zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 110
proLékaře.cz | 5.12.2026

Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukemií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory: jak se vyhnout špatné interpretaci výsledků

Froňková E., Trka J.
CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague,
Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF Praha

Souhrn

Hodnocení minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukemií pomocí kvantifikace klonálně specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory je v současné době považováno za standardní laboratorní postup. Výsledky této metody jsou stále častěji využívány v léčebných protokolech pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin s různě intenzívní terapií nebo přímo pro volbu konkrétních léčebných postupů. Vzhledem k náročnosti metodiky je třeba dodržovat technická a interpretační kritéria, která umožňují plnou reprodukovatelnost metody a zaručují klinickou validitu výsledků. Autoři shrnují současný pohled na provádění a interpretaci této moderní laboratorní metody a upozorňují na možná rizika plynoucí z nedodržení těchto kritérií.
Klíčová slova: akutní lymfoblastická leukemie; RQ-PCR; přestavby Ig/TCR; minimální reziduální nemoc

Summary
Froňková E., Trka J.: Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using quantification of immunoglobulin and T-cell receptor genes rearrangements. How to avoid misinterpretation of the results

Currently, qualification of clonal immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements is considered to be a standard laboratory investigation to evaluate minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Benefit of this method contributes more often to therapeutic protocols that stratify patients into the groups according to the need of differently intensive therapy or particular therapeutic regimen. Regarding complexity of the method, it is necessary to follow technical and interpretative criteria that enable reproducibility and clinical validity of the method. The authors summarize current view on design and interpretation of this modern laboratory method. They also notice possible risks when these criteria were broken.
Key words: acute lymphoblastic leukemia, RQ-PCR, Ig/TCR rearrangements, minimal residual disease

Trans. Hemat. dnes, 11, 2005, No. 3, p. 110–114.

Úvod

Zájem o fenomén minimální reziduální nemoci (MRN) u akutních leukemií pochází už ze sedmdesátých let (1). Pionýrské práce z devadesátých let prokázaly přímý klinický význam hodnocení MRN (2-4) a díky tomu se postupně tato metoda (původně pouze výzkumná) začala upravovat pro klinické užití.

V případě akutních lymfoblastických leukemií (ALL) je zatím uznávána jako nejspolehlivější metoda kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory specifických pro daný leukemický klon pomocí PCR v reálném čase. Její výhodou proti průtokové cytometrii (jediné další metodě s téměř univerzálním uplatněním) zůstává stabilita přestaveb na DNA úrovni i v případě měnícího se fenotypu leukemické buňky v průběhu terapie a celkově vyšší senzitivita. Na rozdíl od kvantifikace fúzních transkriptů (např. TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4) je použitelná pro naprostou většinu pacientů (přibližně 95 %), navíc není ovlivněna viabilitou analyzovaných buněk. Z těchto důvodů se tato metoda v posledních letech stává ve stále větší míře součástí léčebných protokolů, a to i přes svou značnou časovou, finanční i laboratorní náročnost. Německý protokol ALL-BFM 2000 a italský protokol AIEOP LLA 2000 pro léčbu dětské ALL vychází mimo jiné z retrospektivní analýzy, která ukázala, že hladiny MRN na konci indukční léčby (týden 5) a před začátkem konsolidační léčby (týden 12) dobře odděluje pacienty s nízkým a s vysokým rizikem relapsu (3). Tyto dva protokoly definují rizikové skupiny pro léčbu právě podle prospektivně měřených hladin MRN. Dalším využitím této metody je léčba relapsů dětské ALL. Německý protokol ALL-REZ BFM 2002 při stratifikaci pacientů v největší skupině S2 vychází z práce, která ukázala na negativní prognostický význam vysoké hladiny MRN po indukční fázi léčby relapsu (5). Pacienti s hladinou MRN v tomto časovém bodě vyšší než 10^{-3} jsou indikováni k nepříbuzenské transplantaci hemopoetických progenitorů (HSCT). Evropská skupina *Pre-BMT-MRD-Study-Group*, jejímž členem je i naše laboratoř, prokázala, že

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 111
proLékaře.cz | 5.11.2026

jakákoli hladina MRN před transplantací významně zvyšuje pravděpodobnost relapsu po transplantaci (6). Monitorování hladin MRN po transplantaci umožňuje včasné léčebné zásahy, například v podobě adoptivní imunoterapie (infuze dárcovských lymfocytů - DLI, vysazení imunosuprese) (7).

