

Review

PROGNOSTIC FACTORS OF CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Aleksandra Jovanovska¹, Kata Martinova¹¹ University Clinic for Children's Disease, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Medicine, Republic of North Macedonia**Citation:** Jovanovska A, Martinova K. Prognostic factors of childhood acute lymphoblastic leukemia –review of literature. Arch Pub Health 2021; 13 (1).

doi.org/10.3889/aph.2021.5732

Key words: acute lymphoblastic leukemia, children, prognostic factors, minimal residual disease, survival.***Correspondence:** Aleksandra Jovanovska, University Clinic for Children's Disease, Skopje, Republic of North Macedonia E-mail: jovanovska.a@gmail.com**Received:** 10-Jan-2021; **Revised:** 28-Feb-2021;**Accepted:** 3-Mar-2021; **Published:** 10-Mar-2021**Copyright:** © 2021. Aleksandra Jovanovska, Kata Martinova. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited**Competing Interests:** The author have declared that no competing interests**Abstract**

The treatment outcome of acute lymphoblastic leukemia (ALL) has remarkably improved over the recent decades, leading to a 5-year overall survival rate up to 90%. This impressive achievement is mainly due to the use of effective multi-agent chemotherapy regimens and the precise stratification of patients into risk groups based on well defined prognostic factors including the clinical features that are present at diagnosis, biologic and genetic features of leukemia cells, and early response to treatment. Patients classified as low risk are treated with less intensive therapy, whereas more aggressive regimens are reserved for those with high-risk features. Currently, minimal residual disease (MRD) is the most important and independent predictor of treatment outcome. This review will describe the clinical, biological, and response-based features and current evidence supporting their clinical application in childhood ALL.

Преглед на литература

ПРОГНОСТИЧК И ФАКТОРИ КАЈ ДЕТСКАТА АКУТНА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕУКЕМИЈА

Александра Јовановска¹, Ката Мартинова¹¹ Универзитетска клиника за детски болести; Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Медицински факултет, Република Северна Македонија**Цитирање:** Јовановска А, Мартинова К. Прогностички фактори кај детската акутна лимфоblastна леукемија-преглед на литература. Арх Ј Здравје 2021;13(1)

doi.org/10.3889/aph.2021.5732

Клучни зборови: акутна лимфоblastна леукемија, деца, прогностички фактори, минимална резидуална болест, преживување .***Кореспонденција:** Александра Јовановска, Универзитетска клиника за детски болести, Скопје, Република Северна Македонија. E-mail: jovanovska.a@gmail.com**Примено:** 10-јан-2021; **Ревидирано:** 28-фев-2021; **Прифатено:** 3-мар-2021; **Објавено:** 10-мар-2021**Печатарски права:** ©2021 Александра Јовановска, Ката Мартинова. Оваа статија е со отворен пристап дистрибуирана под условите на нелицензирана лиценца, која овозможува неограничена употреба, дистрибуција и репродукција на било кој медиум, доколку се цитираат оригиналните автор(и) и изворот.**Конкурентски интереси:** Авторот изјавува дека нема конкурентски интереси.**Извадок**

Во последните неколку декади е остварен значаен напредок во терапискиот исход кај детската акутна лимфоblastна леукемија (АЛЛ), што резултира со денешно 5-годишно вкупно преживување кое достигнува до 90%. Овој импресивен успех се должи на примената на ефикасни, комбинирани хемотераписки режими и прецизна стратификација на пациентите во ризични групи според добро дефинирани прогностички фактори кои ги вклучуваат клиничките карактеристики присутни при дијагнозата, биолошките и генетските карактеристики на леукемиските клетки и раниот одговор на терапија. Пациентите кои се класифицираат во прогностичка група со низок ризик се третираат со помалку интензивна терапија, додека за тие со високо-ризични карактеристики се применуваат поагресивни режими. Минималната резидуална болест (МРБ) во моментот претставува најважен и независен предиктор на терапискиот исход. Во овој ревијален труд се опишани клиничките, биолошките карактеристики и раниот одговор на терапија како и актуелните сознанија кои ја поддржуваат нивната клиничка примена кај детската АЛЛ.

Вовед

Извонредниот напредок во третманот на детската акутна лимфобластна леукемија (АЛЛ) во последните неколку декади претставува еден од најголемите успеси во модерната медицина. Од речиси униформно фатална болест во 60-тите години на минатиот век, со развојот на ефикасни тераписки протоколи и прецизна стратификација на пациентите во ризични групи според добро дефинирани прогностички фактори, денешната стапка на 5-годишно вкупно преживување во голем број развиени земји низ светот достигнува до 90% (табела 1).¹⁻⁷ Сепак, прогнозата кај одредени подгрупи на детската АЛЛ е сè уште сериозна, и тука се вклучуваат пациентитесо релапси,⁸ леукемијата во доенечка возраст⁹ и одредени поттипови на АЛЛ поврзани со специфични, високо-ризични генетски абнормалности¹⁰⁻¹² за кои е потребен понатамошен напредок.

