



**Лаборатория  
клеточной терапии  
онко-гематологических  
заболеваний  
ГБУЗСО ИМКТ**

Заведующая  
врач высшей категории, к.м.н. Фечина Л.Г.

**Прогностическое значение достижения  
молекулярной ремиссии у детей первого года жизни  
с острым лимфобластным лейкозом  
и перестройками гена *MLL* при терапии  
по протоколу *MLL-Baby***

Цаур Г.А.<sup>1,2</sup>, Попов А.М.<sup>1,2,3</sup>, Наседкина Т.В.<sup>4</sup>, Ригер Т.О.<sup>1,2</sup>,  
Стренева О.В.<sup>1,2</sup>, Шориков Е.В.<sup>1,2</sup>, Савельев Л.И.<sup>1,2,4</sup>, Фечина Л.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Екатеринбург

<sup>2</sup> ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Екатеринбург

<sup>4</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва

**Введение.** За последние 30 лет достигнуты значительные успехи в лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. Бессобытийная выживаемость пациентов возросла до 79–86% [1, 2, 3]. В то же время эффективность терапии некоторых вариантов ОЛЛ заметно ниже. К этой категории можно отнести ОЛЛ у детей первого года жизни. 5-летняя бессобытийная выживаемость в данной группе пациентов не превышает 47–54% [4, 5]. На сегодняшний день установлено, что ОЛЛ у детей первого года жизни является заболеванием, обладающим рядом биологических особенностей, в частности, высоким инициальным лейкоцитозом, большой экстрамедуллярной массой опухоли, преобладанием рго-В иммунофенотипа (BI-ALL) с коэкспрессией миелоидных и нейральных маркеров (CD15, CD65, NG2), частым наличием перестроек гена *MLL*.

В настоящее время для лечения детей первого года жизни с ОЛЛ в Российской Федерации и Республике Беларусь применяется отечественный протокол *MLL-Baby* [6, 7], в основе которого лежит использование, совместно с программной химиотерапией, полностью транс-ретиноевой кислоты (АТРА) в качестве дифференцировочного агента. Важной особенностью протокола является отслеживание эффективности терапии путем



В исследуемой группе было 7 мальчиков (39%) и 11 девочек (61%), медиана возраста составила 7 мес. (диапазон 1 день–11 мес.). Лейкоцитоз более  $100 \times 10^9 / \text{л}$  в момент постановки диагноза имели 8 пациентов (44%). Инициальное поражение ЦНС было выявлено у 3 человек (17%). У исследованной группы пациентов выявлены следующие перестройки гена *MLL*: *MLL-AF4* (n=11), *MLL-MLLT10* (n=3), *MLL-EPS15* (n=2), *MLL-MLLT1* и *MLL-MLLT3* (по 1). Инициальное выявление перестроек 11q23/*MLL* проводили при помощи стандартного цитогенетического исследования, а также методами гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Для цитогенетического исследования клеток костного мозга применяли технику приготовления «прямых препаратов» или краткосрочное культивирование клеток (24, 48 ч). Дифференциальную окраску хромосом на G-полосы проводили красителем Гимза после предварительной обработки препаратов трипсином. В большинстве случаев анализировали не менее 20 метафазных пластинок. Анализ хромосом выполняли в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека, принятой на момент выполнения стандартного цитогенетического исследования [8]. У 6 пациентов проведено дополнительное исследование методом флуоресцентной гибридизации *in-situ* (FISH) с локус-специфичным зондом *LSI MLL Dual Color Rearrangement Probe 11q23* (Abbott Molecular, США) согласно инструкции производителя.

У 10 пациентов выявление перестроек гена *MLL* и последующий мониторинг уровня ХТр проводили методом гнездовой ОТ-ПЦР по ранее описанным протоколам [9, 10, 11]. У 8 пациентов перестройки гена *MLL* выявлялись и мониторировались при помощи наборов «ЛК-Биочип» («Биочип-ИМБ», Москва) согласно инструкции производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили согласно рекомендациям международного протокола «Европа против рака» [12, 13]. Оценка наличия ХТр проводилась в следующих ТН: ТН1-ТН2 — 15-й и 36-й дни индукционной терапии; ТН3-ТН9 — после каждого курса полностью-транс ретиноевой кислоты. Пациенты с наличием химерного гена *MLL-AF4* получали терапию по ветви высокого риска, все остальные, достигшие к 36-му дню ремиссии — по ветви промежуточного риска. Достижение молекулярной ремиссии расценивалось как отсутствие химерного транскрипта в ходе гнездовой ПЦР, подтвержденное негативным результатом в следующей ТН [14].