V naší laboratoři se zabýváme metodou kvantifikace přestaveb imunoreceptorových genů od roku 2001, v současné době ji rutinně používáme u pacientů s relapsem léčených podle protokolu ALL-REZ BFM 2002 a dále u všech pacientů podstupujících HSCT. Pacienti se záchytem ALL jsou v České Republice léčeni podle protokolu ALL IC-BFM 2002, který pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin nepoužívá kvantitativní detekci MRN. Tu provádíme pouze jako výzkumnou součást protokolu, abychom zjistili, zda jiná kritéria pro stratifikaci (věk, odpověď na prednison, leukocytóza, pokles blastů ve dřeni podle morfologických kritérií ve dnech 15 a 33 léčby) mohou korespondovat s poklesem MRN (8).

Z výše uvedeného využití v klinických protokolech se může zdát, že se jedná o metodu rutinní a spolehlivě definovanou. To však platí jen pro laboratoře s největší zkušeností, ale i mezi nimi dochází dosud v některých případech k neshodám v interpretaci výsledků. Z těchto důvodů byla založena skupina *ESG-MRD-ALL* (European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia), která sdružuje 23 evropských a nyní i mimoevropských laboratoří, zabývajících se touto problematikou. Její členové se pravidelně setkávají na společných schůzkách, dvakrát ročně je pořádána i kontrola kvality. Na základě společných zkušeností jsou pak zpracovávána metodická doporučení a jsou dále upravována pravidla pro interpretaci výsledků. Otevřenými tématy stále zůstává výběr vhodných Ig/TCR cílů a jejich stabilita, postup v případě oligoklonálních přestaveb a především interpretace výsledků s vyloučením možnosti falešné pozitivity a negativity.

Výběr cílů

V roce 1999 publikovala skupina laboratoří sdružených v programu BIOMED-1 standardizovaný postup pro detekci nejčastějších přestaveb imunoreceptorových genů vyskytujících se u ALL. Jedná se o kompletní V-(D)-J přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů (IgH) (9), klonálně specifické delece lehkého řetězce kapa (Igκ) a přestavby T buněčného receptoru gama (TCRγ) a delta (TCRδ) (10). V roce 2003 byl tento soubor rozšířen skupinou BIOMED-2 na celkem 107 primerů v 18 multiplexních reakcích, jejichž kombinací je již možno teoreticky detekovat všechny klonální B lymfoproliferace, a to i u malignit s vysokým zastoupením somatických hypermutací. Totéž platí díky zahrnutí přestaveb TCRβ i pro klonální T buněčné populace (11).

Určení klonality

Po získání PCR produktů je třeba odlišit klony s identickými přechodovými oblastmi od polyklonálních lymfoidních buněk. Při malých rozdílech v délce těchto oblastí nelze na klasickém agarózovém gelu určit, zda jde o směs různě dlouhých produktů nebo o jediný produkt. Na základě zkušeností zúčastněných laboratoří jsou doporučovány dvě techniky: analýza heteroduplexů a GeneScanning (analýza pomocí kapilární elektroforézy). Analýza heteroduplexů se provádí na 6-8% polyakrylamidovém gelu po denaturaci produktů PCR (5 minut při 95 °C) následované rychlou renaturací (1 hodina při 4 °C). Homoduplexy formované z monoklonálních produktů díky stejné rychlosti migrace vytvoří jediný proužek, heteroduplexy vzniklé náhodným spojením polyklonálních produktů migrují v gelu pomaleji a vytvoří neostře ohraničený široký pruh („smear“). Lze také dobře odlišit produkty bi- a oligoklonální. GeneScanning odliší denaturované produkty PCR s velkým rozlišením pouze podle délky. Jde o metodu relativně rychlou a jednoduchou, nevýhodou zůstává potřeba značení PCR primerů fluorochromem a nemožnost odlišit stejně dlouhé, ale sekvenčně odlišné produkty PCR (např. biklonální). V naší laboratoři používáme k určení klonality analýzu heteroduplexů. Vhodné monoklonální proužky sterilně vyřízneme, eluujeme ve vodě, reamplifikujeme pomocí stejné sady primerů a získané produkty přečistíme a sekvenujeme (12).