Во денешните педијатриски протоколи интензитетот на хемотерапијата се адаптира според проценетиот прогностички ризик чија цел е да се намали токсичноста кај пациентите со низок ризик, а да се обезбеди соодветна, поагресивна терапија кај тие со висок ризик. За прецизно дефинирање на ризичните групи се користат повеќе добро етаблирани прогностички фактори кои ќе бидат опишани во овој ревијален труд, а ги вклучуваат клиничките карактеристики на пациентите при дијагнозата, биолошките и генетските карактеристики на леукемиските бласти и раниот одговор на терапија.

Материјал и методи

За евалуација на значењето и примената на прогностичките фактори во дефинирање на ризичните групи кај детската АЛЛ беше направен дескриптивен преглед на литературата достапна во медицинската база на податоци MEDLINE/PubMed. Во прегледот беа вклучени клинички студии во кои се евалуира прогностичкото влијание на возраста, иницијалниот број на леукоцитите, ЦНС статусот, имунофенотипот, генетските карактеристики на леукемиските бласти и раниот одговор на терапија кај педијатриски пациенти со прекурсорна Б и Т-клеточна АЛЛ. Беа собирани податоци за методите за детекција на минималната резидуална болест (МРБ). Беше направен и преглед на клинички студии публикувани од светските лидерски студиски групи во кои се евалуира клиничкото значење на МРБ кај детската АЛЛ. Влијанието на сите ризик фактори врз прогнозата беше детерминирано преку стапка на вкупно преживување, преживување без настан и ризик за релапс. За пребарување на релевантна литература се користеа следните клучни зборови: акутна лимфобластна леукемија, деца, прогностички фактори, минимална резидуална болест, преживување.

Резултати

Возраст и иницијален број на леукоцити

Возраста при дијагнозата и иницијалниот број на леукоцитите се уште опстојуваат како фактори со предиктивно значење врз прогнозата. Според Националниот институт за рак (NCI), тие се користат

како критериум за стратификација на пациентите во групи со „стандарден ризик“ (возраст 1 до 9,9 години и иницијален број на леукоцити $<50 \times 10^9/L$) и „висок ризик“ (возраст ≥ 10 години и/или иницијален број на леукоцити $\geq 50 \times 10^9/L$), и во нив се опфатени околу 2/3 и 1/3, респективно од сите случаи со прекурсорна Б-клеточна АЛЛ¹³. Децата на возраст од 1 до 10 години имаат значајно подобро преживување во споредба со постари деца, адолесценти и доенчиња¹⁴ и ова би можело барем делумно да се објасни со високата фреквенција на поволни генетски карактеристики на лимфобластите во оваа возрасна група како присуството на хипердиплоидија и ген-

ската фузија ETV6-RUNX1.^{14,15} Децата под 1 година се посебна подгрупа на пациенти кои сè уште имаат неповолна прогноза^{5,9} која е особено лоша за доенчиња со MLL генски реаранжмани кои се под 6 месечна возраст или имаат екстремно висок иницијален број на леукоцити ($\geq 300 \times 10^9/L$).⁹ И во сегашната ера на нови биомаркери и стратификација на пациентите според минималната резидуална болест, иницијалниот број на леукоцитите сè уште опстојува како независен предиктор на терапискиот исход.^{16,17} Возраста и иницијалниот број на леукоцитите имаат помало предиктивно значење кај Т-клеточната АЛЛ.^{18,19}

Табела 1: Тераписки резултати од селектирани студиски групи

Студиска група	Времетраење на студијата (години)	Број на пациенти	Возраст	5-годишен OS	5-годишен EFS	Реф.
AIEOP-BFM 2000	2000–2006	4839	1–17	91,9 ± 0,4	81,4 ± 0,4	1
MRC UKALL 2003	2003–2011	3126	1–25	91,6 ± 1,2	87,3 ± 1,4	2
DCOGALL10	2004–2012	778	1–18	91,9 ± 1,0	87 ± 1,2	3
EORTC CLG 58951	1998–2008	1947	1–18	89,7 ± 0,7	82,6 ± 0,9	4
COG	2000–2005	7153	0–21	90,4 ± 0,5	/	5
SJCRH XV	2000–2007	498	1–18	93,5 ± 1,9	87,3 ± 2,9	6
DFCI 05-001	2005–2010	551	1-18	91	85	7

Кратенки (англиски): OS, overall survival; EFS, event-free survival; AIEOP, Associazione Italiana di Ematologia Pediatrica Group; BFM, Berlin-Frankfurt-Münster; MRC UKALL, Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukemia; DCOG, Dutch Children's Oncology Group; EORTC – CLG, European Organisation for Research and Treatment of Cancer - Children Leukemia Group; COG, Children's Oncology Group; SJCRH, St. Jude Children's Research Hospital; DFCI, Dana-Farber Cancer Institute consortium; IC-BFM, Intercontinental-BFM.