Результаты терапии оценивались по количеству рецидивов и числу больных, находящихся в полной продолжительной ремиссии (ППР), а также по кривым бессобытийной выживаемости (БСВ), построенным по методу Каплана-Майера. Для сравнения кривых выживаемости использовался непараметрический *log-rank* критерий. При сравнении групп пациентов по качественным признакам использовался точный критерий Фишера. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Анализ результатов проводился с использованием программ для статистической обработки данных STATISTICA for Windows 6.0 и R-statistic. Отношение шансов рассчитано с использованием пакета программ SPSS 16.0.

Таблица 1  
Характеристика пациентов в зависимости  
от времени достижения молекулярной ремиссии

	Быстрое достижение молекулярной ремиссии	Медленное достижение молекулярной ремиссии	P
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
$\geq 100$	6	2	
Инициальное поражение ЦНС			
Есть	2	1	0,554
Нет	12	3	
Иммунофенотип			
CD10(-)су $\mu$ (-)	10	2	0,407
CD10(+/-)су $\mu$ (-)	—	2	
CD10(-)су $\mu$ (+)	3	—	
Острый недифференцированный лейкоз	1	—	
Перестройки гена <i>MLL</i>			
<i>MLL-AF4</i>	7	4	0,108
<i>MLL-MLL1</i>	1	—	
<i>MLL-MLL3</i>	1	—	
<i>MLL-MLL10</i>	3	—	
<i>MLL-EPS15</i>	2	—	
Ответ на дексаметазон на день 8			
Хороший	12	2	0,197
Плохой	2	2	
Статус костного мозга на день 15			
M1	12	2	0,197
M2	2	2	
M3	—	—	
Клинико-гематологическая ремиссия на день 36			
Есть	14	4	0,999
Нет	—	—	
Количество рецидивов	2	3	0,044
Количество пациентов в ППР	12	1	

**Результаты.** В ТН1 у всех 18 пациентов был выявлено наличие ХТр. Среди исследованной группы не было пациентов, не ответивших на терапию к 36 дню (ТН2), но только у 3-х из их числа зафиксирована молекулярная ремиссия в этой ТН. Это были 2 пациента с наличием *MLL-MLLT10* и один пациент с *MLL-AF4*. В ТН3 — после первого курса полностью-транс ретиновой кислоты — ХТр не был выявлен еще у 4 человек: двух пациентов, имевших *MLL-AF4*, и у двух пациентов с наличием химерных генов *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT10*, соответственно. В ТН4 еще у 7 пациентов достигли молекулярной ремиссии. Четверо из них имели ХТр *MLL-AF4*, двое — *MLL-EPS15*, один пациент — *MLL-MLLT3*. У двух пациентов с наличием *MLL-AF4* молекулярная ремиссия зафиксирована в ТН 9 (после 6 HR-блока) В то же время у 3-х пациентов молекулярной ремиссии достичь не удалось.

Ретроспективно пациенты были разделены на 2 группы по времени достижения молекулярной ремиссии. В первую группу — группу с быстрым достижением молекулярной ремиссии — вошло 14 человек, у которых элиминация ХТр произошла до наступления ТН4. Ко второй группе — группе с медленным достижением 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 нейролекемии, иммунофенотип, наличие ХТр *MLL-AF4*. Также не было выявлено достоверных различий между двумя группами по ответу на терапию на 8-й и 15-й дни индукционной терапии, достижению клинико-гематологической ремиссии на 36-й день. (табл. 1). В группе с быстрым достижением молекулярной ремиссии 12 из 14 пациентов продолжают находиться в ППР, у двух развился костно-мозговой рецидив. В первом случае рецидив зафиксирован у пациента с *MLL-AF4* в ТН8 (после блоком HR 2 (V)), а во втором — у пациента с *MLL-EPS15* на поддерживающей терапии. Во второй группе, состоящей из 4-х пациентов, все из которых имели ХТр *MLL-AF4*, выявлено 3 костно-мозговых рецидива, что достоверно выше, чем в первой группе. Отношение шансов составило 18,00 [95% ДИ: 1,19-271,47] ( $p=0,044$ ). Только 1 пациент из группы с медленным достижением молекулярной ремиссии продолжает находиться в ППР. В отличие от других пациентов этой группы, у него при мониторинге МОБ методом количественной ПЦР-РВ было выявлено постоянное снижение уровня ХТр (рис 2). 6-летняя бессобытийная выживаемость в группе с быстрым достижением молекулярной ремиссии составила  $0,84 \pm 0,10$ , в группе с медленным достижением молекулярной ремиссии —  $0,25 \pm 0,21$  ( $p=0,023$ ). Кумулятивная вероятность развития рецидива в первой группе —  $0,15 \pm 0,01$ , во второй —  $0,75 \pm 0,08$  ( $p=0,022$ ). Медиана наблюдения составила 32 месяца (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, кото-

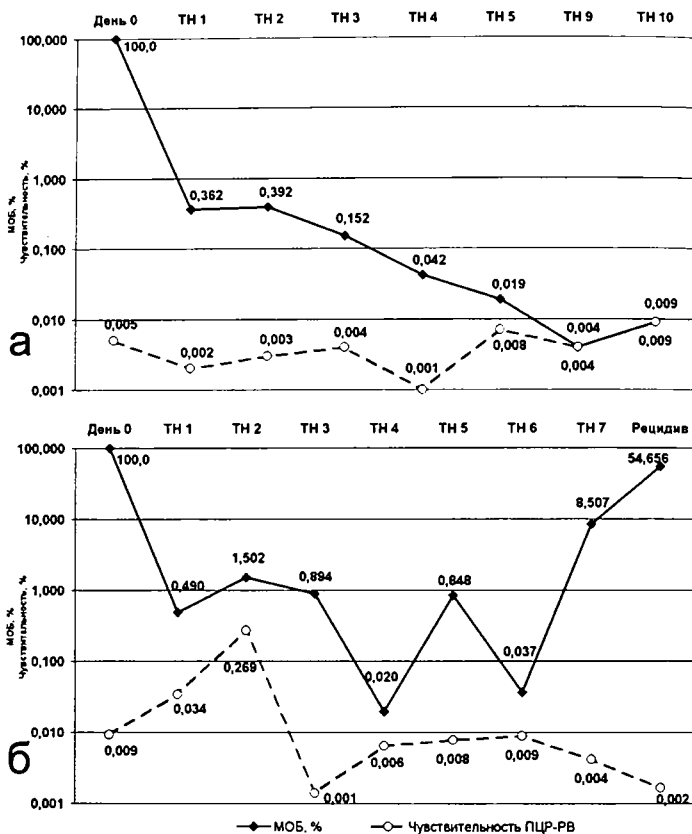


Рисунок 2. Количественный мониторинг МОБ у пациентов из группы с медленным молекулярным ответом. А) Пример постоянного снижения уровня ХТр у пациента. Молекулярная ремиссия достигнута в ТН9. Начиная с этой ТН кривые чувствительности и МОБ сходятся, так как величина чувствительности является нижним пределом детекции, ниже которой ХТр не может быть обнаружен. Б) Пример, когда молекулярная ремиссия не достигнута.

рый оценивается в ходе индукционной терапии, и поздний, оцениваемый на этапах консолидации/интенсификации.