Navržení klonálně specifických primerů a optimalizace RQ-PCR

Získané sekvence přechodových V-(D)-J oblastí lze vyhodnotit pomocí databází volně přístupných na internetu například:

http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire,
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast,
http://www.dnaplot.de.

K popisu sekvencí a navržení klonálně specifických primerů používáme software VECTOR NTI 8 Suite (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Primery navrhujeme tak, aby je bylo možno použít v RQ-PCR s hydrolyzační sondou a reverzním primerem umístěnými v konsensus oblasti dané přestavby (13–17).

Pro tvorbu specifických primerů sice kromě obecných doporučení existují určitá pravidla, v zásadě ale při jejich navrhování záleží především na zkušenosti. Je výhodné vyzkoušet pro každý systém minimálně dva, protože rozdíly v dosažené senzitivitě i specifitě RQ-PCR bývají velké. Pro kvantifikaci používáme v naší laboratoři přístroje PCR ABI PRISM 7700 (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA) a iCycler iQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Pro tvorbu standardní křivky je doporučeno ředit DNA z diagnostického vzorku pacienta do „negativní“ DNA získané od zdravých dárců („buffy coat“). Při měření používáme standardně ředění 10^{-1}–10^{-5}. Aby bylo později možné přesně stanovit hladinu MRN, je třeba stanovit koncentraci DNA diagnostického i všech sledovacích vzorků pomocí kvantifikace kontrolního genu. Většina laboratoří používá k tomuto účelu gen pro albumin (18). Při optimalizaci RQ-PCR se pomocí změn annealingové teploty, poměru koncentrace pri-

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 112
proLékaře.cz | 5.12.2026

merů a změn koncentrace Mg^{2+} snažíme dosáhnout co největší senzitivity a specifity systému. Podle pravidel ESG-MRD-ALL je požadován pro každého pacienta nejméně jeden systém s minimální citlivostí 10^{-4}. Definice pojmů senzitivita a specifita je poměrně složitá:

Slovníček
Ct = hodnota Ct stoupá s klesající koncentrací templátu ve vzorku
Ředění = se zvyšujícím se ředěním klesá koncentrace templátu ve vzorku

Kritéria pro senzitivitu RQ-PCR (19)

(upraveno na poslední schůzce skupiny *ESG-MRD-ALL* v červnu 2004)
Senzitivitou PCR rozumíme nejvyšší ředění, které:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky),
- má nejméně jeden vzorek z replikátu pozitivní; rozdíl Ct („threshold cycle“) replikátů nerozhoduje,
- má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od Ct neředěného vzorku nebo
- má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od interceptu standardní křivky.

Pro potřeby přesné interpretace výsledků byl nově definován pojem rozmezí kvantifikovatelnosti („quantitative range“, QR). Všechny pozitivní hodnoty pod touto hodnotou by měly být uváděny pouze jako „pozitivní“, bez uvedení číselné hodnoty výsledku.

Kritéria pro rozmezí kvantifikovatelnosti RQ-PCR

Rozmezím kvantifikovatelnosti nazýváme nejnižší ředění, které:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky)
- rozdíl Ct replikátů ≤ 1,5
- jeho průměrná hodnota Ct je o 3,0-4,0 cykly větší než předchozí 10x nižší ředění (nebo o 0,5-1,5 cyklu vyšší než předchozí 5x nižší ředění)
- standardní křivka se zahrnutím tohoto ředění má sklon („slope“) mezi -3,1 a –3,9 a korelační koeficient ≥ 0,98.

