

## Клинические и генетические особенности острого миелоидного лейкоза с t(8;21) у детей и результаты терапии по протоколу ОМЛ-ММ-2000

И.И. Калинина<sup>1</sup>, М.М. Шнейдер<sup>1</sup>, Н.П. Кирсанова<sup>2</sup>, Д.Д. Байдильдина<sup>1</sup>, Е.В. Сунцова<sup>1</sup>, О.В. Горонкова<sup>1</sup>, Л.А. Хачатрян<sup>1</sup>, Г.А. Новичкова<sup>1</sup>, М.А. Масчан<sup>1</sup>, Р.И. Юцкевич<sup>2</sup>, Е.В. Волочник<sup>2</sup>, Т.В. Савицкая<sup>2</sup>, Н.В. Минаковская<sup>2</sup>, И.В. Пролесковская<sup>2</sup>, И.В. Емельянова<sup>2</sup>, О.В. Карась<sup>2</sup>, Н.В. Мигаль<sup>2</sup>, Ю.Е. Марейко<sup>2</sup>, А.Г. Дреков<sup>2</sup>, Ю.В. Румянцева<sup>1</sup>, Е.В. Флейшман<sup>3</sup>, Т.В. Наседкина<sup>4</sup>, О.В. Алейникова<sup>2</sup>, А.А. Масчан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

Минздравсоцразвития России, Москва;

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup>НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;

<sup>4</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Контакты: Ирина Игоревна Калинина burbir@mail.ru

У детей с ОМЛ транслокация t(8;21) встречается наиболее часто. Пациентов с данной генетической аномалией традиционно относят к группе благоприятного прогноза с вероятностью выздоровления до 80%. При ОМЛ с t(8;21) известны дополнительные цитогенетические аномалии, не влияющие на прогноз заболевания. К ним относят потерю одной из половых хромосом, del(9q). Роль дополнительных аномалий с вовлечением 7-й и 11-й хромосом у пациентов с t(8;21) неизвестна. Целью данного исследования служил цитогенетический анализ дополнительных аномалий, встречающихся у больных с t(8;21), и их влияния на прогноз заболевания.

За исследовательский период 173 ребенка с ОМЛ получили терапию по протоколу ОМЛ-ММ-2000 в России и Беларуси. Из них у 33 детей (11 девочек и 22 мальчика, медиана возраста 10,5 лет) обнаружена транслокация t(8;21) при проведении хромосомного или молекулярно-генетического исследования.

В группе пациентов с наличием t(8;21) нейролейкоз обнаружен у 8 детей, экстрамедуллярное поражение — у 8 пациентов. У 4 больных нейролейкоз сочетался с наличием экстрамедуллярных очагов. Данные характеристики не отразились на результатах терапии.

Общая выживаемость больных ОМЛ с t(8;21) составила  $0,67 \pm 0,08$  по сравнению с  $0,44 \pm 0,04$  пациентов с ОМЛ без данной аномалии ( $p = 0,04$ ). Особую подгруппу составили 5 пациентов, у которых помимо t(8;21) были выявлены хромосомные аномалии, затрагивающие 7-ю и 11-ю хромосомы, что явилось неблагоприятным прогностическим фактором. Бессобытийная выживаемость в этой подгруппе пациентов ( $n = 5$ ) составила  $0,0 \pm 0,0$ , тогда как пациентов с t(8;21) без дополнительных аномалий ( $n = 28$ ) —  $0,34 \pm 0,16$  ( $p = 0,027$ ).

**Ключевые слова:** дети, острый миелоидный лейкоз, t(8;21), протокол ОМЛ-ММ-2000

### Clinical and genetic characteristics of acute myeloid leukemia with t(8;21) in children and results of therapy according to protocol AML-MM-2000

I.I. Kalinina<sup>1</sup>, M.M. Shneyder<sup>1</sup>, N.P. Kirsanova<sup>2</sup>, D.D. Baydildina<sup>1</sup>, E.V. Suntsova<sup>1</sup>, O.V. Goronkova<sup>1</sup>, L.A. Khachatryan<sup>1</sup>, G.A. Novichkova<sup>1</sup>, M.A. Maschan<sup>1</sup>, R.I. Yutskevich<sup>2</sup>, E.V. Volochnik<sup>2</sup>, T.V. Savitskaya<sup>2</sup>, N.V. Minakovskaya<sup>2</sup>, I.V. Proleskovskaya<sup>2</sup>, I.V. Emelyanova<sup>2</sup>, O.V. Karas<sup>2</sup>, N.V. MigaF, Yu.E. Mareyko<sup>2</sup>, A.G. Drekov<sup>2</sup>, J.V. Romyantseva<sup>1</sup>, E.V. Fleyshman<sup>3</sup>, T.V. Nasedkina<sup>4</sup>, O.V. Aleynikova<sup>2</sup>, A.A. Maschan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;

<sup>2</sup>Republic Center of Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Belarus;

<sup>3</sup>Institute of Cancerogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

<sup>4</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

A t(8;21) is the most frequent abnormality in AML in children. Patients with this genetic abnormality are traditionally expected favorable prognosis with a probability of cure up to 80%. Known additional cytogenetic abnormalities in AML with t(8;21) not affecting prognosis. These include loss of one sex chromosome and del(9q-). Prognosis impact of additional abnormalities involving chromosomes 7 and 11 in patients with t(8;21) is unknown. The purpose of this study was to analyse of additional anomalies, that occur in patients with t(8;21), and their influence on prognosis.

During the study period 173 children with AML have received AML-MM-2000 treatment protocol in Russia and Belarus. Of these, in 33 patients (11 girls and 22 boys, median age — 10.5 years) t(8;21) was detected by chromosome banding or molecular-genetic analysis.

In group with t(8;21) CNS leukemia in 8 patients was detected, extramedullary lesion — in 8 patients. In 4 patients CNS leukemia combined with presence of extramedullary lesions. These factors did not influence on therapy outcome.

Overall survival of AML patients with  $t(8;21)$  was  $0,67 \pm 0,08$  compared to  $0,44 \pm 0,04$  in patients with AML without this translocation ( $p = 0,04$ ). Special subgroup consist of 5 patients with  $t(8;21)$  and identified chromosomal abnormalities affecting chromosome 7 and 11, which were a poor prognostic factor: event-free survival in this subgroup of patients ( $n = 5$ ) was  $0,0 \pm 0,0$ , compared to  $0,34 \pm 0,16$  in patients with  $t(8;21)$  without additional anomalies ( $n = 28$ ) ( $p = 0,027$ ).

