse than detection in bone marrow. *Blood* 83: 3800-3807; 1994
34. Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, et al: Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphomas is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 88: 3314-3322; 1996
 35. Bendandi M, Gocke CD, Kobrin et al: Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccinations plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nature Medicine* 5: 1171-1177; 1999
 36. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, et al: The Clinical Significance of Molecular Response in Indolent Follicular Lymphomas. *Blood* 91: 2955-2960; 1998
 37. Gupta RK, Summers KE, Lister TA: PCR Analysis for the t(14;18) translocation in patients with recurrent follicular lymphoma following immunotherapy with rituximab (IDEC-C2B8). *Blood* 92, Suppl. 1 (Abstract 974); 1998.
 38. Mandigers CMPW, Meijerink JPP, Mensink EKBM, et al: Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood* 98: 940-944, 2001
 39. Drillenburg P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination (review). *Blood* 95:1900-1910, 2001
 40. Brenner MK, Rill DR, Moen RC, et al. Gene marking and autologous bone marrow transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 716: 204-214, 1994
 41. Pillarski LM, Hipperson G, Seeberger K, Pruski E, Coupland RW, Belch AR. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood*; 95:1056-1065, 2000
 42. Lemoli RM, Martinelli G, Olivieri A, et al. Selection and transplantation of autologous CD34+B-lineage negative cells in advanced phase multiple myeloma patients: a pilot study. *Br J Haematol* 107: 419-28, 1999
 43. Magni M, Di Nicola M, Devizzi L, et al: Successful in vivo purging of CD34-containing peripheral blood harvests in mantle cell and indolent lymphoma: evidence for a role of both chemotherapy and rituximab infusion. *Blood* 96:864-869; 2000
 44. Gupta D, Bybee A, Cooke F, et al: CD34+- selected peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with multiple myeloma: Tumor contamination and outcome. *Br J Hematology* 104: 166-177, 1999
 45. Sharp JG, Kessinger A, Mann S, et al: Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 14: 214-219, 1996
 46. Corradini P, Astolfi M, Cherasco C, et al: Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor autografts. *Blood* 89: 724-731; 1997
 47. Druker B. ABL protein tyrosine kinase inhibitors: potential clinical role in CML. In: Kantarjian H, Talpaz M, eds. *Medical Management of Chronic Myelogenous Leukemia*. Marcel Dekker, Inc; New York, NY. 1999, 395-411.
 48. Stetlet-Stevenson M, Raffeld M, Cohen P, Cossman J: Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. *Blood* 72:1822-1825, 1988
 49. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85:1416-1434, 1995
 50. Brisco MJ, Condon J, Hughes E et al.: Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantitation of residual disease at the end of induction. *Lancet* 343: 196-200; 1994
 51. Miyamura K, Tanimoto M, Morishima Y et al.: Detection of Philadelphia Chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction. Possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation. *Blood* 79: 1366-1370, 1992
 52. Cave H, Guidal C, Rohlich P et al.: Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of delta and gamma T- cell receptor genes. *Blood* 83: 1892-1902, 1994
 53. Gruhn B, Hongeng S, Yi H, et al: Minimal residual disease after intensive induction therapy in childhood lymphoblastic leukemia predicts outcome. *Leukemia* 12: 675- 681, 1998
 54. Vuillier F, Claisse JF, Vandenvelde C, et al. Evaluation of residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients in clinical and bone-marrow remission using CD5-CD19 markers and PCR study of gene rearrangements. *Leuk Lymph* 7: 195-204, 1992
 55. Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C et al. Eradication of polymerase chain reaction-detectable Chronic Lymphocytic Leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 88: 2228-2235, 1996
 56. Magnac C, Sutton L, Cazin B, et al: Detection of minimal residual disease in B Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Hematol Cell Ther* 41: 13-18, 1999
 57. Meloni G, Proia A, Mauro FR, et al: Unmanipulated peripheral blood stem cell autograft in chronic lymphocytic leukemia: clinical findings and biological monitoring. *Haematologica*, 85: 952-960, 2000
 58. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF, et al: Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC 10 trial. *Lancet* 351:700-708, 1998.
 59. Tobal K, Newton J, Macheta M, 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* 95: 815-819, 2000
 60. 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-transcription polymerase chain reaction of the PML/RAR fusion gene. *Blood* 90: 1321- 1325; 1997
 61. Lo Coco F, Diverio D, Falini B, et al. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of promyelocytic leukemia. *Blood* 94: 12-22, 1999
 62. Kusec R, Laczika K, Knobl P et al.: AML1/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 8: 735-739; 1994
 63. Miller WH, Levine K, DeBlasio A, et al.: Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR-alpha mRNA. *Blood* 82: 1689-1694, 1993
 64. Diverio D, Rossi V, Avvisati G, et al. for the GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto) and AIEOP Cooperative Groups. Early Detection of Relapse by Prospective Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of the PML/RARa Fusion Gene in Patients With Acute Promyelocytic Leukemia Enrolled in the GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial (All-trans retinoic acid plus Idarubicin). *Blood* 92: 784-789; 1998
 65. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, et al: Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 96: 3948-3952; 2000
 66. Lo Coco F, Diverio D, Avvisati G, et al: Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94:2225-2229, 1999
 67. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al: Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 63: 789-799, 1984
 68. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, et al: Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to Interferon-a therapy. *The Leukemia Service. Ann Intern Med* 122: 254- 261, 1995
 69. Roth MS, Antin JH, Ash R et al.: Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 79: 276- 282; 1992
 70. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM: Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: Role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood* 77: 874- 878, 1991
 71. Lion T, Henn T, Gaiger A, Kahls P, Gadner H: Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Lancet* 341: 275-276, 1993
 72. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, et al: Genetic marking shows that Ph+ cells present in chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 82: 3068- 3076, 1994
 73. Corradini P, Voena C, Astolfi M, et al: High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood* 85:1596- 1602, 1995
 74. Corradini P, Voena C, Tarella C, et al: Molecular and clinical remission in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol* 17:208-15, 1999
 75. Martinelli G, Terragna C, Lemoli RM, et al: Clinical and molecular follow-up by amplification of the CDR-III IgH region in multiple myeloma patients after autologous transplantation of hematopoietic CD34+ stem cells. *Haematologica* 84:397-404, 1999
 76. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, et al: Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 18:2273-81, 2000
 77. Attal M, Harousseau J, Stoppa A, et al: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 335:91-97, 1996
 78. Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, et al: Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 93: 55-65, 1999
 79. Tribalto M, Amadori S, Cudillo L, et al: Autologous peripheral blood stem cell transplantation as first line treatment of multiple myeloma: an Italian multicenter study. *Haematologica* 85: 52- 58, 2000
 80. Bensinger WI, Buckner CD, Anasetti C, et al: Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome *Blood* 88: 2787-2793, 1996
 81. Cavo M, Bandini G, Benni M, et al: High-dose busulfan and cyclophosphamide are an effective conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation in chemosensitive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 22: 27-32, 1998
 82. Rondelli D, Bandini G, Cavo M, et al: Discrepancy between serological complete remission and concomitant new bone lytic lesions after infusion of escalating low doses of donor lymphocytes in multiple myeloma: a case report. *Bone Marrow Transplant* 24: 685-687, 1999
 83. Björkstrand B, Ljungman P, Svensson H, et al: Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 88: 4711- 4718, 1996
 84. Cavo M, Terragna C, Martinelli G, et al: Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 96: 355-357, 2000
 85. Gribben JG, Freedman AS, Neuberger D, et al: Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 325: 1525-1533, 1991

86. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16: 2825-2833, 1998
87. McLaughlin P, Hagemester FB, Swan F, et al: Intensive conventional-dose chemotherapy for stage IV low-grade lymphoma: high remission rates and reversion to negative of peripheral blood bcl-2 rearrangement. *Ann Oncol* 5, Suppl 2: 73-77, 1994
88. Cabanillas F. Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure free survival in indolent follicular lymphoma - Update of MDACC Series. Program and abstracts of Lymphoma: The Next Questions; Palm Desert, California, USA, 1999
89. Crawley CR, Foran JM, Gupta RK, et al: A phase II study to evaluate the combination of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone (FMD) in patients with follicular lymphoma. *Ann Oncol* 11: 861- 865, 2000
90. Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT, et al: High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: results of a phase II clinical trial. *Blood* 97: 404-409, 2001
91. Freedman AS, Neuberger D, Mauch P, et al: Long-Term Follow-Up of Autologous Bone Marrow Transplantation in Patients With Relapsed Follicular Lymphoma. *Blood* 94: 3325-3333; 1999
92. Gribben JG, Neuberger D, Freedman AS, et al: Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl 2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 81: 3449, 1993.
93. Andersen NS, Donovan JW, Borus JS, et al: Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 90: 4212-4221; 1997
94. Maloney DJ, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al: IDEC-C2B8 (rituximab) anti-CD20 antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90: 2188-2195, 1997
95. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: A multicenter phase II study. *Blood* 92: 1927-1932, 1998
96. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al: Treatment of Patients With Low-Grade B-Cell Lymphoma With the Combination of Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody and CHOP Chemotherapy. *J Clin Oncol* 17: 268-276; 1999
97. Solal-Celigny Ph, Salles G, Brousse N, et al: Rituximab as first-line treatment of patients with follicular lymphoma (FL) and a low-burden tumor: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 94: Abstract 2802, 1999
98. Emmanouilides C, Teletar M, Rosen P, et al: Excellent tolerance of rituxan when given after mitoxantrone-cyclophosphamide: An effective and safe combination for indolent NHL. *Blood* 94: Part 1, Suppl 1, 402, 1999
99. Vose JM, Link BK, Grossbard ML. Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated intermediate or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1999;10 (suppl 3):195a.
100. Foran JM, Rohatiner AZS, Cunningham D, et al: European Phase II Study of Rituximab (Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for Patients With Newly Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma and Previously Treated Mantle-Cell Lymphoma, Immunocytoma, and Small B-Cell Lymphocytic Lymphoma. *J of Clin Oncol* 18: 317-324; 2000
101. Gianni AM, Magni M, Di Nicola M, et al: In vivo purging of circulating CD34+ progenitor cells in low-grade lymphoma with rituximab and high-dose chemotherapy. *Blood* 92: Part 1, Suppl 1, 481, 1998
102. Buckstein R, Imrie K, Spaner D, et al: Stem cell function and engraftment is not affected by „in vivo purging“ with rituximab for autologous stem cell treatment for patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 26 (suppl 4):115-122, 1999
103. Černý J, Trněný M, Slavičková A, Procházka B: The Clinical Outcome of Patients with B-cell Lymphoproliferative Disease (B-LPD) Seems to Be Improved by the Success in Induction of Polymerase Chain Reaction (PCR) Negativity Achieved by High Dose Therapy with Autologous Stem Cell Transplantation or Rituximab Therapy. *The Hematology Journal*, 2: 1, Suppl, 148-149, 2001
104. Trněný M, Černý J, Papajík T, Slavičková A, Procházka B, Indrák K, Klener P: Anti CD20 antibody (rituximab) therapy leads to high molecular remission rate with favourable outcome in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 98, Part 1, Suppl, 2537, 2001
105. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503- 511, 2000
106. Shipp M, Tamayo P, Angelo M, et al: Diffuse large B cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling. *Blood* 96: Part 1, Suppl, 948, 2000