Kritéria pro specifitu RQ-PCR

Velkým problémem v případě genů pro imunoreceptory je pozadí zdravých lymfocytů, což platí zvláště pro systémy s menším množstvím rekombinovatelných genových segmentů a tedy s menším počtem pravděpodobně vzniklých kombinací. Jedná se tedy zejména o TCRγ, TCRδ a delece Igκ. V případě krátkých N-segmentů nebo nevhodně navržených primerů může ale k nespecifickému nasedání primerů na DNA „zdravých“ lymfocytů dojít v kterémkoli systému. Aby se v co největší míře zabránilo možnosti vzniku falešně pozitivního výsledku, používá se jako negativní kontrola DNA z „buffy coatu“ smíchaná od co největšího počtu zdravých dárců (minimální doporučený počet je 5, většina laboratoří včetně naší používá 10), a to podle doporučení nejméně v šesti replikátech. Tím přibývají k výše uvedeným pravidlům pro interpretaci další.
Rozmezí kvantifikovatelnosti tedy musí splňovat všechny předešlé podmínky a zároveň:

- jeho průměrná hodnota Ct musí být nejméně o 3 cykly nižší než nejnižší Ct hodnota pozadí.
  Senzitivitou pak nazýváme takovou hodnotu ředění, která splňuje všechny předešlé podmínky a zároveň:
- nejméně jedna hodnota Ct je o nejméně jeden cyklus nižší než nejnižší Ct hodnota pozadí.

Analýza MRN v daném vzorku

Kritéria pro interpretaci výsledků se liší v závislosti na protokolu, společná zůstávají tato základní pravidla:
Hodnotu MRN ve vzorku lze vyjádřit numericky pomocí standardní křivky s korekcí podle kontrolního genu, jestliže:

- průměrná Ct hodnota replikátů ≤ nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti a Δ Ct replikátů vzorku je ≤ 1,5.

Pokud je průměrná Ct hodnota replikátů ≥ nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti, hodnotí se vzorek pouze jako „pozitivní“.
Vzorek je dále pokládán za pozitivní, pokud:

- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je v rozmezí 4 cyklů od senzitivity systému a
- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o ≥ 1,0 nižší než nejnižší Ct pozadí.

Toto poslední pravidlo patří vzhledem k možnosti vzniku falešné pozitivity k nejspornějším a nejdiskutovanějším, proto bylo na schůzce *ESG-MRD-ALL* v roce 2004 dále rozšířeno s ohledem na to, pro jaké klinické aplikace bude výsledek použit.

Při použití pro aplikace, kde je třeba se vyhnout falešné negativitě, například z důvodů redukce léčby MRN negativních pacientů, je vzorek pokládán za pozitivní, pokud:

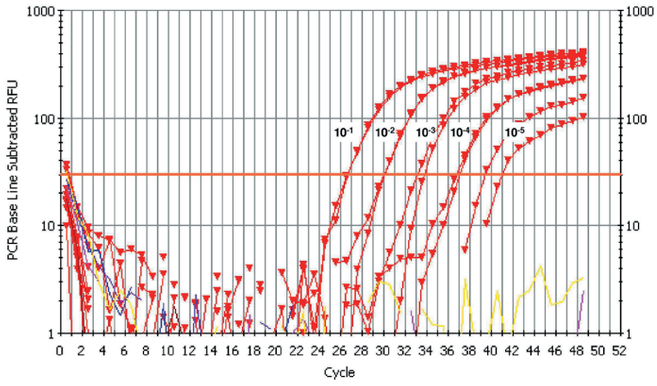
- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o ≥ 1,0 nižší než nejnižší Ct pozadí.
- Při použití pro aplikace, kde je třeba se vyhnout falešné pozitivitě, například z důvodu nasazení DLI po HSCT, je vzorek pokládán za pozitivní, pokud:
- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o ≥ 3,0 nižší než nejnižší Ct pozadí.