**Key words:** children, acute myeloid leukemia,  $t(8;21)$ , AML-MM-2000 protocol

Острые лейкозы являются самыми частыми злокачественными заболеваниями у детей, и доля острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) составляет 15–20% от всех детских гемобластозов. Современная интенсивная полихимиотерапия (ПХТ), основанная на применении высоких доз цитозин-арабинозида (Ага-С) и антрациклинов, позволяет достичь полной ремиссии у более 90% пациентов и длительной выживаемости у 50–60% детей с ОМЛ [1–3]. ОМЛ является гетерогенной группой заболеваний, прогноз которых при современном лечении определяется, главным образом, инициальными генетическими характеристиками лейкоэмических клеток. Группа благоприятного прогноза формируется лейкоэми с транслокацией  $t(15;17)(p21;q11)$  и лейкоэми с вовлечением CBF (core-binding factor), встречающимся при  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13;q22)$  и  $t(16;16)(p13;q22)$ , — вероятность выздоровления при таких характеристиках может составлять 80% и больше. В группу промежуточного прогноза относят лейкозы с нормальным кариотипом, трисомией 8 и транслокацией  $t(9;11)$ , в то время как лейкозы, характеризующиеся сложными нарушениями кариотипа, аномалиями 5-й, (-5;5q-), 7-й (-7) хромосом,  $inv(3)$ ,  $t(3;3)$  и аномалиями региона 11q23, относятся к группе плохого прогноза. Вероятность выздоровления в группе промежуточного прогноза составляет около 40%, а в группе высокого риска не более 25%, даже при применении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [1–4]. В результате молекулярно-генетических исследований, выполненных в последние 10 лет, стало очевидно, что помимо микроскопически видимых аномалий кариотипа прогноз при ОМЛ определяется и дополнительными факторами — мутациями генов, вовлеченных в регуляцию миелопоэза, а также эпигенетическими изменениями.

Аберрантный кариотип и/или соответствующие аномальные гены, образующиеся в результате слияний участков хромосом, замены и потери участков генов, выявляются в среднем у 70–80% детей с ОМЛ [1]. Наиболее частой кариотипической аномалией при ОМЛ у детей является транслокация  $t(8;21)(q22;q22)$ , впервые описанная Rowley в 1973 г. [5]. Эта aberrация встречается у 10–15% детей и 4–5% взрослых с ОМЛ [1, 6–9]. Суть этой транслокации в том, что в область гена *ETO* (Eight-Twenty-One), находящегося на длинном плече 8-й хромосомы, переносится ген *AML1* (Acute Myeloid Leukemia) с длин-

ного плеча 21-й хромосомы. Ген *AML* (ныне *RUNX1*) кодирует транскрипционный регуляторный фактор *CBF $\alpha$* , который в комплексе с *CBF $\beta$*  активирует транскрипцию генов, контролирующей миелоидную дифференцировку. В итоге образуется химерный ген *RUNX1/ETO* и его продукт — протеин *CBF $\alpha$ -ETO*, который ингибирует транскрипцию дифференцирующих факторов миелоидных клеток [10]. Химерный транскрипт *AML1/ETO* может встречаться также у пациентов с  $t(2;21;8)(p12;q22;q22)$ ,  $t(8;10;21)(q22;q26)$ ,  $t(6;8;21)(p22;q22;q22)$ , которые рассматриваются как вариант  $t(8;21)$  и в некоторых случаях выявляются у пациентов с нормальным кариотипом [6].

Иммунофенотип лейкоэмических клеток при  $t(8;21)$  весьма специфичен — наряду с выявлением CD34, HLA-DR и миелоидных антигенов CD13 и CD33, характерна экспрессия лимфоидного антигена CD19 (около 80% случаев) и молекулы адгезии NCAM — CD56 (около 60%), причем коэкспрессия последних является практически патогномоничной для данного варианта ОМЛ [11–14]. Экспрессия других лимфоидных антигенов относительно часто встречающихся при ОМЛ — CD7 и CD2, — при  $t(8;21)$  не описана.

Яркой клинической характеристикой ОМЛ с  $t(8;21)$  являются хлоромы — «солидные» очаги экстрамедуллярного поражения лейкоэмическими клетками, которые встречаются у 20% больных и часто располагаются не в коже, как это бывает при аномалиях региона 11q23, а в других органах и тканях. Наиболее характерным является поражение костей и мягких тканей орбиты, кроме того, могут быть поражены оболочки черепно-мозговых нервов, внутренние органы, кости. Спленомегалия встречается у 25% больных, однако не все авторы относят данное поражение к хлоромам [15–18]. Прогностическая роль наличия хлором при  $t(8;21)$  не является очевидной. Исследователи Children's Cancer Group (США) показали, что локализация хлором вне кожи является независимым благоприятным фактором [15]. Есть данные, что наличие экстрамедуллярных проявлений ухудшает результаты терапии. Однако нужно заметить, что в этом исследовании в группу с экстрамедуллярным поражением включались также пациенты с нейрорлейкозом, являющимся фактором неблагоприятного прогноза [19].

Хотя наличие  $t(8;21)$  и является фактором благоприятного прогноза, хорошие результаты достигаются только при интенсивной химиотерапии (ХТ)

с включением нескольких циклов высоких доз Ага-С. Вероятность рецидива для пациентов с  $t(8;21)$ , достигших ремиссии, составляет около 25%, а общая 4-летняя выживаемость — 60–70%. Есть данные, полученные в основном в исследованиях у взрослых пациентов, что у больных с  $t(8;21)$  общие результаты терапии хуже, чем у пациентов с  $inv(16)$  [1, 6, 9, 20, 21].

В клетках, несущих  $t(8;21)$ , часто встречаются дополнительные аномалии кариотипа: к наиболее характерным из них относятся потеря половой хромосомы (у 70% больных мужского и 25% — женского пола),  $del(9q)$  (около 10%) и трисомия 8-й хромосомы [22, 23]. Данные о влиянии дополнительных аномалий на прогноз заболевания достаточно противоречивы: например, исследователи группы MRC (Соединенное королевство Великобритании и Северной Ирландии) показали, что наличие  $del(9q)$  не оказывает влияния на прогноз у детей с  $t(8;21)$  [20], в то же время у взрослых  $del(9q)$  считается фактором, ухудшающим прогноз при ОМЛ с  $t(8;21)$  [24, 25]. Кроме того, есть данные, что результаты терапии у больных с выявлением транскрипта *AML1/ETO*, но без цитогенетически выявляемой  $t(8;21)$ , хуже, чем при наличии таковой [26].