Первым в историческом плане стало выявление прогностической значимости уровня лейкоцитов в периферической крови на 8-й день инициальной терапии преднизолоном. Величина бессобытийной выживаемости у пациентов, лечившихся по протоколу ALL-BFM 83 и имевших более 1000

лейкоцитов 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% [15]. Начиная с этого времени, данный критерий стал широко использоваться во всех последующих протоколах, использующих в качестве базисного стероидного препарата преднизолон [1, 5]. Еще одним прогностическим фактором при терапии по протоколам группы BFM является уровень МОБ, определяемый методом количественной ПЦР-РВ в геномной ДНК на момент окончания индукционной терапии (день 33) и консолидации (день 78). 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, имеющих уровень МОБ на 78-й день терапии более или равный  $10^{-3}$  — в группу высокого риска, всех остальных — в группу промежуточного риска. В группе стандартного риска 10-летняя бессобытийная выживаемость составляет 93%, в группе промежуточного риска — 74%, в группе высокого риска — 16% [16]. Несколько позднее была показана прогностическая ценность оценки уровня МОБ в костном мозге на 15 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% вероятности развития рецидива при наличии менее 0,1% бластных клеток и 17,5% в промежуточной группе. При использовании многофакторного анализа было показано, что данный показатель является независимым фактором риска [17]. Схожие результаты были получены в американских исследовательских группах, где показатели ответа на 19-й [18] или 29-й дни индукционной терапии [19] позволяли разделить пациентов на группы риска по вероятности развития рецидивов ОЛЛ.

Поздний ответ на терапию, оцениваемый во время консолидации как методом ПЦР, так и проточной цитометрией, показал, что сохранение МОБ в этих ТН связано с высокой вероятностью развития рецидива вне зависимости от уровня МОБ [19, 20, 21].

В то же время наличие ХТр, выявленное методом ОТ-ПЦР, используется в качестве фактора ответа на терапию гораздо реже. Одной из причин этого является то, что химерные гены выявляются только у части пациентов с ОЛЛ [22]. Еще одним часто упоминаемым недостатком использования ХТр для мониторинга МОБ является отсутствие прямой связи между экспрессией гена, то есть уровнем ХТр и количеством бластных клеток в костном мозге [22], 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% [23].

**Заключение.** Время достижения молекулярной ремиссии является

важным прогностическим фактором ответа на терапию по протоколу MLL-Vabu. Медленное достижение молекулярной ремиссии связано с более высокой вероятностью развития рецидива ОЛЛ.

#### ЛИТЕРАТУРА

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. – Vol. 111, N 9. – P. 4477–4489.
2. Moghrabi A., Levy DE., Asselin B. et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, N 3. – P.896–904.
3. Pui CH., Campana D., Pei D., et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – Vol 360, N 26. – P.2730–2741.
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. – Vol. 80. – P. 2285–2295.
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. – Vol. 370, № 9583. – P. 240–250
6. Фечина Л.Г. Новые подходы в лечении острых лейкоемий у детей раннего возраста как альтернативы интенсивной программной химиотерапии в сочетании с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток // *Вестник Уральской медицинской науки*. – 2006. – №2. – С. 38–42.
7. Fechina L., Shorikov E., Tsaun 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*. – 2007. – Vol. 110, N 11. – P. 832A. – Abstract 2828.
8. ISCN 2009: An International System For Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Editors: Schaffer L., Slovak M., Campbell L. Basel: Karger; 2009.
9. Borkhardt A., Repp R., Haupt E. et al. Molecular analysis of MLL/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 1994. – Vol. 8, N 4. – P. 549–553.
10. Pallisgaard 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. – Vol. 92, N 2. – P.574–588.
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. – Vol. 13, N 12. – P. 1901–1918.
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. – Vol. 17, N 12. – P. 2318–2357.

13. Beillard E., Pallisgaard 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. – Vol. 17, N 1. – P. 1–13.

14. Jurcic J., Nimer S., Scheinberg D. et al. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR- $\alpha$  isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia // *Blood*. – 2001. – Vol. 98, N 9. – P. 2651–2656.

15. 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. Vol 199, N 3. – P. 151–160.

16. 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. Vol. 22, N 4. – P. 771–782.

17. 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. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27, N 31. – P. 5168–5174.

18. 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. — Vol. 100, N 1.— P. 52–58.

19. 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. – Vol. 111, N 12. – P. 5477–5485.

20. 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. – Vol. 99, N 6. – P. 1952–1958.

21. van Dongen J, Seriu T, Renate Panzer-Gruemayer R. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood // *Lancet*. – 1998. – Vol. 352. – P. 1731–1738

22. van der Velden 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. - Vol. 17, N 6. - P. 1013–1034.

23. Popov A., Tsauro 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. – Vol. 93, Suppl. 2 – P. 31–32.