Diskuse

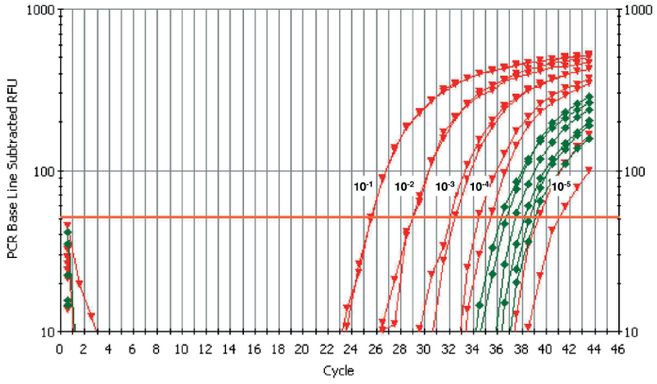
Detekce MRN u akutních leukemií už v tuto chvíli prokazuje svou klinickou hodnotu. Zejména v léčebných protokolech pro terapii dětských ALL jsou kriteria MRN použita jako stratifikační (např. ALL-BFM 2000 a AIEOP LLA 2000) nebo jako přímo rozhodující pro léčebnou strategii (protokol ALL-REZ BFM 2002 pro léčbu relapsů dětské ALL). Důležitou úlohu hraje stanovení MRN také v regulaci potransplantační péče.

Rozhodnutí o významném zásahu do dalšího průběhu, jakým je například indikace HSCT v léčbě relapsu dětské

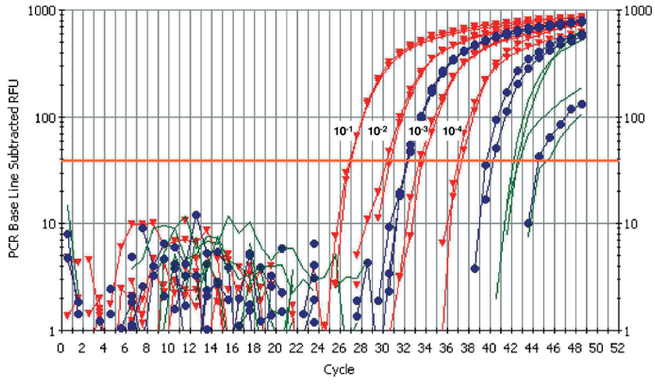
zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 113
proLékaře.cz | 5.12.2026



Obr. 1. Amplifikace klonálně specifické delece Igκ u pacienta s ALL. Senzitivita systému je 10^{-5} (poslední ředění, které se amplifikuje), rozmezí kvantifikovatelnosti je 10^{-4}, protože Δ Ct replikátů u ředění 10^{-5} je větší než 1,5.



Obr. 2. Amplifikace klonálně specifické přestavby IGH u pacienta s ALL. Senzitivita systému je 10^{-4}, protože jeden vzorek z duplikátu má Ct o více než 1 cyklus nižší než je nejnižší Ct „buffy coatu" (zelené křivky). Rozmezí kvantifikovatelnosti je ale pouze 10^{-3}. V případě tohoto systému je vhodné přidat ředění $5x10^{-4}$. Pokud by jeho průměrné Ct vyšlo o více než 3 cykly před „buffy coatem", zvýší se QR na $5x10^{-4}$.



Obr. 3. Amplifikace klonálně specifické přestavby TCRδ u pacienta s ALL. Senzitivita i rozmezí kvantifikovatelnosti systému je 10^{-4}. Měřeny byly dva vzorky pacienta v triplikátu (modré křivky). Hodnotu MRN ve vzorku č. 1. lze po úpravě podle kontrolního genu vyjádřit číselně jako poměr k počtu blastů v diagnóze. Vzorek č. 2 by byl označen jako „pozitivní", pokud by byl použit při rozhodování o zařazení do rizikové skupiny (například v protokolu ALL BFM 2000). Na základě jeho výsledku by se ale nemělo terapeuticky zasáhnout, pokud by se rozhodovalo např. o aplikaci DLI po transplantaci: nejnižší Ct pozadí (zelené křivky) není o více než 3 cykly vyšší než nejnižší Ct vzorku).