Изменения генома миелоидных клеток, определяемые молекулярно-биологическими методами (мутации генов *Flt-3*, *c-kit*), также существенно влияют на прогноз, особенно у больных с благоприятными аномалиями кариотипа [1, 27–29]. У детей, особенно в возрасте до 10 лет, экспрессия ITD-*Flt-3* ассоциирована с высоким риском неудачи терапии ОМЛ [30–32]. Активирующая мутация рецептора *c-kit* встречается редко, но наиболее часто при так называемых «СВФ-лейкозах» (СВФ — corebinding factor): при  $inv(16)$  — в 20%, а при  $t(8;21)$  — в 6% случаев и существенно ухудшает прогноз больных, особенно с  $t(8;21)$  [1, 33–36].

Наличие химерных транскриптов, специфичных в отношении определенных хромосомных аберраций, является биологической основой, позволяющей мониторировать так называемую минимальную резидуальную болезнь (minimal residual disease, MRD), т.е. выявлять персистенцию лейкоэмических клеток, когда частота их встречаемости в костном мозге снижается до уровня менее 1%. Показано, что при использовании высокочувствительного качественного метода *AML1/ETO* может выявляться у больных в длительной клинико-гематологической ремиссии [37–39], которые в дальнейшем не рецидивировали. Применение менее чувствительных количественных методов больше подходит для оценки эффективности терапии и прогнозирования гематологического рецидива [40]. F. Morschhauser et al. показали, что пациенты с полной элиминацией транскрипта *AML1/ETO* перед началом консолидирующей терапии имели низкий риск развития рецидива

и более продолжительную ремиссию, по сравнению с *AML1/ETO*-позитивными пациентами [41].

Таким образом, констатируя, что ОМЛ с  $t(8;21)$  в целом представляет собой заболевание с относительно благоприятным прогнозом, необходимо четко понимать, что ряд важных вопросов, касающихся этой формы ОМЛ, остаются открытыми. К этим вопросам относятся, прежде всего, прогностическое значение дополнительных хромосомных аномалий и существование других инициальных факторов, определяющих вероятность излечения с применением только ХТ или необходимость применения аллогенной ТГСК.

Целью данного исследования служит анализ результатов терапии детей с  $t(8;21)$  в рамках протокола ОМЛ-ММ-2000.

### Пациенты и методы

С 01.05.1999 по 01.05.2006 в исследование ОМЛ-ММ-2000 были включены 173 ребенка с ОМЛ: 94 мальчика и 79 девочек, медиана возраста которых составила 10,6 (0,04–18,74) лет. В Москве получали терапию 80 больных, в Минске — 93 больных. Критериями включения в исследование являлись: диагноз *de novo* ОМЛ (кроме М3) и возраст до 18 лет включительно. Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом с  $t(15;17)$ , вторичными формами ОМЛ и бифенотипическим лейкозом [42] исключались из исследования. Диагноз ОМЛ устанавливали на основании обнаружения 20% и более лейкоэмических миелоидных бластов в аспирате костного мозга или крови и классифицировали на основании критериев FAB [43]. Хромосомный анализ лейкоэмических клеток проводили в лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (руководитель научной группы — д.м.н. Е.В. Флейшман) и в лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела РНПЦ ДОГ, Минск, Беларусь (заведующая лабораторией — к.б.н. Т.В. Савицкая) на метафазных пластинках (не менее 20 метафаз). Молекулярно-генетическое исследование и мониторинг MRD проводили в Центре биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (руководитель — д.б.н. Т.В. Наседкина) и в лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела РНПЦ ДОГ методом мультиплексной ПЦР на биочипах. Диагноз нейрорлейкоз у больных ОМЛ устанавливали на основании обнаружения бластных клеток в препарате цереброспинальной жидкости, либо 5 и более мононуклеаров в 1 мкл препарата и/или при симптомах поражения черепно-мозговых или иных нервов. Хлоромами считались экстрамедуллярные очаги поражения (кроме селезенки и печени), доказанные данными биопсии, инструментального обследования и/или клинического течения (регрессия типичных очагов поражения на фоне терапии индукции).

Стратификация на группы риска проводилась на основании данных хромосомного анализа и молекулярно-биологического исследования. К группе стандартного риска относились пациенты с  $inv(16)/t(16;16)$  с  $CBF\beta-MYH11$  и  $t(8;21)$  с  $CBF\alpha(AML1)/ETO$ . К группе высокого риска — больные с  $(-5/5q-)$ ,  $(-7/7q-)$ ,  $inv(3)/t(3;3)$ , сложным кариотипом и аномалиями региона 11q23, кроме  $t(9;11)$ . К группе среднего риска относились все остальные пациенты.

Критерием рефрактерности являлось отсутствие полной ремиссии (нормализация показателей периферической крови и количество бластных клеток  $< 5\%$  в миелограмме) после проведения сдвоенного индукционного блока ADE-HAM. Рецидив констатировался при выявлении более 5% лейкоэмических бластных клеток в костном мозге или экстрамедуллярного поражения и/или любого количества бластных клеток в костном мозге с однозначными морфологическими признаками злокачественности (палочки Ауэра) с одновременным обнаружением транскрипта *AML/ETO* не менее чем через 1 месяц после установления первой полной клинико-гематологической ремиссии.

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Statistica 6.0. Вероятность общей (ОВ), бессобытийной (БСВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости рассчитана по методу Каплана—Майера. Сравнение выживаемости между группами выполнено при помощи  $\log-rank$ -теста. Для непараметрических количественных данных определяли медиану, а также максимум и минимум вариационного ряда. Достоверность различий между исследуемыми группами исчислялась по методу Манна—Уитни,  $\chi^2$ , точного теста Фишера. Оценивалась доверительная вероятность  $p$ , различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Терапия

Дизайн протокола и блоки терапии приведены на рис. 1. Как видно из приведенных данных, пациенты с  $t(8;21)$ , как и большинство остальных пациентов, получали двойную индукцию в режиме «интенсивного тайминга» — т. е. с уменьшением интервалов между инициальными курсами ХТ, суть которого заключалась в коротком (не более 10 дней) промежутке от окончания первой фазы индукции (модифицированная классическая схема ADE) и началом 2-й фазы (блок HAM). Консолидация ремиссии для больных с  $t(8;21)$  состояла из 3 блоков терапии, основой которых служили высокие дозы Ага-С. Пилотная версия протокола подразумевала применение «интенсивного тайминга» во всех 3 блоках консолидирующей ХТ (табл. 1); суммарная доза Ага-С в консолидации составляла  $24 \text{ г/м}^2$ , антрациклинов —  $120 \text{ мг/м}^2$ . Причиной отказа от «интенсивного тайминга» в 2 блоках консолидирующей терапии послужил высокий уровень летальности от инфекционных осложнений



Рис. 1. Дизайн протокола OML-2000.