Инфилтрација на ЦНС

При дијагнозата, кај одредени суппопулации на пациенти како доенчиња и деца со Т-клеточна АЛЛ се забележува повисока инциденција

на ЦНС леукемија.¹⁴ Пациентите кои имаат нетрауматска дијагностичка лумбална пункција, според бројот на леукоцитите/ μL и присуството или отсуството на бласти во церебро-спиналната течност (ЦСТ) на ци-

тоспин препарат стандардно се класифицираат во една од следните три категории: ЦНС 1: отсуство на бласти во ЦСТ; ЦНС 2: присуство на бласти во ЦСТ која содржи <5 леукоцити/ μL ; ЦНС 3: во ЦСТ има ≥ 5 леукоцити/ μL и се идентифицираат бласти или се детектира присуство на церебрална маса и/или парализа на кранијалните нерви. ЦНС статусот покажува корелација со прогнозата. Пациентите со ЦНС леукемија (ЦНС 3 статус) имаат зголемен ризик за развој на изолирани ЦНС релапси, и затоа во многу терапевтски протоколи се кандидати за кранијална ирадијација.²⁰ Сепак, некои студиски групи во контекст на сегашната ефективна системска и дополнителна интра-текална хемотерапија елиминираат кранијалната ирадијација и исто така реферираат релативно низок кумулативен ризик за изолирани ЦНС релапси.^{21,22}

Имунофенотип

Историски гледано, децата со Т-клеточна АЛЛ во изминатите декади имале помало преживување во споредба со оние со Б-клеточна АЛЛ, меѓутоа овие разлики со стратификација на пациентите во ризични групи според раниот одговор на терапија и примената на поинтензивни терапевтски протоколи се надминати.^{5,23} Прогнозата е подобрена и кај пациентите со рана Т-клеточна прекурсорна АЛЛ (ETP-ALL) која во иницијалните клинички студии се препознава како високо ризична леукемија со бавен одговор на индукуциска терапија и висока стапка на хематолошки релапси.²⁴ Две неодамнешни клинички студии од лидерските студиски групи (COG и AIEOP-BFM) за овој поттип преферираат терапевтски резултати кои се компа-

рабилни со тие кај класичната Т-АЛЛ (5-годишно преживување без настан 87,0% и 3-годишно преживување без настан 86,2%, респективно).^{23,25}

Генетски карактеристики

Со примена на стандардни цитогенетски и молекуларно-генетски анализи кај речиси 75% од случаите на Б-АЛЛ се откриваат рекурентни хромозомски абнормалности како анеуплодија и специфични хромозомски реаранжмани кои резултираат со дерегулација на онкогените или со експресија на хибридни фузиски гени. Овие промени се присутни во сите леукемиски клетки и се од критично значење во механизмите на леукемогенезата. Нивната идентификација е од есенцијална важност за дефинирање на ризичните групи, а кај одредени генетски лезии и за примена на таргет терапија. И кај пациентите со Т-клеточна АЛЛ се идентифицирани мултипли генетски алтерации со можно прогностичко значење, меѓутоа студиските групи сè уште не ги применуваат како стратификациски критериуми.

Генетски биомаркерки кои се асоцирани со одлична прогноза се $t(12;21)$ (*ETV6-RUNX1*) и хипердиплоидија (51-65 хромозоми).²⁶ Пациентите со било која од овие хромозомски аберации имаат 5-годишно вкупно преживување кое надминува 90%. Пет хромозомски абнормалности – *MLL* (*KMT2A*) реаранжманите, $t(9;22)$ (*BCR-ABL1*), $t(17;19)$ (*TCF3-HLF*), длабока хиподиплоидија (32-39 хромозоми) и подгрупата на хиподиплоидија која се доближува до хаплоидија (24-31 хромозоми) се добро етаблирани прогностички биомаркери за високо-ризична АЛЛ во сите возрасни групи.²⁷

Табела 2: Значајни прогностички фактори кај детската АЛЛ

ПОВОЛНИ ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОРИ	НЕПОВОЛНИ ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОРИ
Клинички карактеристики	Клинички карактеристики
возраст 1-<10 години	возраст <1 година или ≥10 години
иницијален број на леукоцити <50 x10 ⁹ /L	иницијален број на леукоцити ≥50 x10 ⁹ /L
NCI SR	NCI HR
ЦНС1	ЦНС3
Биолошки и генетски карактеристики	Биолошки и генетски карактеристики
Б-клеточен имунофенотип	Т-клеточен имунофенотип (ETP-ALL)
ETV6-RUNX1	KMT2A-реаранжмани
хипердиплоидија (51-67хромозоми)	BCR-ABL1
трисомија +4, +10	TCF3-HLF
	хиподиплоидна АЛЛ
	iAMP21
	IKZF1 мутации или делеции
	BCR-ABL1-like
Ран одговор на терапија	Ран одговор на терапија
Добар преднизонски одговор	Лош преднизонски одговор
M1 морфологија на КС на ден 15	M3 морфологија на КС на ден 15
M1 морфологија на КС на крај на индукциска терапија	M2/M3 морфологија на КС на крај на индукциска терапија
МРБ во периферна крв <0,01% на ден 8	МРБ во периферна крв ≥0,01% на ден 8
МРБ во КС <0,01% на крај на индукциска терапија	МРБ во КС ≥0,1% на крај на рана консолидација

Кратенки: NCI-Национален институт за рак; SR-стандарден ризик; HR-висок ризик; (дефинициите се приложени во текстот); ЦНС-централен нервен систем; рана Т-клеточна прекурсорна АЛЛ; M1: <5% лимфобласти; M2: 5-25% лимфобласти; M3>25% лимфобласти при морфолошки преглед на коскената срцевина (КС); МРБ-минимална резидуална болест;

MLL (*KMT2A*)(11q23) реаранжманите се најчести кај децата во доенечка возраст и се асоцирани со неповолна прогноза.⁹ Алогената трансплантација на хематопоеетски матични

клетки може да биде од корист само кај одредена, мала подгрупа на доенчиња со *MLL+* АЛЛ кои имаат дополнителни неповолни клинички карактеристики како многу млада

возраст, висок иницијален број на леукоцити и бавен одговор на терапија.²⁸ Во клиничките студии од последните години се тестираат нови таргет терапии за оваа високо-агресивна леукемија. *MLL* реаранжманите кај доенечката АЛЛ покажуваат асоцијација со прекумерна експресија на тирозин-киназа рецепторскиот ген *FLT3*, но примената на *FLT3* инхибитори како *lestaurtinib* во комбинација со постиндукциска хемотерапија не се покажала како стратегија која резултира со подобро преживување.²⁹

BCR-ABL1 (Philadelphia [Ph] chromosome) – позитивната АЛЛ се јавува кај 2% до 5% од сите случаи на детската АЛЛ и иако историски се поврзува со неповолна прогноза, денес има значајно подобро преживување кое се должи на примена на таргетирана терапија со тирозин-киназни инхибитори. Комбинацијата на *imatinibmesylate* со интензивна хемотерапија е добро толерирана терапевска стратегија кај детската АЛЛ од која резултира 5-годишно преживување кое достигнува до 70%.³⁰ Остварување на негативна МРБна крај на индукциска терапија покажува асоцијација со одлична прогноза.³¹

Хиподиплоидната АЛЛ се јавува кај 2 до 3% од сите случаи на детската Б-АЛЛ и се карактеризира со различен мутациски профил. Пациентите со длабока хиподиплоидија (32 до 39 хромозоми) имаат генетски алтерации кои го инволвираат лимфоидниот транскрипциски фактор *IKAROS* (*IKZF2*) и многу често се носители на герминативни мутации во тумор-супресорскиот ген *TP53* кои се конзистентни со синдромот на Li-Fraumeni.³² Кај подгрупата

која се доближува до хаплоидија се детектираат активациски мутации во *Ras*-генот и алтерации во *IKZF3*-генот.³² Прогнозата кај овој поттип на АЛЛ е значајно подобрена со имплементацијата на МРБ во стратегиите за терапевска стратификација.³³

Генскиот транскрипт *E2A-PBX1* (*t(1;19)(q23;p13.3)*) во контекст на денешните интензивни хемотераписки протоколи не претставува неповолен прогностички фактор, иако некои студии реферираат дека овој генотип го зголемува ризикот за развој на ЦНС релапси.³⁴ Варијантата на *t(1;19)*, транслокацијата *t(17;19)(q23;p13)/TCF3-HLF* е многу редок наод кај детската Б-АЛЛ (<1%) и се поврзува со екстремно лоша прогноза.³⁵

Комплексната интрахромозомска амплификација на 21-иот хромозом најчесто се јавува кај постари деца и покажува асоцијација со зголемен ризик за релапси, меѓутоа со примена на хемотераписки протоколи за високо-ризична АЛЛ некои студиски групи реферираат подобро преживување.^{36,37}

И покрај тоа што околу 25% до 30% од педијатриските пациенти со Б-АЛЛ на стандардните генетски анализи се негативни за добро етаблираните дијагностички и прогностички биомаркери, со денешните технологии во молекуларната генетика, како на пример со секвенционирање на цел геном и егзом практично сите случаи на Б-АЛЛ може да бидат генетски класифицирани. Случаите без познати хромозомски алтерации се класифицираат како други типови на Б-АЛЛ. Околу 50% од овие случаи имаат генски профил сличен на *BCR-ABL1* + АЛЛ, но немаат *BCR-ABL1* транслокација и формираат

посебна подгрупа означена како *BCR-ABL1*-слична или *Ph*-слична АЛЛ која е внесена во класификациската шема на СЗО ревидирана во 2016 година како нов ентитет на високо-ризична леукемија асоцирана со слаб одговор на индукциска терапија (резистенција на *daunorubicini* *L-asparaginasa*) и неповолна прогноза.^{10,11,38} Преваленцијата на *BCR-ABL1*-сличната АЛЛ се зголемува со возраста и варира од 10% кај детската АЛЛ со стандарден ризик до 27% кај адолесценти и млади адулти со Б-АЛЛ.³⁹

Повеќе од 70% од пациентите со овој поттип, слично на оние со *BCR-ABL1*+АЛЛ имаат генетски алтерации кои ги инволвираат Б-лимфоидните транскрипциски фактори, особено вклучувајќи ги *Ikaros* гените (делеции на *IKZF1*).^{10,11} Кај речиси 50% од децата со *BCR-ABL1*-сличната АЛЛ се откриваат генски реаранжмани во цитокинскиот рецептор *CRLF2* кои резултираат со прекумерна експресија на *CRLF2* на површината на лимфоидните бласти и дополнително околу половина од овие случаи имаат конкомитантни активациски мутации во Janus kinasagenите *JAK1* и *JAK2* кои резултираат со активација на *JAK-STAT* сигналните патишта, промовирајќи преживување и пролиферација на Б-лимфоидните клетки.^{39,40} Во повеќето студии *CRLF2* реаранжманите, а особено во случаите со конкомитантна делеција на *IKZF1* и активациски мутации во *JAK1* и *JAK2* гените се асоцирани со висока стапка на релапси и неповолна прогноза.^{40,41} Идентификацијата на овие абнормалности е важна затоа што пациентите со овој генски профил може да имаат корист од таргет терапија со *JAK* инхибитори

(*ruxolitinib*).³⁹ Друга подгрупа која опфаќа околу 10% од сите случаи на *BCR-ABL1*-сличната АЛЛ се пациенти со генетски алтерации кои ги активираат *JAK-STAT* сигналните патишта вклучувајќи реаранжмани на *JAK2* и *EPOR* гените и се исто така кандидати за терапија со *JAK* инхибитори.³⁹ Трета подгрупа која сочинува 15% до 20% од сите случаи на детската *BCR-ABL1*-слична АЛЛ се пациенти со реаранжмани во *ABL1*-класа гените (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* и *PDGFRB*) кои реагираат на терапија со тирозин-киназни инхибитори како *imatinib* и *dasatinib*.³⁹

Ран одговор на терапија

Прогностичкото значење на брзиот морфолошки клиренс на леукемиските бласти од периферната крв и коскената срцевина во иницијалните фази од хемотерапијата е потврдено во бројни клинички студии.⁴²⁻⁴⁴ Со декади, морфолошката проценка на раниот одговор на терапија се користи како главен стратификациски критериум за дефинирање на ризичните групи.⁴⁴ Евалуацијата на преднизонскиот одговор која е воведена во 1983 година од страна на BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) студиската група⁴² сè уште опстојува како еден од најмоќните прогностички фактори кај детската АЛЛ.¹⁶ Пациентите со добар преднизонски одговор ($<1 \times 10^9/L$ леукемиски бласти во периферната крв по 7 дена терапија со преднизон и една интратекална апликација на метотрексат) имаат значајно подобро преживување во однос на оние со лош преднизонски одговор ($>1 \times 10^9/L$ леукемиски бласти).⁴⁴

Морфолошкиот преглед на коскената срцевина 15-от ден од индуциската терапија е исто така добро етаблиран прогностички фактор во BFM клиничките студии.⁴⁵ Бавниот одговор на коскената срцевина во раните фази од индуциската хемотерапија корелира со неповолен клинички исход.^{45,46} Во клиничката студија ALL IC BFM 2002 раниот одговор на коскената срцевина е користен како еден од стратификациските критериуми за дефинирање на прогностичките групи.⁴⁶

Пациентите кои нема да остварат морфолошка ремисија на крај на индуциска терапија се соисклучително лоша прогноза. Перзистенцијата на леукемиските бласти во коскената срцевина (>5%) или во која било екстрамедуларна локализација по 4 до 6 недели индуциска терапија е редок, но сигнификантен настан кој се јавува кај 2% до 3% од сите пациенти и резултира со 10-годишно вкупно преживување до 30%.⁴⁷ Овие пациенти најчесто имаат високо ризични карактеристики при дијагнозата како постара возраст, висок иницијален број на леукоцити, Т-клеточен имунофенотип, *MLL* – реаранжмани или *BCR-ABL+* АЛЛ и се третираат со поинтензивна терапија вклучувајќи и алогена трансплантација на хематопоеТСки матични клетки во прва ремисија.^{47,48}

Минимална резидуална болест

И покрај јасната идентификација на ризичните групи, цитоморфолошкиот преглед на коскената срцевина има ограничена сензитивност и специфичност, затоа што сепак сигнификантен број на пациенти кои ќе остварат комплетна морфолошка ремисија развиваат релапси како

резултат на резидуални малигни клетки кои остануваат недетектирани со стандардните микроскопски техники.⁴⁹ Во последните 2-3 декади повеќето студиски групи се фокусираат на детекција и квантификација на леукемиските клетки на субмикроскопско ниво или на така наречена минимална резидуална болест (МРБ), која во бројни клинички студии се идентификува како најрелевантен прогностички индикатор за детската АЛЛ.^{2,3,6,16,17,50-55}

Мерењето на МРБ во денешните терапевтски протоколи претставува фундаментална алатка за проценка на раниот одговор на терапија и стратификација во ризични групи и тоа не само кај пациентите со *de novo* АЛЛ, туку и кај тие со релапси, како и пред и по фазите на алогена трансплантација на хематопоеТСки матични клетки.⁵⁷ Количината на резидуална леукемија во текот на третманот се наоѓа во директна и сигнификантна релација со ризикот за развој на релапс. Според овој концепт пациентите со брз клиренс на МРБ на крај на индуциска терапија може успешно да бидат третирани со помалку токсични протоколи,^{3,54,56} за разлика од пациентите со високи нивоа на МРБ кои имаат неповолна прогноза и кај коиза подобрување на клиничкиот исход е потребна дополнителна постиндуциска интензификација.^{2,3,16,21,55}

Во клиничката пракса за одредување на МРБ се користат три стандардни методи: 1) мултипараметриска проточна цитометрија (MFC) со која се детектира аберантен леукемиски имунофенотип, 2) полимераза-верижна реакција-PCR амплификација на специфични клонотипски генски реаранжма-

ни во имуноглобулинските (Ig) или во гените за T - клеточниот рецептор (TCR) и 3) PCR амплификација на физиски транскрипти, продукти на различни хромозомски транслокации.⁵⁸ Овие методологии овозможуваат детекција на една леукемска клетка во 10⁻⁴ (10 000)

до 10⁻⁵ (100 000) нормални клетки, што претставува најмалку 100 пати поголема сензитивност во споредба со таа на конвенционалната оптичка микроскопија. Главните карактеристики на трите методи се сумирани во табела бр. 3.

	МУЛТИКОЛОРНА ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈА	RQ-PCR	RQ-PCR
Таргет	Леукемија-асоцирани имунофенотипови	Ig/TCR генски реаранжмани	Физиски генски транскрипти
Апликабилност	90%–95%	90%–95%	30%–40%
Материјал	клеточна суспензија (периферна крв/КС)	нуклеински киселини (DNA)	нуклеински киселини (RNA/DNA)
Сензитивност	3-4 колорна 10 ⁻³ – 10 ⁻⁴ 6-9 колорна 10 ⁻⁴ – 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵	10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵
Стабилност на примерокот	бара свежи вијабилни клетки	пролонгирана стабилност	пролонгирана стабилност
Предности	<ul style="list-style-type: none"> • апликабилна кај речиси сите пациенти со АЛЛ • брза • прецизна МРБ квантификација • дополнителни информации за бенигните клетки • стандардизирана 	<ul style="list-style-type: none"> • висока сензитивност • висок степен на стандардизација • добро етаблирана стратификациска алатка во различни клинички протоколи • апликабилна кај речиси сите пациенти со АЛЛ 	<ul style="list-style-type: none"> • висока сензитивност • стабилност на PCR таргетите во текот на третманот • брза • релативно евтина • апликабилна кај одредени поттипови на леукемија како <i>BCR-ABL</i> и <i>MLL-AF4</i>
Недостатоци	<ul style="list-style-type: none"> • може да пропушти имунофенотипски шифт експанзија на КС со нормални прекурсорни Б – клетки во фазите на регенерација • ниска целуларност за време на индукциската терапија • релативно помалку скапа • ограничена сензитивност при примена на 3-4 колорна FC • ≥6-колорна FC: потребно е опсежно знаење и искуство за осетлива и стандардизирана анализа 	<ul style="list-style-type: none"> • може да пропушти нови Ig и TCR генски реаранжмани • бара многу време за дизајнирање на специфични прајмери за пациентот • потребно е опсежно знаење и искуство релативно поскапа 	<ul style="list-style-type: none"> • ограничена стандардизација • ограничена апликабилност (отсуство на таргети кај >50%од случаите) • ризик од контаминација

Кратенки: RQ-PCR квантитативнаполимераза верижна реакција во реално време; FC-проточна цитометрија, АЛЛ-акутна лимфобластна леукемија; МРБ-минимална резидуална болест; КС-коскена срцевина;

Клиничко значење на МРБ кај детската АЛЛ

Детекцијата на МРБ во раните фази од третманот (ремисиска индукција и консолидација) има најмоќно прогностичко влијание во сите досегашни публикувани клинички студии за детската АЛЛ.^{2,3,6,16,17,50-56} Најчесто користена cutoff вредност од студиските групи за дефинирање на позитивен МРБ статус е 0,01% (10^{-4}), затоа што ова е типичен лимит за детекција на резидуални клетки со рутинска проточна цитометрија или со молекуларни техники и лимит кој има суверено значење во дискриминација на пациентите со различен ризик за релапс на болеста.

Во раните клинички студии од детската истражувачка болница St. Jude (SJCRH), нивоата на МРБ $\geq 0,01\%$ на ден 19 и 46, кои кореспондираа со средината и крајот на индукциската терапија, покажале како најважен предиктивен фактор за релапси.^{50,51} МРБ била идентифицирана и како независен прогностички фактор во однос на останатите клинички и генетски карактеристики.⁵⁰ Клиничкото значење на имунолошката детекција на МРБ е дефинитивно потврдено во големата мултицентрична студија на Детската онколошка група (COG) во која биле евалуирани 2143 деца со прекурсорна Б-клеточна АЛЛ.⁵³ Во студијата, МРБ на крај на индукциската терапија (ден 29) била утврдена како најмоќен предиктор на терапискиот исход кај детската Б-АЛЛ. Пациентите со негативна МРБ ($n = 1588$) на крај на индукциската терапија имале супериорно 5-годишно преживување без настан за разлика од оние со високи нивоа на МРБ $>1\%$ (88% наспроти 33%, респективно). Во

оваа клиничка студија е потврдено и предиктивното значење на МРБ во периферната крв 8-от ден од индукциската терапија. Пациентите со високи нивоа на МРБ во оваа временска точка ($>1\%$) имале релативно лоша прогноза, па дури и доколку оствареле негативна МРБ на крај на индукциската терапија. Стапката на 5-годишно преживување без настан за оваа популација на пациенти изнесувала 79% наспроти 90% за оние со ниски нивоа на МРБ ($\leq 1\%$) 8-от ден од индукциската терапија.

Најголемата рандомизирана клиничка студија АIEOP-BFM 2000 го евалуирала прогностичкото значење на МРБ детерминирана со RT-PCR кај 3184 деца со прекурсорна Б-клеточна АЛЛ во две временски точки – ден 33 и 78 од терапискиот протокол.¹⁶ Според молекуларниот одговор на коскената срцевина пациентите биле стратифицирани во 3 ризични групи: 1) група со стандарден ризик (негативна МРБ $<0,01\%$ на ден 33 и 78); 2) висок ризик (МРБ $>0,1\%$ на ден 78) и 3) интермедијарен ризик (сите останати). Стапката на 5-годишно преживување без настан за пациентите со стандарден, интермедијарен и висок ризик изнесувала 92%, 77% и 50%, респективно. Авторите заклучиле дека МРБ претставува најважен предиктивен фактор за релапси кај детската Б-АЛЛ, намалувајќи го значајно прогностичкото влијание на генетските фактори, преднизонскиот одговор и NCI ризичните групи.

Нивоата на МРБ одредени и порано, на пр. на ден 15 од индукциската терапија исто така имаат сигнификантно значење врз прогнозата кај детската АЛЛ.^{59,60} Во клиничката студија на АIEOP, 815

педијатриски пациенти според одговорот на коскената срцевина на ден 15 евалуиран со проточна цитометрија биле класифицирани во три ризични групи.⁵⁹ Пациентите со висок ризик (МРБ \geq 10%) имале значајно повисока 5-годишна кумулативна инциденција на релапси која изнесувала 47,2% во однос на оние со интермедијарен (МРБ 0,1-<10%) и стандарден ризик (МРБ <0,1%) кај кои била опсервирана стапка на релапси од 17,5% и 7,5%, респективно.

За разлика од Б-клеточната АЛЛ, динамиката на клиренсот на резидуалните леукемиски клетки кај Т-АЛЛ се одвива побавно. Истражувачите од клиничката студија АIEOP-BFM 2000 заклучиле дека позитивна МРБ по фазата на рана консолидација (ден 78) претставува најважен предиктор за релапси кај пациентите со Т-клеточна АЛЛ.⁵⁵ Влијанието на МРБ статусот на ден 33 било ирелевантно за 48% од пациентите кои оствариле негативна МРБ по фазата на рана консолидација. Оваа кохорта на пациенти имала одлична прогноза (7-годишна кумулативна инциденција на релапси од 8,5%). За разлика од нив, пациентите со високо позитивна МРБ (>0,1%) на ден 78 имале значајно лоша прогноза (7-годишна кумулативна инциденција на релапси од 44,7%).

Заклучок

Повеќе клинички и биолошки карактеристики кои ги вклучуваат возраста, иницијалниот број на леукоцитите, ЦНС статусот, имунофенотипот, присуството на генетски абнормалности и одговорот на иницијалната терапија имаат сигнификантно прогностичко влија-

ние кај детската АЛЛ. Примената на овие прогностички фактори, а особено имплементацијата на МРБ во стратификацијата на пациентите во ризични групи резултира со денешно 5-годишно вкупно преживување кое достигнува до 90%. Целта за наредните години е излекување и на пациентите кои имаат високо-ризична АЛЛ и се рефракторни на прво-линискиот третман или развиваат релапси преку понатамошна попрецизна стратификација и планирање на таргетирана, индивидуализирана терапија.

Референци

1. Moricke A, Zimmermann M, Valsecchi MG, et al. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood* 2016; 127(17): 2101–12.
2. Vora A, Goulden N, Mitchell C, et al. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(8): 809–18.
3. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, et al. Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: Study ALL10 from the Dutch Childhood Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 2016; 34(22): 2591–601.
4. Domenech C, Suciú S, De Moerloose B, et al. Dexamethasone (6 mg/m²/day) and prednisolone (60 mg/m²/

- day) were equally effective as induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in the EORTC CLG 58951 randomized trial. *Haematologica* 2014;99(7):1220-7
5. Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30, 1663-1669.
 6. Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. *Lancet Oncol* 2015;16(4):465-74.
 7. Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, et al. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(16): 1677-90.
 8. Oskarsson T, Söderhäll S, J, et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica* 2016; 101(1): 68-76.
 9. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): An observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007;370(9583):240-250.
 10. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360(5):470-80.
 11. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009; 10(2):125-34.
 12. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression in children with B-cell precursor ALL. *Blood* 2013;122(15):2622-9.
 13. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14(1):18-24.
 14. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr* 2005;217(6):310-20.
 15. Forestier E, Schmiegelow K. The incidence peaks of the childhood acute leukemias reflect specific cytogenetic aberrations. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28(8):486-95.
 16. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;115(16):3206-14.
 17. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 2015;126(8):964-71.
 18. Maloney KW, Shuster JJ, Murphy S, et al. Long-term results of treatment

- studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986-1994. *Leukemia* 2000; 14:2276.
19. Pullen J, Shuster JJ, Link M, et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia* 1999;13(11):1696-707.
 20. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol* 2008;9(3):257-68.
 21. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360(26):2730-41.
 22. Veerman AJ, Kamps WA, van den Berg H, et al. Dexamethasone-based therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the prospective Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) protocol ALL-9 (1997-2004). *Lancet Oncol* 2009;10:957-966.
 23. Wood BL, Winter SS, Dunsmore KP, et al. T-Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) shows excellent outcome, lack of significance of the early thymic precursor (ETP) immunophenotype, and validation of the prognostic value of end-induction minimal residual disease (MRD) in Children's Oncology Group (COG) Study AALL0434. *Blood* 2014;124(21):1.
 24. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009; 10:147.
 25. Conter V, Valsecchi MG, Buldini B, et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia in children treated in AIEOP centres with AIEOP-BFM protocols: a retrospective analysis. *Lancet Haematol* 2016;3(2):e80-6.
 26. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11:429-438.
 27. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; 101(4):407-16.
 28. Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, et al. Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood* 2010; 116(15): 2644-50.
 29. Brown P, Kairalla J, Wang C, et al. Addition of FLT3 inhibitor Lestaurtinib to post-induction chemotherapy does not improve outcomes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia (All): AALL0631, A Children's Oncology Group Study. *Pediatric blood & cancer (SIOP 2016 Scientific Programme+Index)* 2016; 63(Suppl S3, S5) abstract O-001.
 30. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia* 2014; 28(7):1467-71.
 31. Cazzaniga G, De Lorenzo P, Alten J, et al. Predictive value of MRD in Ph+

- ALL treated with imatinib in the EsPhALL study, based on IG/TR and BCR/ABL1 methodologies. *Haematologica* 2017; 103(1).
32. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013;45:242–252.
 33. Mullighan CG, Jeha S, Pei D, et al. Outcome of children with hypodiploid ALL treated with risk-directed therapy based on MRD levels. *Blood* 2015; 126(26): 2896–9.
 34. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* 2009; 23(8):1406–9.
 35. Tasian SK, Hunger SP. Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. *Br J Haematol* 2017; 176: 867–82.
 36. Moorman AV, Robinson H, Schwab C, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J Clin Oncol* 2013; 31(27):3389–96.
 37. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* 2014; 28(5):1015–21.
 38. Roberts KG, Pei D, Campana D, et al. Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. *J Clin Oncol* 2014;32:3012–3020.
 39. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371(11): 1005–15.
 40. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115:5312–5321.
 41. Cario G, Zimmermann M, Romey R, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood* 2010;115:5393–5397.
 42. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, et al. Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)] *Klin Padiatr* 1987;199(3):151–60.
 43. Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, et al. Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia - the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996;14(2):389–98.
 44. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al. Long-term results offour consecutive trialsin childhood ALL performedby the ALL-BFM study group from1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. *Leukemia* 2000;14(12):2205–22.
 45. Lauten M, Möricke A, Beier R, Zim-

- mermann M, Stanulla M, Meissner B, et al. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica* 2012;97(7):1048-1056.
46. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, et al. Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL-IC-BFM 2002. *J Clin Oncol* 2014; 32(3):174-184.
 47. Schrappe M, Hunger SP, Pui CH, et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(15):1371-1381.
 48. Oudot C, Auclerc MF, Vincent Levy V, et al. Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: the FRALLE 93 study. *J Clin Oncol* 2008;26(9):1496-503.
 49. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008; 111: 4477-4489.
 50. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351(9102):550-4.
 51. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52-58.
 52. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952-1958.
 53. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477-5485.
 54. Yeoh AE, Ariffin H, Chai EL, et al. Minimal residual disease-guided treatment deintensification for children with acute lymphoblastic leukemia: results from the Malaysia-Singapore acute lymphoblastic leukemia 2003 study. *J Clin Oncol* 2012;30(19):2384-92.
 55. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011;118(8):2077-84.
 56. Vora A, Goulden N, Wade R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14(3):199-209.
 57. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM study group. *J Clin Oncol* 2009;27:377-84.

58. Brüggemann M, Gökbuget N and Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol* 2012;39(1):47-57.
59. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009; 27(31):5168-74.
60. Sutton R, Venn NC, Tolisano J, et al. Australian and New Zealand Children's Oncology Group. Clinical significance of minimal residual disease at day 15 and at the end of therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;146:292-299.