ALL, vyžaduje spolehlivou metodiku měření hladin MRN a zejména správnou interpretaci těchto výsledků. Právě v posledně zmíněném protokolu je rozhodující úrovní MRN (stanovenou arbitrážně na základě retrospektivní analýzy rozsáhlého souboru pacientů) (5) hladina 10^{-3}. Teoreticky tak pacient s typem relapsu S2 a s hladinou MRN v daném časovém bodu protokolu rovnou $1,1x10^{-3}$ podstoupí HSCT, zatímco pacient s hladinou rovnou $9,9x10^{-4}$ bude pokračovat pouze v chemoterapii. Přesná kvantifikace je tedy naprostou nutností. V případě protokolů ALL-BFM 2000 a AIEOP LLA 2000, kde o přeřazení z nízko rizikové do středně riziko-

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 114
proLékaře.cz | 5.12.2026

vé větve protokolu může rozhodnout jakákoli detekovaná pozitivita, je třeba ji zase přesně oddělit od falešné pozitivity pozadí.

Přesné a detailní pokyny, přijaté skupinou ESG-MRD-ALL, přesně definují jak senzitivitu, tak specifitu daného systému RQ-PCR. Nemůže se tedy stát, že se hladina MRN určí podle technicky nedokonalého, špatně optimalizovaného systému - pravidla pro sklon a chybu standardní křivky to vylučují. Použití hexaplikátu negativní kontroly, kterou je vždy polyklonální DNA z normálních lymfocytů a nikoli pouze voda, zase oddělí falešně pozitivní výsledky v reziduálních vzorcích. Protože pouhý mechanistický pohled na tato kritéria nemusí vždy vyhovovat realitě, byla kritéria upravena pro situace, kdy je třeba se vyhnout falešné negativitě nebo falešné pozitivitě (viz výše).

Opatrně a koncízně je třeba přistupovat i k hodnocení dynamiky MRN. Je třeba mít na paměti technické limity metody PCR: je-li rozdíl Ct mezi duplikáty vzorku pacienta ≥ 1,0, výsledná hodnota koncetrace templátu ve vzorku bude kolísat o 100 % a více. Hodnotit tedy dynamiku MRN mezi dvěma vzorky v tomto rozmezí hladin MRN je zavádějící.

Obtížněji definovatelným, ale důležitým prvkem hodnocení hladin MRN, je komunikace mezi pracovníky laboratoře a lékaři/kliniky. V ideálním případě by vyšetření až do fáze stanovení hladiny MRN ve vzorku mělo probíhat bez znalosti současného klinického stavu pacienta. Toto pravidlo není často možno dodržet, protože se na laboratorní práci lékaři přímo podílejí. To je naopak výhodou při interpretaci výsledků sledování. Intenzivní kontakt laboratoř-klinika a přesné pochopení termínů, které se objevují na písemně vydávaných protokolech o vyšetření, jsou nezbytné. Jen tak je možno spolehlivě interpretovat např. fakt, že za určitých okolností nemusí „pokles“ hladiny MRN z kvantifikovatelných hodnot do oblasti „pozitivita“ znamenat skutečnou změnu v dynamice MRN, ale pouze horší technickou kvalitu konkrétního RQ-PCR experimentu.

Pracoviště, které hodlá využívat tuto metodiku pro klinicky relevantní stanovení hladin MRN (tedy k indikaci léčebných zásahů), by mělo mít jistotu, že zavedené postupy bezchybně fungují. Mezinárodní kontrola kvality skupiny ESG-MRD-ALL, která vyžaduje analýzu klonality, detailní rozbor zadaných sekvencí přestaveb a určení hladiny MRN slepých vzorků a probíhá dvakrát ročně od roku 2001, tuto záruku poskytuje.

Kvantitativní detekce klonálně specifických přestaveb Ig/TCR je tedy velmi významný a účinný nástroj v hodnocení odpovědi na léčbu u pacientů s ALL. Při dodržení všech technických a interpretačních pravidel může pomoci pacientům snížit jak riziko relapsu, tak i rizika spojená s přeléčením („over-treatment“) jejich nemoci.