### Двойная индукция ADE-HAM:

ADE: Цитозин-арабинозин (Ara-C)  $100 \text{ мг/м}^2$  № 14, в дни 1–7; VP-16  $100 \text{ мг/м}^2$  № 3, в дни 1–3; Dnr  $45 \text{ мг/м}^2$  № 3, в дни 4–6. HAM: Ara-C  $1 \text{ г/м}^2$  № 4, в дни 14 и 15; Mit  $10 \text{ мг/м}^2$  № 2, в дни 14 и 15.

### Консолидация ремиссии 1 — HD Ara-C + Ida:

Ara-C  $3 \text{ г/м}^2$  № 6, в дни 1–3; Ida  $10 \text{ мг/м}^2$  № 3, в дни 2–4.

### Консолидация ремиссии 2 — Capizzi:

Ara-C  $1 \text{ г/м}^2$  № 4, в дни 1–2 и 8–9; L-aspirin  $6000 \text{ МЕ/м}^2$  № 2, в дни 3 и 10.

### Консолидация ремиссии 3 — AME-H:

Ara-C  $2 \text{ г/м}^2$  № 6, в дни 1–3; VP-16  $500 \text{ мг/м}^2$  № 1, в день 1; Mit  $30 \text{ мг/м}^2$  № 1, в день 3.

Таблица 1. Изменение консолидации для пациентов с  $t(8;21)$

Вариант	I	II	III
Консолидация 1	Capizzi + Vp: - Ara-C $1 \text{ г/м}^2$ № 8 в дни 1–2 и 8–9 - Vp-16 $100 \text{ мг/м}^2$ № 4 в дни 1–2 и 8–9 - L-aspirin $6000 \text{ Ед/м}^2$ № 2 в дни 3 и 10	HD Ara-C + Vp: - Ara-C $1 \text{ г/м}^2$ № 8 в дни 1–4 - Vp-16 $100 \text{ мг/м}^2$ № 4 в дни 1–4	HD Ara-C + Ida: - Ara-C $3 \text{ г/м}^2$ № 6 в дни 1–3 - Ida $10 \text{ мг/м}^2$ № 3 в дни 2–4
	Консолидация 3	AME-H: - Ara-C $1 \text{ г/м}^2$ № 8 в дни 1–2 и 8–9 - Vp-16 $500 \text{ мг/м}^2$ № 1 в день 2 - Mit $30 \text{ мг/м}^2$ № 1 в день 4 - L-aspirin $6000 \text{ Ед/м}^2$ № 1 в день 5 № 2 в день 3 и 10	AME-H: - Ara-C $1 \text{ г/м}^2$ № 8 в дни 1–4 - Vp-16 $500 \text{ мг/м}^2$ № 1 в день 2 - Mit $30 \text{ мг/м}^2$ № 1 в день 4 - L-aspirin $6000 \text{ Ед/м}^2$ № 1 в день 5

(см. результаты лечения). Вторая версия отличалась от пилотной только дизайном — «интенсивный тайминг» использовался только во втором блоке консолидирующей терапии, суммарные дозы Ага-С и антрациклинов оставались прежними. Среди 16 пациентов группы стандартного риска с  $t(8;21)$ , которые получали терапию согласно версиям I и II, у 3 (19%) развился рецидив. Это было расценено как недостаточная эффективность терапии и принято решение об эскалации доз антрациклинов и Ага-С для группы пациентов с  $t(8;21)$ : в окончательной версии в консолидирующей терапии суммарная доза Ага-С составила  $38 \text{ г/м}^2$ , а антрациклинов (в пересчете на дауно-

рубицин) — 240 мг/м<sup>2</sup>. Основная версия протокола представлена на рис. 1. Консолидация 2 согласно режиму Сариззи оставалась неизменной во всех версиях протокола. Проведение ТГСК пациентам с t(8;21) в первой ремиссии не планировалось. Оценка MRD выполнялась перед каждым блоком терапии, а после завершения терапии — один раз в 3 месяца, материалом для исследования был костный мозг.

### Результаты исследования

Хромосомный анализ был проведен 152 (87,86 %) больным из 173. Цитогенетические аномалии обнаружены у 117 (67,63 %) больных. Структура цитогенетических характеристик группы больных, включенных в исследование, приведена на рис. 2. Молекулярно-биологическое исследование проведено 153 (88,44 %) пациентам из 173. Аномальные транскрипты обнаружены у 70 (45,75 %) больных из 153.

Группу детей с t(8;21) составили 33 (19 %) ребенка из 173. При проведении хромосомного анализа транслокация t(8;21)(q22;q22) выявлена у 29 (87,8 %) детей из 33. Аномальный транскрипт *AML1/ETO* был обнаружен у 32 (96,7 %) больных из 33 (табл. 2). У 29 больных данные цитогенетического исследования коррелировали с данными молекулярного анализа, т. е. были обнаружены t(8;21)(q22;q22) и *AML1/ETO*.

У 2 больных с обнаружением химерного транскрипта *AML1/ETO* цитогенетическое исследование не проводилось (пациенты № 1 и 2).

У 7 детей обнаружены и транскрипт *AML1/ETO* и t(8;21), без дополнительных цитогенетических изменений (пациенты № 3–9). У 12 детей помимо t(8;21) была выявлена потеря половой хромосомы, без других дополнительных хромосомных аномалий (пациенты № 10–21). У 3 пациентов с t(8;21) обнаружена дополнительная делеция 9-й хромосомы (пациенты № 22–24).

Пациенты № 25–28 кроме t(8;21) имели ряд дополнительных редких хромосомных аномалий, влияние которых на прогноз основного заболевания не известно, в связи с чем мы рассматривали их как аномалии, не ухудшающие прогноз.

Всего 173

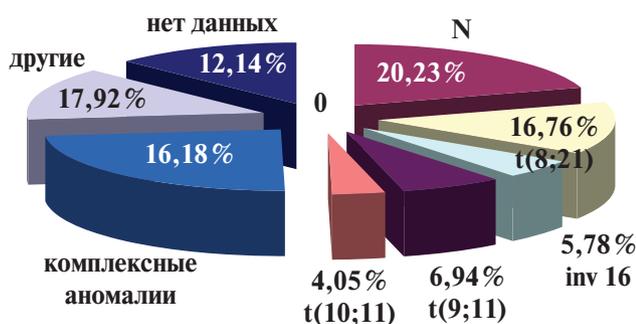


Рис. 2. Структура цитогенетических аномалий у больных ОМЛ, получающих терапию по протоколу ОМЛ-ММ 2000, по данным хромосомного анализа

Таблица 2. Данные хромосомного и молекулярного методов исследования у пациентов с t(8;21)

№ пациента	Кариотип	Транскрипт	Число больных
1, 2	Нет данных	<i>AML1/ETO</i>	2
3–9	46 XX (XY), t(8;21)	<i>AML1/ETO</i>	7
10–21	45X (-X/-Y), t(8;21)	<i>AML1/ETO</i>	12
22–24	t(8;21) del(9)	<i>AML1/ETO</i>	3
Редкие дополнительные аномалии в сочетании с t(8;21)*			
25	45X-Y, t(8;21) — 24 мет 44X-Y, t(8;21), (-20) — 6 мет	<i>AML1/ETO</i>	1
26	46XY, t(8;21), del(9) del(6)	<i>AML1/ETO</i>	1
27	47XX, t(8;21)+8	<i>AML1/ETO</i>	1
28	46XX, t(8;21) — 12 мет, 46XX, t(8;21) -18, +mar — 8 мет	<i>AML1/ETO</i>	1
Дополнительные потенциально неблагоприятные аномалии в сочетании с t(8;21)**			
29	46XY, t(8;21), 9q-, 7q-	<i>AML1/ETO</i>	1
30	46XX, t(8;21), 7q+	Нет данных	1
31	46XX, t(8;21), 9q-, 11q-	<i>AML1/ETO</i>	1
32	45XX, -7, i(17)(q10)	<i>AML1/ETO</i> '	1
33	45X-Y, t(8;21), del(7)	<i>AML1/ETO</i>	1

Мет — количество метафаз; 'контaminaция была исключена; \*не ухудшающие прогноз; \*\*ухудшающие прогноз.

Особую подгруппу составили 5 пациентов № 29–33, в чьих клетках помимо t(8;21) были выявлены хромосомные аномалии, затрагивающие 7-ю и 11-ю хромосому, нарушения в которых являются фактором, ухудшающим прогноз, что отразилось на результатах исследования в данной группе (см. результаты).

Среди всей группы детей были 11 (33 %) девочек и 22 (67 %) мальчика, медиана возраста составила 10,5 (2,7–16,8) лет. У 27 больных из 33 был М2-вариант согласно FAB-классификации, у 4 — М4, у 2 больных — М1, что составило 82 %, 12 % и 6 % соответственно.

Клинические характеристики пациентов в исследуемой группе были следующими: медиана количества лейкоцитов составила  $18,6 \times 10^9/\text{л}$  ( $3–109,5 \times 10^9/\text{л}$ ), медиана количества бластных клеток в костном мозге — 66,5 % (19,5–88 %). Спленомегалия была отмечена у 14/33 (42,5 %) детей. Нейролейкоз выявлен у 8 (24 %) больных, экстрамедуллярное поражение — также у 8 пациентов (у 7 с локализацией в области лица — орбита, скуловая кость, веки; у 1 — хлорома позвоночного канала). У 4 больных нейролейкоз сочетался с наличием экстрамедуллярных очагов.

Два (6 %) пациента из 33 получили терапию, частично отличавшуюся от первоначально запланированной. Один пациент был исключен из настоящего исследования в связи с тяжелыми инфекционными осложнениями после первой консолидации. Один пациент был исключен из исследования после проведения двойной индукции по желанию родителей.

### Результаты терапии

Результаты терапии ОМЛ в группе детей с  $t(8;21)$ , в сравнении с остальными пациентами, представлены в табл. 3. Клинико-гематологическая и молекулярная ремиссия были достигнуты у 31/33 (94 %) пациента. Двое детей умерли от инфекционных осложнений во время аплазии кроветворения, 1 — закончил терапию по протоколу после курса индукции по желанию родителей. Соответственно, консолидирующую терапию получили 30 пациентов, из них 25 (75 % от всей группы больных с  $t(8;21)$ ) полностью завершили терапию согласно протоколу. Одному больному проведение дальнейшей интенсивной противолейкемической терапии не было выполнено в связи с тяжелыми инфекционными осложнениями, 4 пациента умерли в ремиссии на разных сроках проведения консолидации, в том числе 3 — после последнего блока ПХТ. У 10 (40 %) из 25 детей развился рецидив заболевания, медиана срока его развития составила 17,8 (9–88) месяца. Вероятность БСВ в течение 10 лет составила 0,45. Все дети с рецидивом получили противорецидивную терапию, в основном по международному протоколу Relapsed AML-2001/01, в котором индукция 2-й ремиссии проводилась флударабином, высокими дозами Ara-C и G-CSF (режим FLAG) в сочетании с липосомальным даунорубицином или без такового, с последующей обязательной миелоаблативной терапией и ТГСК. Частота достижения 2-й ремиссии составила 90 % [44, 45].

На рис. 3 представлены графики выживаемости в группе пациентов с  $t(8;21)$ . Необходимо отметить,

Таблица 3. Результаты терапии ОМЛ в исследуемой группе больных с  $t(8;21)$

Результаты терапии	$t(8;21)$	Остальные пациенты	$p$
Смерть до ремиссии	2/33 (6%)	8/140 (5,7%)	0,6
Рефрактерность	0/33	13/140 (9,3%)	0,09
Ремиссия	31/33 (94%)	117/140 (83,6%)	0,1
Смерть в I ремиссии	5/31 (16%)	10/117 (8,5%)	0,2
Медиана I ремиссии, мес	23,1 (3,43–135,5)	12 (0–133,4)	0,18
Рецидивы	10/25 (40%)	48/117 (41%)	0,5
Медиана развития рецидива, мес	17,8 (9–88)	9,2 (1,4–133,4)	0,2
I полная ремиссия	13/31 (42%)	57/117 (49%)	0,4
EFS	0,45 ± 0,09	0,36 ± 0,04	0,22
RFS	0,55 ± 0,09	0,48 ± 0,05	0,25
OS	0,67 ± 0,08	0,44 ± 0,04	0,04

что внутри группы благоприятного прогноза имелись различия в результатах терапии. Так, у детей с  $inv(16)$ , которые получали наименее интенсивную терапию (рис. 1), БСВ составила 0,70. Хотя эта величина существенно больше вероятности БСВ детей с  $t(8;21)$ , это различие статистически недостоверно ( $p=0,16$ ). Анализ цитогенетических характеристик

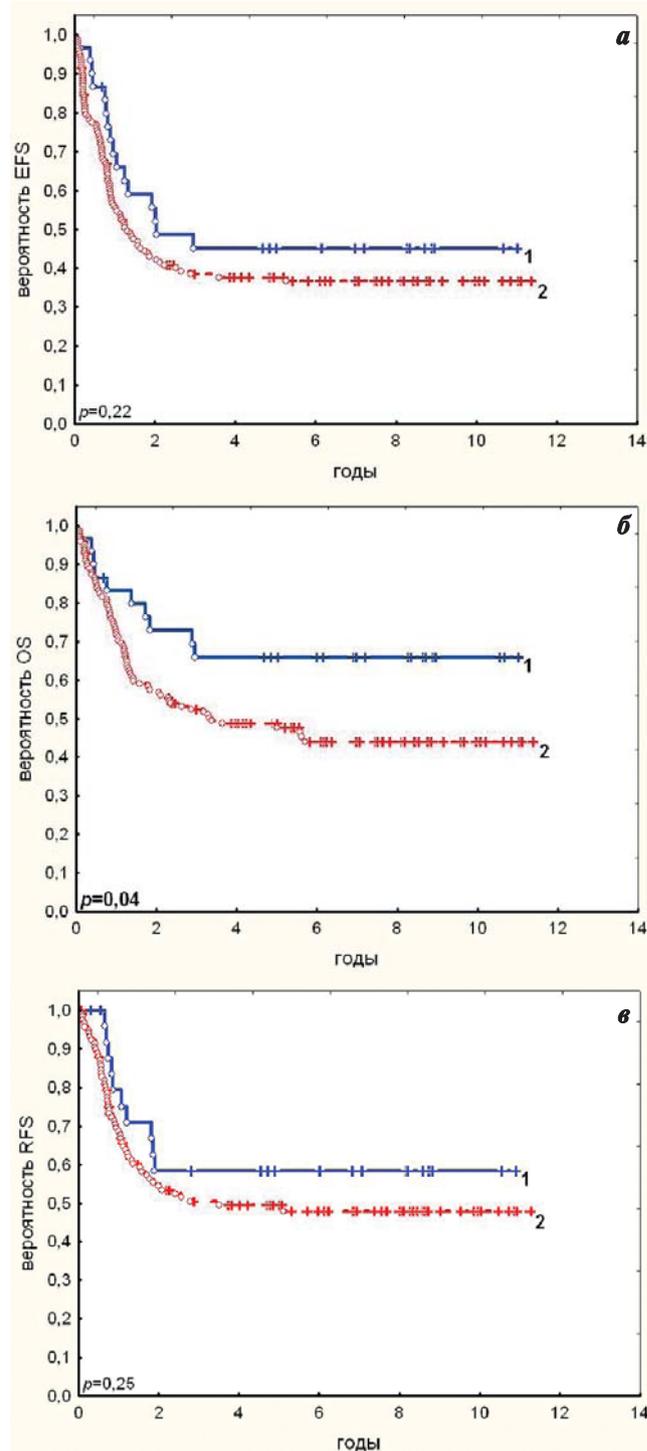


Рис. 3. Выживаемость пациентов в зависимости от наличия  $t(8;21)$ : А — EFS; Б — OS; В — RFS. Пациенты с  $t(8;21)$ : EFS — 0,45 ± 0,09; OS — 0,67 ± 0,08; RFS — 0,55 ± 0,09. Пациенты без  $t(8;21)$ : EFS — 0,36 ± 0,04; OS — 0,44 ± 0,04; RFS — 0,48 ± 0,05.

внутри группы больных с t(8;21) (см. табл. 2) показал, что результаты у больных с t(8;21) и потенциально неблагоприятными аномалиями были достоверно хуже результатов терапии в остальной группе: БСВ 0 и  $0,34 \pm 0,16$  соответственно ( $p=0,027$ ) (рис. 4).

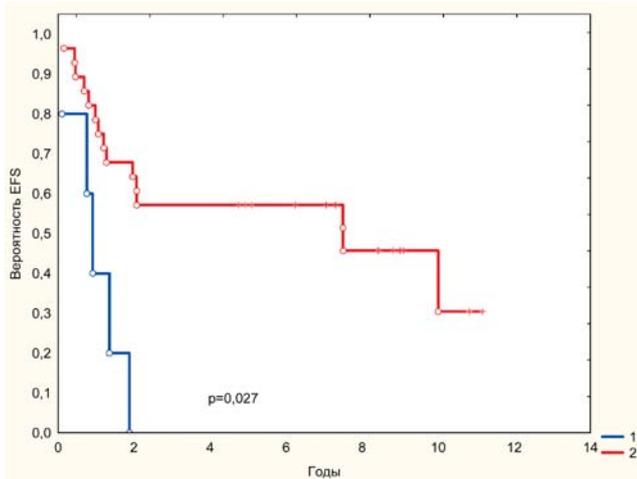


Рис. 4. Вероятность EFS внутри группы пациентов с t(8;21):

1 — пациенты с t(8;21) и потенциально неблагоприятными аномалиями EFS 0 ( $n=5$ );

2 — пациенты с t(8;21) из остальной группы EFS  $0,34 \pm 0,16$  ( $n=28$ )

Наличие нейрорлейкоза (8/33 пациентов) и экстрамедуллярного поражения (8/33 пациентов) не влияли на результаты терапии в группе больных с t(8;21) (табл. 4).

Анализ инфекционных осложнений больных, получавших терапию по протоколу ОМЛ-ММ-2000, показал, что у 7 (29%) из 24 больных с микробиологически подтвержденным сепсисом была t(8;21). Инфекции послужили причиной прекращения терапии у 2/148 (1,35%) больных в ремиссии. У одного из них была t(8;21).

Сравнительный анализ 3 разных вариантов консолидации не показал статистически достоверных различий в результатах терапии (табл. 5).

**Анализ летальности**

Из 33 больных с t(8;21) умерли 11 (33%). До достижения ремиссии умерли 2 ребенка (2/33, 6%): первый больной — от сочетанной инвазивной

Таблица 5. Сравнительный анализ различных вариантов консолидирующей терапии у пациентов группы t(8;21)

Консолидация	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Всего больных	p
Число больных	5	11	14	30*	0,6
Смерть в ремиссии	2	3	0	5	0,09
Рецидив	1	2	7	10	0,1
I полная ремиссия	2	5/1 lost	6/1 снят	13/1 lost	0,2

\* 30 больных получили консолидацию ремиссии, так как 2 больных погибли до достижения ремиссии, и один больной снят с протокола после блока индукции.

грибковой инфекции (ИГИ) (данные бактериологического исследования аутопсийного материала — *Rhodotorula rubra* и *Aspergillus fumigatus*); 2-й — от сочетания аспергиллезного поражения легких *Aspergillus flavus* и кровоизлияния в головной мозг (данные аутопсии).

В первой полной ремиссии умерли 5 (15,2%) пациентов из 33: 2 от ИГИ (*Fusarium*, *Asp. flavus*) и 2 — от бактериальной инфекции (сепсис — *Ps. aeruginosa*). Необходимо отметить, что эти 4 пациента составляют 50% от всех больных с ОМЛ, умерших в первой ремиссии от инфекционных осложнений. Один больной погиб от несчастного случая. От рецидива в группе t(8;21) умерли 3 больных. Один больной умер после проведения ТГСК во 2-й ремиссии.

**Общие результаты лечения (рис. 5)**

Всего среди больных из группы t(8;21) в настоящее время жив 21 (70%) ребенок, из них в первой ремиссии 13 (39,4%) детей, и 8 (24,3%) детей — во 2-й ремиссии. Один больной потерян из-под наблюдения в первой ремиссии на сроке наблюдения 6,8 месяца. Умерли 11 (33%) детей из 33.

**Обсуждение**

Применение интенсивной ПХТ и ТГСК, современной сопроводительной терапии, дифференциру-

Таблица 4. Вероятность EFS, RFS, OS у пациентов с t(8;21) в зависимости от наличия нейрорлейкоза и экстрамедуллярных поражений

	N +	N -	p	X +	X -	p	(N+X) +	(N+X) -	p
n	8	25		8	25		4	21	
EFS	$0,37 \pm 0,17$	$0,59 \pm 0,09$	0,8	$0,36 \pm 0,17$	$0,52 \pm 0,09$	0,8	$0,50 \pm 0,25$	$0,57 \pm 0,09$	0,8
RFS	$0,37 \pm 0,17$	$0,63 \pm 0,09$	0,2	$0,38 \pm 0,17$	$0,63 \pm 0,11$	0,2	$0,50 \pm 0,25$	$0,73 \pm 0,11$	0,7
OS	$0,75 \pm 0,15$	$0,64 \pm 0,09$	0,4	$0,75 \pm 0,15$	$0,64 \pm 0,09$	0,4	$0,75 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,09$	0,6

n — число пациентов, N — нейрорлейкоз, X — хлоромы, + присутствовали, — не было.

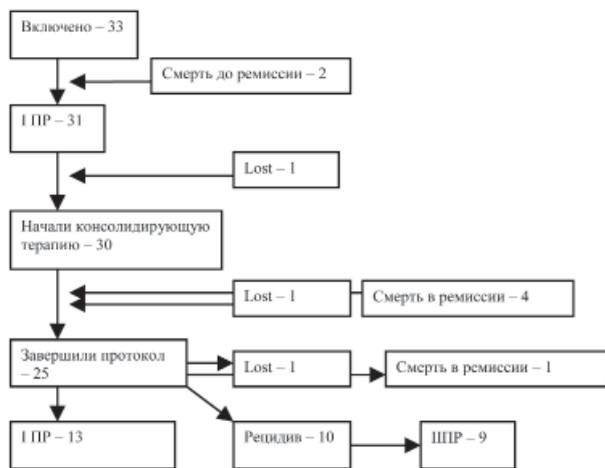


Рис. 5. Общие данные о результатах терапии в группе пациентов с  $t(8;21)$

ющей терапии в зависимости от биологических характеристик лейкемических клеток позволили увеличить продолжительность жизни больных с ОМЛ в отдельных подгруппах до 60–70% [3, 4]. Дальнейший прогресс результатов терапии возможен только вследствие лучшего понимания биологических основ развития ОМЛ и выявления новых генетических маркеров заболевания [19]. Только это позволит полностью реализовать идею дифференцированной терапии, возможность воплощения которой отлично демонстрируют результаты лечения детей с ОМЛ с  $inv(16)$ , которым для получения наилучших результатов (вероятность достижения ремиссии — 100%, медиана продолжительности ремиссии — 52 месяца, вероятность БСВ — 70%) требуется наименее агрессивная терапия из всей группы не-М3 ОМЛ. Результаты лечения больных с другой «благоприятной» хромосомной аномалией  $t(8;21)$  оказались если и не разочаровывающими, то, по крайней мере, хуже, чем при  $inv(16)$ , несмотря на существенно более интен-

сивную терапию: частота ремиссии — 94%, медиана ее продолжительности — 21,3 месяца, БСВ — 48%. Эти результаты существенно уступают данным других групп, несмотря на весьма схожие принципы терапии, дозы и «компоновку» химиопрепаратов. Очевидно, что расхождения в результатах объясняются как высоким уровнем инфекционной летальности, так и рецидивами заболевания. Одной из особенностей пациентов с  $t(8;21)$  в нашем исследовании стал высокий риск доказанных бактериальных и грибковых инфекций, что уже неоднократно отмечалось в литературе. Учитывая высокий риск как прямой инфекционной летальности, так и связанной с инфекциями невозможности дальнейшего проведения эффективной противолейкемической терапии, при ведении таких пациентов необходим самый высокий стандарт сопроводительной терапии.

Интересно, что наихудшие результаты в нашем исследовании были получены у пациентов в группе  $t(8;21)$  с потенциально неблагоприятными аномалиями, в которой вероятность БСВ составила 0. Похожие тенденции выявлены и другими исследовательскими группами. Таким образом, пациенты этой группы с учетом высокой вероятности рецидива могут расцениваться как кандидаты на аллогенную ТГСК в первой ремиссии. Эти данные еще раз подтвердили, что при применении современной терапии внутри группы с  $t(8;21)$  существуют разные субварианты заболевания, прогноз которых определяется дополнительными факторами. Соответственно, для выделения истинно благоприятной группы больных с  $t(8;21)$  необходима всеобъемлющая диагностика — хромосомный анализ и расширенное молекулярно-генетическое исследование с целью выявления всех значимых факторов прогноза. Это станет следующим шагом на пути к более дифференцированному лечению.

## Л и т е р а т у р а

- Pui C.H., Schrappe M., Ribeiro R.C. et al. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004;118–45.
- Kaspers G.J., Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005 Dec;19(12):2025–9.
- Creutzig U., Zimmermann M., Ritter J. et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005 Dec;19(12):2030–42.
- Gibson B.E., Wheatley K., Hann I.M. et al. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005 Dec;19(12):2130–8.
- Rowley J.D. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 1973;16:109–12.
- Ferrara F., Del Vecchio L. Acute myeloid leukemia with  $t(8;21)/AML1/ETO$ : a distinct biological and clinical entity. *Haematologica* 2002;87:306–19.
- Strout M.P., Marcucci G., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. Core-binding factor (CBF) and MLL-associated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications. *Ann Hematol* 1999;78:251–64.
- Marcucci G., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. Molecular and clinical advances in core binding factor primary acute myeloid leukemia: a paradigm for translational research in malignant hematology. *Cancer Invest* 2000; 18:768–80.
- Raimondi S.C., Chang M.N., Ravindranath Y., Behm F.G., Gresik M.V., Steuber C.P. et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study — POG 8821. *Blood* 1999;94:3707–16.
- Hiddemann W., Büchner T., Ritter J. et al. Acute Leukemias IX. Basic research, experimental approaches and novel therapies.
- Andrieu V., Radford-Weiss I., Troussard X., Chane C., Valensi F., Guesnu M. et al. Molecular detection of  $t(8;21)/AML1-ETO$  in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *Br J Haematol* 1996;92:855–65.
- Hurwitz C.A., Raimondi S.C., Head D., Krance R., Mirro J. Jr, Kalwinsky D.K. et al. Distinctive immunophenotypic features of  $t(8;21)(q22;q22)$  acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 1992;80:3182–8.
- Kita K., Nakase K., Miwa H., Masuya M., Nishii K., Morita N. et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia asso-

- ciated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B cell antigen CD19 together with the stem cell antigen CD34. *Blood* 1992;80:470–7.
14. Kita K., Shirakawa S., Kamada N. Cellular characteristics of acute myeloblastic leukemia associated with t(8;21)(q22;q22). The Japanese Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1994;13:229–34.
15. Dusenbery K.E., Howells W.B., Arthur D.C. et al. Extramedullary leukemia in children with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003 Oct;25(10):760–8.
16. Kobayashi R., Tawa A., Hanada R. et al. Extramedullary infiltration at diagnosis and prognosis in children with acute myelogenous leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007 Apr;48(4):393–8.
17. Schwyzer R., Sherman G.G., Cohn R.J. et al. Granulocytic sarcoma in children with acute myeloblastic leukemia and t(8;21). *Med Pediatr Oncol* 1998 Sep;31(3):144–9.
18. Tallman M.S., Hakimian D., Shaw J.M., Lissner G.S., Russell E.J., Variakojis D. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1993;11:690–7.
19. Byrd J.C., Weiss R.B., Arthur D.C., Lawrence D., Baer M.R., Davey F. et al. Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *J Clin Oncol* 1997;15:466–75.
20. Grimwade D., Walker H., Oliver F. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322–33.
21. Marcucci G., Mrozek K., Ruppert A.S. et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005;23:5705–17.
22. Heim S., Mitelman F. Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Cancer cytogenetics*. Second ed. Chichester et al. Wiley-Liss; 1995.
23. Lin P., Chen L., Luthra R., Konoplev S.N., Wang X., Medeiros L.J. Acute myeloid leukemia harboring t(8;21)(q22;q22): a heterogeneous disease with poor outcome in a subset of patients unrelated to secondary cytogenetic aberrations. Department of Hematopathology, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77003, USA. [peilin@mdanderson.org](mailto:peilin@mdanderson.org).
24. Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A. et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000 Dec 15;96(13):4075–83.
25. Schoch C., Haase D., Haferlach T. et al. Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia* 1996;10:1288–95.
26. Sarriera J.E., Albitar M., Estrov Z. et al. Comparison of outcome in acute myelogenous leukemia patients with translocation (8;21) found by standard cytogenetic analysis and patients with AML1/ETO fusion transcript found only by PCR testing. *Leukemia* 2001 Jan;15(1):57–61.
27. Kiyoi H., Naoe T. Biology, clinical relevance, and molecularly targeted therapy in acute leukemia with FLT3 mutation. *Int J Hematol* 2006 May;83(4):301–8.
28. Doepfner K.T., Boller D., Arcaro A. Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007 Sep;63(3):215–30. Epub 2007 Jul 19.
29. Testa U., Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007 Jan;92(1):81–94.
30. Kondo M., Horibe K., Takahashi Y. et al. Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1999 Dec;33(6):525–9.
31. Meshinchi S., Alonzo T.A., Stirewalt D.L. et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006 Dec;108(12):3654–61. Epub 2006 Aug 15.
32. Zwaan C.M., Meshinchi S., Radich J.P. et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003 Oct;102(7):2387–94.
33. Heibert S.W., Lutterbach B., Durst K. et al. Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001 Aug;48 Suppl 1:31–4.
34. Boissel N., Leroy H., Brethon B. et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006 Jun;20(6):965–70.
35. Paschka P., Marcucci G., Ruppert A.S., Mrozek K. et al. Adverse Prognostic Significance of KIT Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia With inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006 Aug;24:3904–11.
36. Shimada A., Taki T., Tabuchi K. et al. *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *BLOOD* March 2006;107,5:1805–9.
37. Nucifora G., Larson R.A., Rowley J.D. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 1993;82:712–5.
38. Saunders M.J., Tobal K., Yin J.A. Detection of t(8;21) by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in remission of acute myeloid leukemia type M2 after chemotherapy or bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1994;18:891–5.
39. Miyamoto T., Nagafuji K., Akashi K. et al. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996;87:4789–96.
40. Tobal K., Newton J., Macheta M., Chang J. et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000;95:815–9.
41. Morschhauser F., Cayuela J.M., Martini S., Baruchel A. et al. Evaluation of Minimal Residual Disease Using Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction in t(8;21) Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Study of 51 Patients. *J Clin Oncol* 2000;18:788–94. 2000 by American Society of Clinical Oncology.
42. Swerdlow S.H., Campo E., Yarris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th Ed.). International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2008; p. 439.
43. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *Br J Haematol* 1976 Aug;33(4):451–8.
44. Kaspers G.J.L., Zwaan C.M. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica/the hematology journal* 2007;92(11):1519–32.
45. Kaspers G.J.L., Zimmermann M., Reinhardt D., Tamminga R., Maschan A. et al. Clinical relevance of early treatment response in pediatric relapsed acute myeloid leukemia (AML): study relapsed AML 2001/01. *Annals of Hematology*; Vol 87 (Suppl 1) February 2008.