

ВРЕМЯ ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ РЕМИССИИ КАК ФАКТОР ПРОГНОЗА У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Г.А. Цаур^{1,2}, Т.В. Наседкина³, А.М. Попов^{1,2,4}, О.В. Каленник³,
А.Г. Солодовников⁴, Т.О. Ригер^{1,2}, Ю.А. Яковлева^{1,2,4}, А.С. Иванова^{1,2,4},
А.Е. Друй^{1,4}, О.М. Плеханова¹, Е.В. Шориков^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,4}, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹ГУЗ Областная детская клиническая больница №1, Екатеринбург; ²ГУЗ Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург; ³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;
⁴ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Контакты: Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru

Ответ на терапию является одним из важнейших прогностических факторов, влияющих на исход острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Цель данной работы — оценка времени достижения молекулярной ремиссии у детей первого года жизни с ОЛЛ и перестройками гена MLL, получавших терапию по протоколу MLL-Baby. Под молекулярной ремиссией понимали отсутствие химерного транскрипта в ходе вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с чувствительностью не менее 1×10^{-4} , подтвержденное негативным результатом в следующей точке наблюдения (ТН). Определение химерного транскрипта проводилось на 15, 36, 43-й дни терапии (ТН1–ТН3), а также во время консолидации/интенсификации (ТН4–ТН9). Ретроспективно все пациенты были разделены на 2 группы. В 1-ю группу — с быстрым достижением молекулярной ремиссии — вошло 14 пациентов, которые достигли молекулярной ремиссии к ТН4. В данной группе произошло 2 рецидива. Во 2-ю группу отнесены 4 пациента, не достигшие молекулярной ремиссии к ТН4. Среди пациентов 2-й группы было зафиксировано 3 рецидива, что достоверно выше, чем в 1-й (отношение шансов 18,0; 95% ДИ: 1,19–271,47; $p=0,044$). Шестилетняя бессобытийная выживаемость в 1-й группе достигла $0,84 \pm 0,10$, во 2-й — $0,25 \pm 0,21$ ($p=0,023$). Кумулятивная вероятность развития рецидива составила в 1-й группе $0,15 \pm 0,01$, во 2-й — $0,75 \pm 0,08$ ($p=0,022$). Время достижения молекулярной ремиссии не было связано с начальными факторами риска, а также ответом на терапию на 8, 15, 36-й дни. Показано, что отсутствие быстрого достижения молекулярной ремиссии, т. е. обнаружение химерного транскрипта в ТН4, связано с высокой вероятностью развития рецидива.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети первого года жизни, минимальная остаточная болезнь, ответ на терапию, перестройки гена MLL, полимеразная цепная реакция

Prediction of outcome in infants acute lymphoblastic leukemia by time to achievement of molecular remission

G.A. Tsaur^{1,2}, T.V. Nasedkina³, A.M. Popov^{1,2,4}, O.V. Kalennik³, A.G. Solodovnikov⁴, T.O. Riger^{1,2}, Yu.A. Yakovleva^{1,2,4}, A.S. Ivanova^{1,2,4},
A.E. Druy^{1,4}, O.M. Plekhanova¹, E.V. Shorikov^{1,2}, L.I. Saveliev^{1,2,4}, L.G. Fechina^{1,2};

¹Regional Children's Hospital N1, Yekaterinburg; ²Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg;

³Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow; ⁴Ural State Medical Academy, Yekaterinburg

Early therapy response is one of the major prognostic factors influencing an outcome of acute lymphoblastic leukemia (ALL). The purpose of the given work was to define a time point (TP) of fusion gene transcript (FGt) monitoring by reverse-transcriptase PCR that clearly predicts outcome in infants with MLL-rearranged ALL, enrolled onto MLL-Baby protocol. Molecular remission (cMR) was defined as absence of FGt at nested RT-PCR with sensitivity 1×10^{-4} or higher confirmed with negative result in the following time point (TP). Detection of FGt in bone marrow (BM) was performed by qualitative nested RT-PCR on 15th, 36th and 43th days of therapy (TP1-TP3) and also during consolidation/intensification (TP4-TP9).

Retrospectively, patients were divided into two groups. First group included 14 patients who achieved cMR by TP4, where two relapses occurred. The second group consisted of four MLL-AF4-positive patients, who did not achieve cMR by TP4. In this group there were 3 relapses. Number of relapses was significantly higher in the second group (odds ratio 18.00; 95% CI: 1.19–271.47; $p=0.044$). 6-years event-free survival (EFS) in the first group was 0.84 ± 0.10 , in the second group — 0.25 ± 0.21 ($p=0.023$). Cumulative incidence of relapse in the first group was 0.15 ± 0.01 , in the second group 0.75 ± 0.08 ($p=0.022$). Time of cMR achievement did not correlate with any known prognostic factors including therapy response on day 8, 15 and 36.

Slow achievement of cMR corresponds to poor outcome in infant ALL with MLL rearrangements. Persistence of FGt at TP4 allows defining patients with high risk of relapse.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, infants, minimal residual disease, treatment response, MLL rearrangements, polymerase chain reaction

Введение

За последние 30 лет достигнуты значительные успехи в лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. Бессобытийная выживаемость (БСВ) пациентов возросла до 79–86% [1–3]. В то же время эффективность терапии некоторых вариантов ОЛЛ заметно ниже. К этой категории можно отнести ОЛЛ у детей первого года жизни. Пятилетняя БСВ в данной группе пациентов не превышает 47–54% [4, 5]. Установлено, что ОЛЛ у детей первого года жизни характеризуется рядом биологических особенностей, в частности, высоким инициальным лейкоцитозом, большой экстрамедуллярной массой опухоли, преобладанием про-В-иммунофенотипа (BI-ALL) с коэкспрессией миелоидных и нейральных маркеров (CD15, CD65, NG2), частым наличием перестроек гена *MLL*.

В Российской Федерации и Республике Беларусь для лечения детей первого года жизни с ОЛЛ применяется отечественный протокол MLL-Baby [6, 7], в основе которого лежит использование наряду с программной химиотерапией полностью транс-ретиноевой кислоты (АТРА) в качестве дифференцировочного агента. Важная особенность протокола заключается в отслеживании эффективности терапии путем оценки минимальной остаточной болезни (МОБ). Перестройки гена *MLL* у детей первого года жизни представляют собой удобную мишень для мониторинга МОБ методом полимеразной цеп-

ной реакции (ПЦР), так как встречаются у 70% пациентов [5]. Одним из методов мониторингирования перестроек гена *MLL* является гнездная обратнотранскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР). Достижение молекулярной ремиссии — один из наиболее важных шагов на пути полного излечения от ОЛЛ. В используемой нами литературе не встретилось оценки прогностического значения достижения молекулярной ремиссии у пациентов с перестройками гена *MLL*, что и стало предметом данной работы.

Материалы и методы

Критерии включения в данное исследование:

1. Верифицированный диагноз ОЛЛ у пациентов в возрасте до 365 дней, лечившихся по протоколу MLL-Baby (рис. 1).
2. Длительность наблюдения за пациентом не менее 12 мес, что позволяет отследить развитие очень ранних рецидивов, которые до начала использования протокола MLL-Baby являлись одной из основных причин неудач терапии [7].
3. Наличие перестроек гена *MLL*.
4. Не менее 4 точек наблюдения (ТН), в которые было проведено молекулярно-генетическое исследование костного мозга методом ОТ-ПЦР. Таким образом, за период с сентября 2003 г. по июнь 2008 г. в исследование было включено 18 детей первого года жизни с ОЛЛ и перестройками гена *MLL*, в том числе 7 (39 %) мальчиков и 11 (61%) девочек; медиана возраста составила

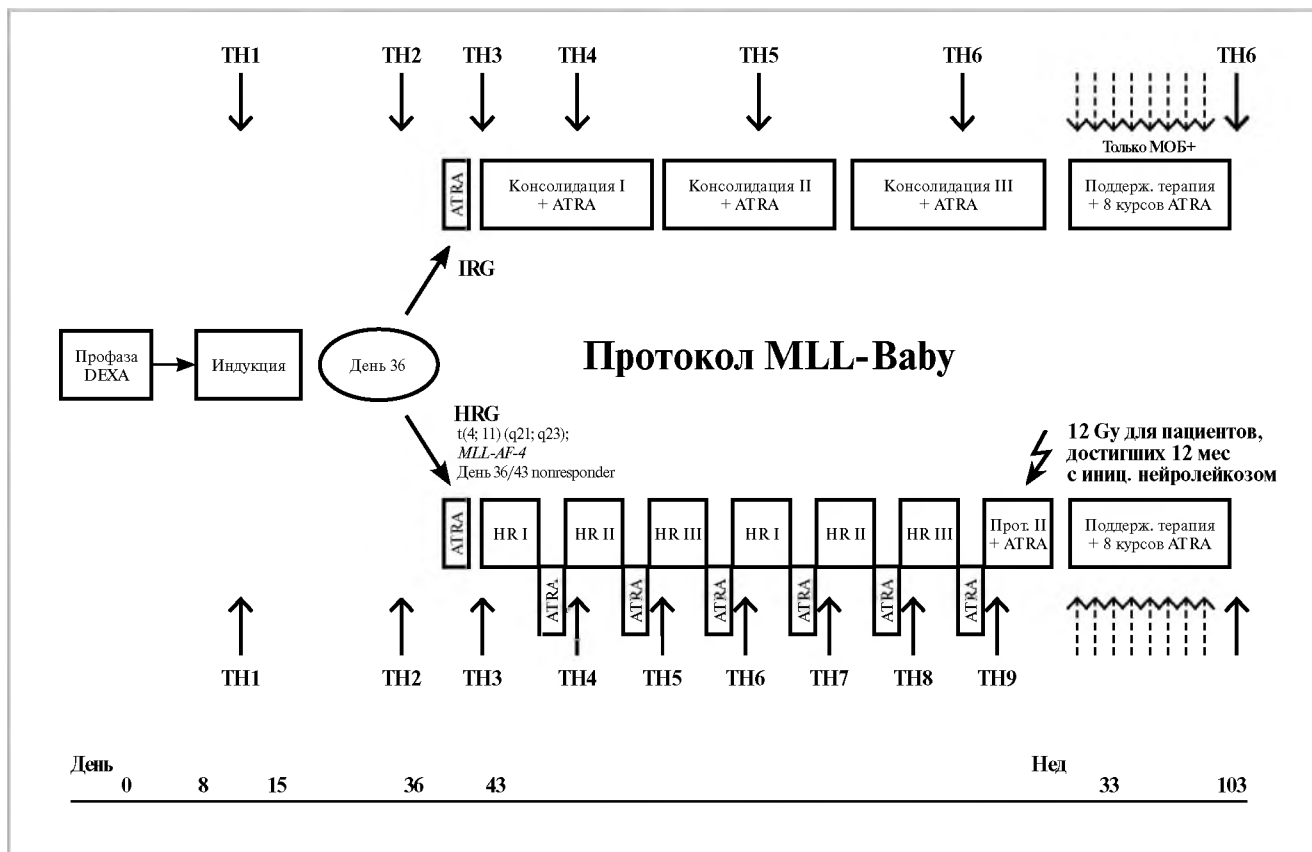


Рис. 1. Схема протокола MLL-Baby с указанием точек наблюдения (ТН), в которых производилась оценка наличия химерного транскрипта

7 мес (1 день—11 мес). Лейкоцитоз более $100 \times 10^9/\text{л}$ в момент постановки диагноза имели 8 (44%) пациентов. Инициальное поражение центральной нервной системы (ЦНС) было выявлено у 3 (17%) больных. Иммунофенотип опухолевых клеток, а также выявленные перестройки гена *MLL* приведены в табл. 1. Цитогенетическое исследование костного мозга выполняли после краткосрочного культивирования (24—48 ч) с последующей дифференциальной окраской. Кариотипирование проводили в соответствии с номенклатурой ISCN [8]. У 6 пациентов проведено дополнительное исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с локус-специфическим зондом LSI *MLL* Dual Color Rearrangement Probe 11q23 («Abbott», США) согласно инструкции производителя.

У 10 пациентов выявление перестроек гена *MLL* и последующий мониторинг уровня химерного транскрипта (ХТр) проводили методом гнездовой ОТ-ПЦР по ранее описанным протоколам [9—11] с рядом модификаций. Лейкоциты и бластные клетки выделяли из костного мозга путем лизиса в 0,84% растворе хлорида аммония, после чего подсчитывали ядросодержащие клетки на гематологическом анализаторе KX-21 («Sysmex», Япония). В работу брали 5×10^6 ядерных клеток. Для выделения РНК использовали TRIreagent («Molecular Research Center», США) в объеме 1 мл. Полученную РНК обрабатывали ДНКазой I («Fermentas», Латвия) согласно инструкции производителя, после чего 1 мкг переводили в комплементарную ДНК (кДНК) в ходе реакции обратной транскрипции, которая проходила при 37°C в течение 60 мин с использованием MML-V обратной транскриптазы («Promega», Германия) и смеси случайных нумеров («Синтол», Россия). В ПЦР брали кДНК в количестве, эквивалентном 100 нг РНК. Для проведения ПЦР использовали ДияТак-полимеразу (ЦНИИ эпидемиологии, Россия) и амплифика-

тор «GeneAmp PCR system 9700 Gold» («Applied Biosystems», США). Детекцию проводили методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. Верификацию выявленных продуктов амплификации осуществляли при помощи прямого секвенирования на генетическом анализаторе «ABI 3130» («Applied Biosystems», США) с использованием «BigDye Terminator 3.1» («Applied Biosystems», США). Чувствительность ОТ-ПЦР, которую оценивали методом лимитирующих разведений клеточной культуры RS411, составила 5×10^{-5} .

У 8 пациентов перестройки гена *MLL* выявлялись и мониторовались при помощи наборов «ЛК-Биочип» («Биочип-ИМБ», Москва) согласно инструкции производителя. При этом РНК выделяли из лейкоцитов костного мозга больных лейкозом с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Выделенную РНК в количестве 2 мкг инкубировали при 70°C в течение 5 мин со смесью кДНК-праймеров, специфических для указанных транслокаций и для контрольного гена *ABL*. Затем проводили обратную транскрипцию при 37°C в течение 90 мин с использованием MML-V обратной транскриптазы («Силекс», Россия). Далее полученную кДНК использовали в мультиплексных ПЦР в 2 этапа. В 25 мкл ПЦР-смеси 1-го этапа вносили 1 мкл образца, полученного в реакции обратной транскрипции. Использовали фермент Таq-полимеразы («Силекс», Россия). В ПЦР-смесь стандартного состава («Силекс», Россия) добавляли праймеры, специфические для анализируемых ХТр и для контрольного гена *ABL* по 20 пмоль каждого. Всю смесь нагревали при 94°C в течение 3 мин, затем проводили 25 циклов амплификации по следующей схеме: 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 1 мин. В 25 мкл ПЦР-смеси 2-го этапа вносили 2 мкл продукта первого раунда ПЦР. Состав ПЦР-смеси и условия ПЦР были те же, с той разницей, что на 2-м этапе один из праймеров в каждой паре

Таблица 1. Выявленные перестройки гена *MLL* и иммунофенотип пациентов, включенных в исследование

Химерный ген	Иммунофенотип			AUL*	Всего
	CD10(-)cytr(-)	CD10(-/+)cytr(-)	CD10(-)cytr(+)		
<i>MLL-AF4</i>	8	2	1	—	11
<i>MLL-MLLT1</i>	1	—	—	—	1
<i>MLL-MLLT3</i>	—	—	—	1	1
<i>MLL-MLLT10</i>	1	—	2	—	3
<i>MLL-EPS15</i>	2	—	—	—	2
Всего...	12	2	3	1	18

*AUL — острый недифференцированный лейкоз

содержал флуоресцентную метку и концентрация немеченого праймера была в 5 раз ниже, чем меченого. Полученные на 2-й стадии мультиплексной ПЦР флуоресцентно меченные образцы использовали для гибридизации на биочипе. Гибридизационная смесь общим объемом до 40 мкл состояла из 20% формамида («Serva», США), 5-кратного буфера SSPE (Saline-sodium-phosphate-EDTA) («Promega», США) и амплификата общим объемом 22 мкл. Гибридизационную смесь денатурировали при 95°C (5 мин), быстро охлаждали на льду (1 мин), наносили на биочип и оставляли на ночь при 37°C. Далее биочип отмывали в однократном SSPE буфере в течение 10 мин при комнатной температуре и высушивали. Флуоресцентный сигнал регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов («Биочип-ИМБ», Москва). Автоматический анализ изображения проводили с помощью программы ImageWare («Биочип-ИМБ», Москва). Чувствительность набора «ЛК-Биочип» для выявления перестроек гена *MLL* составила 1×10^{-4} .

Метод количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с чувствительностью 1×10^{-4} использовали согласно рекомендациям международной программы «Европа против рака» [12, 13].

Наличие ХТр оценивали в следующих ТН: ТН1–ТН2 — 15-й и 36-й дни индукционной терапии, ТН3–ТН9 — после каждого курса полностью трансретиноевой кислоты (рис. 1). Пациенты с инициальным наличием химерного гена *MLL-AF4* получали терапию по ветви протокола для высокого риска, все остальные (при условии достижения клинико-гематологической ремиссии к 36-му дню) — по ветви промежуточного риска. Достижение молекулярной ремиссии расценивалось как отсутствие химерного транскрипта в ходе ПЦР с чувствительностью не ниже 1×10^{-4} , подтвержденное негативным результатом в следующей ТН [14].

Результаты терапии оценивали по количеству рецидивов и числу больных, находящихся в полной продолжительной ремиссии (ППР), а также по кривым БСВ, построенным по методу Каплана–Майера [15]. Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический Log-rank-критерий. При сравнении групп пациентов по качественным признакам применяли точный критерий Фишера, при сравнении по порядковому признаку — критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Анализ результатов проводился с помощью программ для статистической обработки данных STATISTICA for Windows 6.0 и R-statistic. Отношение шансов рассчитано с использованием пакета программ SPSS 16.0.

Результаты

В ТН1 у всех 18 пациентов было выявлено наличие ХТр. В исследованной группе не было пациентов, не ответивших на терапию к 36-му дню

(ТН2): по данным световой микроскопии все они находились в ремиссии, но только у 3 из них зафиксирована молекулярная ремиссия в этой ТН. Это были 2 пациента с наличием *MLL-MLLT10* и 1 пациент с *MLL-AF4*. В ТН3 — после первого курса полностью транс-ретиноевой кислоты — ХТр не был выявлен еще у 4 больных: у 2 пациентов, имевших *MLL-AF4*, и у 2 пациентов с наличием химерных генов *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT10* соответственно. В ТН4 еще 7 пациентов достигли молекулярной ремиссии. Четверо из них первоначально имели *MLL-AF4*, двое — *MLL-EPS15*, 1 пациент — *MLL-MLLT3*. У 2 пациентов с наличием *MLL-AF4* молекулярная ремиссия зафиксирована в ТН9 (после 6-го блока высокого риска). В то же время у 3 пациентов молекулярной ремиссии достичь не удалось.

Ретроспективно пациенты были разделены на 2 группы по времени достижения молекулярной ремиссии. В 1-ю группу (с быстрым достижением молекулярной ремиссии) вошло 14 больных, у которых элиминация ХТр произошла до наступления ТН4. Ко 2-й группе (с отсутствием быстрого достижения молекулярной ремиссии) было отнесено 4 пациента, у которых элиминация ХТр произошла позже, чем ТН4, или не произошла совсем (рис. 2). Группы были сопоставимы между собой по демографическим характеристикам и инициальным факторам риска ОЛЛ, таким как уровень лейкоцитоза, наличие нейрорлейкемии, иммунофенотип, наличие *MLL-AF4*. Также не было выявлено достоверных различий между 2 группами по ответу на терапию на 8-й и 15-й дни индукционной терапии, достижению клинико-гематологической ремиссии на 36-й день (табл. 2). В группе с быстрым достижением молекулярной ремиссии 12 из 14 пациентов продолжают находиться в ППР, у 2 развился костномозговой рецидив. В первом случае рецидив зафиксирован у пациента с наличием ХТр *MLL-AF4* в ТН8 после блока HR 2 (V), а во втором — у пациента с *MLL-EPS15* на поддерживающей терапии. Во 2-й группе, состоящей из 4 пациентов, все из которых имели ХТр *MLL-AF4*, выявлено 3 костномозговых рецидива, что статистически достоверно выше, чем в 1-й группе. Отношение шансов составило 18,0 (95% ДИ: 1,19–271,47; $p=0,044$). Только 1 пациент из группы с медленным достижением молекулярной ремиссии продолжает находиться в ППР в течение 47 мес. В отличие от других пациентов этой группы у него при мониторинге МОБ методом количественной ПЦР-РВ было выявлено постоянное снижение уровня ХТр (рис. 3). Шестилетняя БСВ в группе с быстрым достижением молекулярной ремиссии составила $0,84 \pm 0,10$, в группе с отсутствием быстрого достижения молекулярной ремиссии — $0,25 \pm 0,21$ ($p=0,023$) (рис. 4). Кумулятивная вероятность развития рецидива в 1-й группе — $0,15 \pm 0,01$,

Быстрое достижение молекулярной ремиссии

Девочка, 2 мес, *MLL-AF4+*, пациентка жива, в ППР 73 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 7 мес, *MLL-MLLT1+*, пациентка жива, в ППР 53 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 10 мес, *MLL-AF4+*, пациентка жива, в ППР 49 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 8 мес, *MLL-MLLT10+*, пациентка жива, в ППР 42 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Мальчик, 8 мес, *MLL-AF4+*, пациент жив, в ППР 41 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 7 мес, *MLL-AF4+*, пациентка жива, в ППР 35 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Мальчик, 4 мес, *MLL-AF4+*, пациент жив, в ППР 32 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Мальчик, 6 мес, *MLL-MLLT10+*, пациент жив, в ППР 31 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Мальчик, 8 мес, *MLL-AF4+*, пациент жив, в ППР 30 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 9 мес, *MLL-MLLT10+*, пациентка жива, в ППР 27 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Мальчик, 9 мес, *MLL-MLLT10+*, пациент жив, в ППР 14 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 9 мес, *MLL-MLLT1+*, пациентка жива, в ППР 12 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 2 мес, *MLL-AF4+*; КМ рецидив в ТН8 — после блока HR 2(V), ТГСК, смерть в стадии ремиссии

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	КМ рецидив	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------------	--

Мальчик, 1 день, *MLL-EPS15+*; КМ рецидив на фоне поддерживающей терапии, смерть от рецидива

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	КМ рецидив		
-----	-----	-----	-----	-----	-----	------------	--	--

Отсутствие быстрого достижения молекулярной ремиссии

Мальчик, 6 мес, *MLL-AF4+*, пациент жив, в ППР 47 мес

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Девочка, 2 мес, *MLL-AF4+*; КМ рецидив на протоколе II, смерть от рецидива

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9	КМ рецидив
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------------

Девочка, 20 дней, *MLL-AF4+*; КМ рецидив на фоне поддерживающей терапии, смерть от рецидива

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	ТН8	ТН9	КМ рецидив
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------------

Девочка, 6 мес, *MLL-AF4+*; КМ рецидив в ТН8 — после блока HR 2(V), смерть от рецидива

ТН1	ТН2	ТН3	ТН4	ТН5	ТН6	ТН7	КМ рецидив	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------------	--

Рис. 2. Выявление химерного транскрипта (ХТр) методом ОТ-ПЦР у пациентов, включенных в исследование. Черным выделены точки наблюдения (ТН), в которых ХТр был обнаружен, белым - ТН, когда ХТр не определялся. ТГСК — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; КМ — костный мозг

Таблица 2. Характеристика пациентов в зависимости от времени достижения молекулярной ремиссии

Показатель	Быстрое достижение молекулярной ремиссии	Отсутствие быстрого достижения молекулярной ремиссии	<i>p</i>
Число пациентов	14	4	
Пол			
мужской	6	1	0,485
женский	8	3	
Возраст, мес			
0–6	3	1	0,083
6–12	11	3	
Инициальный лейкоцитоз, $\times 10^9/\text{л}$			
<100	8	2	0,618
≥ 100	6	2	
Инициальное поражение ЦНС			
есть	2	1	0,554
нет	12	3	
Иммунофенотип			
CD10(-)сути(-)	10	2	0,407
CD10(-/+)сути(-)	—	2	
CD10(-)сути(+)	3	—	
острый недифференцированный лейкоз	1	—	
Перестройки гена <i>MLL</i>			
<i>MLL-AF4</i>	7	4	0,090
<i>MLL-MLLT1</i>	1	—	
<i>MLL-MLLT3</i>	1	—	
<i>MLL-MLLT10</i>	3	—	
<i>MLL-EPS15</i>	2	—	
Ответ на дексаметазон на 8-й день			
хороший	12	2	0,197
плохой	2	2	
Статус костного мозга на 15-й день			
M1	12	2	0,197
M2	2	2	
M3	—	—	
Клинико-гематологическая ремиссия на 36-й день			
есть	14	4	0,999
нет	—	—	
Число рецидивов	2	3	0,044
Число пациентов в ППР	12	1	

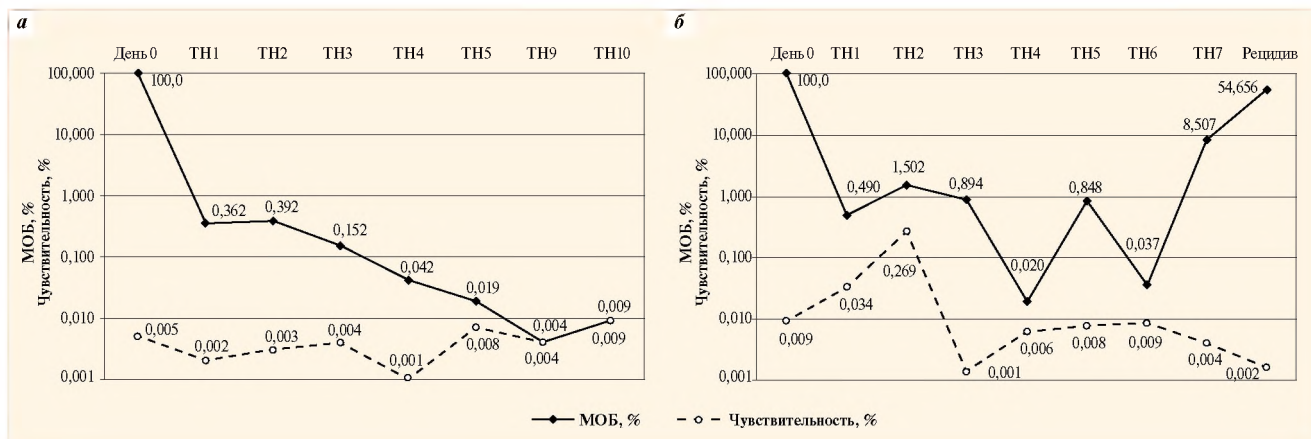


Рис. 3. Количественный мониторинг МОБ у пациентов из группы с отсутствием быстрого достижения молекулярной ремиссии: а - пример постоянного снижения уровня ХТр с достижением молекулярной ремиссии в ТН9. Начиная с этой ТН кривые чувствительности и МОБ сходятся, так как величина чувствительности является нижним пределом детекции, ниже которой ХТр не может быть обнаружен; б - пример, когда молекулярная ремиссия не достигнута

во 2-й — $0,75 \pm 0,08$ ($p=0,022$) (рис. 5). Медиана наблюдения составила 32 мес (диапазон 14–73 мес).

Обсуждение полученных результатов

Ответ на терапию ОЛЛ уже в течение длительного времени используется как один из важнейших факторов прогноза и стратификации пациентов по группам риска. Исходя из времени оценки, ответ на терапию можно подразделить на ранний, который оценивается в ходе индукционной терапии, и поздний, оцениваемый на этапах консолидации/интенсификации.

В историческом плане первым стало выявление с прогностической целью уровня лейкоцитов в периферической крови на 8-й день инициальной терапии преднизолоном. Величина БСВ у пациентов, лечившихся по протоколу ALL-BFM 83 и имевших более 1000 бластных клеток в 1 мл периферической крови (так называемый «плохой ответ» на терапию преднизолоном), составила 47%, что было достоверно ниже, чем у детей, имевших хороший ответ на преднизолон — 76% [16]. Начиная с этого времени данный критерий стал широко распространяться во всех

последующих протоколах, использующих в качестве базисного стероидного препарата преднизолон [1, 5]. Еще одним прогностическим фактором при терапии по протоколам группы BFM служит уровень МОБ, определяемый методом количественной ПЦР-РВ в геномной ДНК на момент окончания индукционной терапии (33-й день) и консолидации (78-й день). В этом случае производится определение специфических для каждого пациента перестроек генов тяжелых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. Пациентов, у которых МОБ не определяется в обеих ТН, стратифицируют в группу стандартного риска, пациентов, имеющих уровень МОБ на 78-й день терапии $\geq 10^{-3}$ — в группу высокого риска, всех остальных — в группу промежуточного риска. В группе стандартного риска 10-летняя БСВ составляет

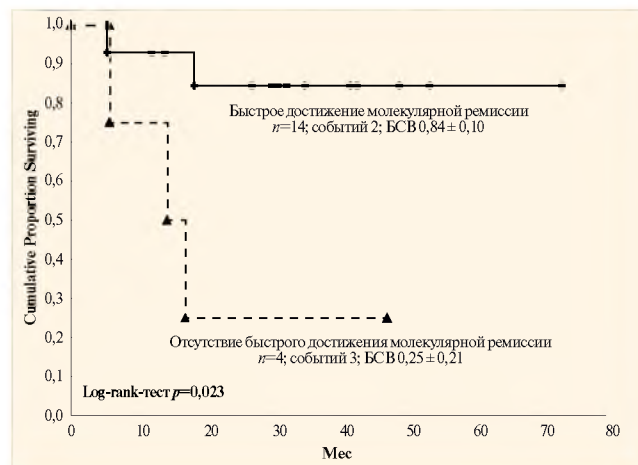


Рис. 4. Кривые БСВ в группе с быстрым достижением молекулярной ремиссии и группе без такового

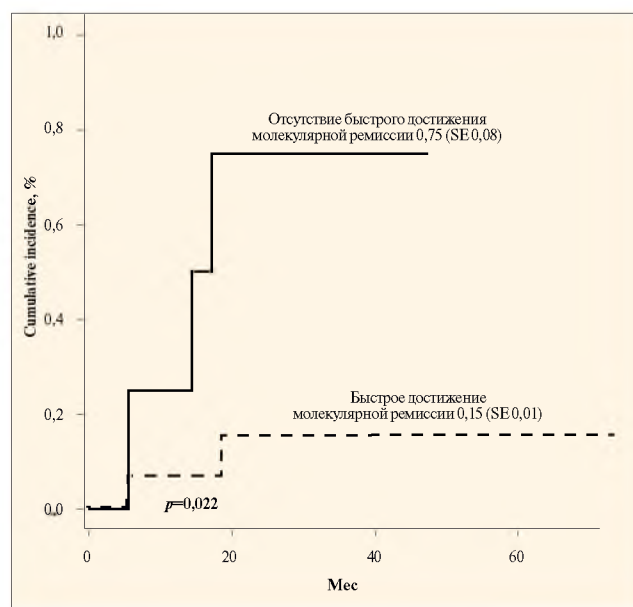


Рис. 5. Кумулятивная вероятность развития рецидива в зависимости от скорости достижения молекулярной ремиссии. SE — стандартная ошибка

93%, в группе промежуточного риска — 74%, в группе высокого риска — 16% [17]. Несколько позднее была показана прогностическая ценность оценки уровня МОБ в костном мозге на 15-й день индукционной терапии, определяемого методом проточной цитометрии. У пациентов, получавших терапию по протоколу AIEOP-BFM-ALL 2000 и имевших более 10% бластных клеток на 15-й день индукционной терапии, вероятность развития рецидива достигала 47% по сравнению с 7,5% у имевших менее 0,1% бластных клеток и 17,5% — в промежуточной группе. При использовании многофакторного анализа было показано, что данный показатель является независимым фактором риска [18]. Схожие результаты были получены в американских исследовательских группах, где показатели ответа на 19-й [19] или 29-й дни индукционной терапии [20] позволяли разделить пациентов на группы риска по вероятности развития рецидивов ОЛЛ.

Поздний ответ на терапию, оцениваемый как методом ПЦР, так и методом проточной цитометрии, показал, что сохранение МОБ в этих ТН связано с высокой вероятностью развития рецидива независимо от уровня МОБ [20–22].

В то же время наличие ХТр, выявленное методом ОТ-ПЦР, или величина МОБ, определяемая в ходе ПЦР-РВ, используется в качестве фактора ответа на терапию гораздо реже. Одна из причин этого заключается в том, что химерные гены встречаются в среднем только у 40% пациентов с ОЛЛ [23]. Однако в случаях выявления ХТр они служат высокочувствительными (10^{-4} – 10^{-6}) и стабильными маркерами [24]. Поэтому данный вариант мониторинга МОБ нашел свое применение в группах, выделенных именно по наличию конкретного химерного гена. Так, в зависимости от скорости снижения нормализованного уровня ХТр *BCR-ABL* взрослые пациенты с ОЛЛ с наличием транслокации t(9;22) (q34;q11) были разделены на 2 группы. В 1-ю группу

были отнесены пациенты, у которых происходило снижение нормализованного уровня *BCR-ABL* более чем в 100 раз от исходного в момент окончания индукционной терапии и более чем в 1000 раз после курса консолидации. Двухлетняя безрецидивная выживаемость в этой группе составила 38% по сравнению с 0% у остальных пациентов [25].

Еще один часто упоминаемый недостаток использования ХТр для мониторинга МОБ — это отсутствие прямой связи между экспрессией гена, т. е. уровнем ХТр, и количеством бластных клеток в костном мозге [23], что осложняет использование выявления ХТр для количественной оценки ответа на терапию. Однако проведенное сравнение результатов оценки МОБ методами проточной цитометрии и гнездовой ОТ-ПЦР показало хорошую качественную сходимость результатов, составившую 94% [26].

Заключение

Время достижения молекулярной ремиссии служит важным показателем ответа на терапию. Отсутствие быстрого достижения молекулярной ремиссии связано с более высокой вероятностью развития рецидива ОЛЛ.

Авторы выражают глубокую благодарность всем врачам, проводившим лечение детей первого года жизни по протоколу MLL-Baby, в частности сотрудникам Областной детской клинической больницы №1 (Екатеринбург), Российской детской клинической больницы (Москва), Морозовской детской городской клинической больницы №1 (Москва), Республиканского научно-практического центра детской онкологии и гематологии (Минск), Областной детской клинической больницы (Нижний Новгород), Детской городской больницы №1 (Санкт-Петербург), Областной детской клинической больницы (Ростов-на-Дону), Областной детской клинической больницы (Ярославль), Московского областного онкологического диспансера (Балашиха).

Л и т е р а т у р а

1. Moericke A., Reiter A., Zimmermann M. et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: Treatment results of 2,169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008;111(9):4477–89.
2. Moghrabi A., Levy D.E., Asselin B. et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109(3):896–904.
3. Pui C.H., Campana D., Pei D. et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360(26):2730–41.
4. Silverman L., McLean T., Gelber R. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 1997;80:2285–95.
5. 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): 240–50.
6. Фечина Л.Г. Новые подходы в лечении острых лейкозов у детей раннего возраста как альтернативы интенсивной программной химиотерапии в сочетании с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. *Вестн Уральск мед науки* 2006;(2):38–42.
7. Fechina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2008;110(11):832A, Abstr 2828.

8. ISCN. Guidelines for cancer cytogenetics. In: Mitelman F, eds. Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, 1991; p. 1–53.
9. Borkhardt A., Repp R., Haupt E. et al. Molecular analysis of MLL/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1994;8(4): 549–53.
10. Pallisaard N., Hokland P., Riishoj D. et al. Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia. *Blood* 1998;92(2):574–88.
11. Dongen van J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13(12):1901–18.
12. Gabert J., Beillard E., Velden van der V. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(12):2318–57.
13. Beillard E., Pallisaard N., Velden van der V. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(1):1–13.
14. Jurcic J., Nimer S., Scheinberg D. et al. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR- α isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001;98(9):2651–56.
15. Kaplan E.L., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Statistic Assoc* 1958;53:457–481.
16. 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.
17. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G. et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22(4):771–82.
18. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M. 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.
19. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52–8.
20. Borowitz M., Devidas M., Hunger S. 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):5477–85.
21. Dworzak M., Froeschl 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):1952–58.
22. Dongen van J., Seriu T., Panzer-Gruemayer R. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731–8.
23. Velden van der V., Hochhaus A., Cazzaniga G. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17(6):1013–34.
24. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2003;21(4):622–6.
25. Pane F., Cimino G., Izzo D. et al. Significant reduction of the hybrid *BCR/ABL* transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005;19(4):628–35.
26. Popov A., Tsaur G., Ivanova A. et al. Qualitative and quantitative concordance in MRD data, assessed by flow cytometry and RT-PCR of fusion gene transcripts in infants with MLL-rearranged ALL. *Hematologica* 2009; 93(Suppl. 2):31–2.