Literatura

1. **Gutterman JU, Mavligit G, Burgess MA, et al**. Immunodiagnosis of acute leukemia: detection of residual disease. J Natl Cancer Inst 1974; 53: 389-92.
2. **Brisco J, Hughes E, Neoh SH, et al.** Relationship between minimal residual disease and outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. Blood 1996; 87: 5251-6.
3. **van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al.** Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 1998; 352: 1731-8.
4. **Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, et al.** Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1998; 100: 235-44.
5. **Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al.** Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2001; 358: 1239-41.
6. **Krejci O, Van der Velden V, Bader P, et al.** Level of Minimal Residual Disease Prior to Haematopoietic Transplantation Predicts Prognosis in Paediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia: A Report of the pre-BMT-MRD Study Group. Letter. Bone Marrow Transplantation 2003; 32: 849-51.
7. **Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, et al.** Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. Leukemia 1999; 13: 2079-86.
8. **Fronkova E, Reznickova L, Muzikova K, et al.** Minimal Residual Disease Identifies Differences between the Risk Group Defined by the ALL IC-BFM 2002 and the ALL-BFM 2000 Protocols. Poster. 46th ASH Meeting, San Diego, California. Blood 2004; 104: 1085.
9. **Szczepanski T, Pongers Willemse MJ, Langerak AW, et al.** Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. Blood 1999; 93: 4079-85.
10. **Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, et al.** Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 1999; 13: 110-18.
11. **van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al**. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17: 2257-2317.
12. **Madžo J, Mužíková K, Froňková E, et al.** Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování reziduální nemoci u dětí s akutní lymfoblastickou leukemií? Transfuze a hematologie *dnes*. 2004;10: 137-142.
13. **Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al.** Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2000; 14: 1426-1435.
14. **van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ**. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. Leukemia 2002; 16: 928-36.
15. **van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, van Wering ER, van Dongen JJ.** T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lym-

zlom Transfuze 3 12.9.2005 13:44 Stránka 115
proLékaře.cz | 5.12.2026

phoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. Leukemia 2002; 16: 1372-80.
16. **Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, van Gastel-Mol EJ, Oud ME, van Dongen JJ.** Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in non-lymphoid cells. Blood 2001; 98: 2456-2465.
17. **van der Velden VH, Bruggemann M, Hoogeveen PG, et al.** TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. Leukemia 2004; 18: 1971-80.
18. **Pongers Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al.** Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. Leukemia 1998; 12: 2006-14.
19. **van Der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen JJ.** Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 2003; 17: 1013-34.

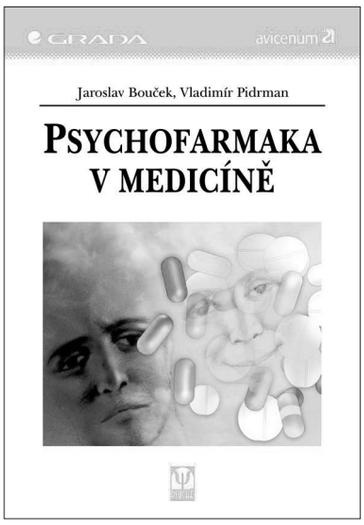
Došlo do redakce: 18. 3. 2005
Přijato: 10. 7. 2005

MUDr. E. Froňková
CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague
Laboratorní centrum
Kliniky dětské hematologie a onkologie
UK 2. LF Praha
V Úvalu 84
150 06 Praha 5

Korespondující autor:
Doc. MUDr. J. Trka, Ph.D.
jan.trka@lfmotol.cuni.cz

Podpora

Práce byla podpořena grantem IGA MZ 6929, výzkumným záměrem MŠMT MSM0021620813 a VZ MZ 00064203.



PSYCHOFARMAKA V MEDICÍNĚ

Jaroslav Bouček, Vladimír Pidrman

Monografie určená pro postgraduální vzdělávání informuje lékařskou obec o současném stavu vývoje a dostupnosti psychofarmak u nás, o jejich léčebném využití v psychiatrii a v ostatních lékařských oborech. Je určena psychiatrům, klinickým psychologům, praktickým lékařům, internistům, neurologům a lékařům dalších odborností.

Vydala Grada Publishing v roce 2005, ISBN 80-247-1136-2, B5, šitá vazba, 288 stran, cena 399 Kč.

Publikaci můžete objednat na adrese: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz