

Cytogenetic remission as an important criterion for treatment efficacy in pediatric acute myeloid leukemiaE.V. Fleishman¹, O.I. Sokova¹, A.V. Popa²,
V.S. Nemirovchenko², L.N. Konstantinova¹,
and N.F. Metelkova¹**ABSTRACT**

The results of repeated karyotype analyses in the disease course in 43 children with de novo acute myeloid leukemia (AML) are presented. Patients with clonal bone marrow chromosome abnormalities at diagnosis were included. The follow-up period lasted from 4 to 79 months (median 23 months). The patient cohort was divided into two groups: the standard-risk group and high-risk group. The first group included 13 children with t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), and t(16;16)(p13;q22). The rest of the patients (30 cases) formed the second group. After assessment of results of bone marrow chromosome analysis at 1–3 months of the treatment, the conclusion was drawn that persistence even single cytogenetically abnormal cell at the start of morphological remission is an unfavorable prognostic sign. It is illustrated by comparison of relapse-free survival (RFS) in two groups of patients: with cytogenetic remission at the onset of morphologic remission (group 1) or with no remission (group 2). RFS was 64.1 ± 10.3% in the first group. In the second group, one patient is at 20th month of the first CCR and four remaining patients relapsed at 3–20th months ($p = 0.018$). Another conclusion can be made from our data. Persistence in bone marrow cytogenetically abnormal cells at the beginning of morphological remission can be observed in patients with favorable chromosome markers and patients from other prognostic groups. This finding was prognostically unfavorable regardless of risk-group. Thus, persistence of cytogenetically abnormal cells in bone marrow at the time of morphological remission achieved is a more sensitive criterion for poor outcome than the baseline karyotype (risk groups). The facts obtained show an importance of cytogenetic analysis performance not only at diagnosis but also at the onset of morphologic remission.

Keywords: pediatric acute myeloid leukemia, chromosome markers, cytogenetic remission.

¹ Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS 115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation

² Pediatric Oncology and Hematology Institute, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS

115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation

E.V. Fleishman, Leading scientific worker, MD, PhD, DSci
flesok@yandex.ru

O.I. Sokova, Chief scientific worker, PhD
flesor@yandex.ru

A.V. Popa, Head of the department, MD, PhD, DSci
apopa@list.ru

V.S. Nemirovchenko, Postgraduate student
apopa@list.ru

L.N. Konstantinova, Scientific worker
flesor@yandex.ru

N.F. Metelkova, Junior scientific worker
flesor@yandex.ru

Correspondence should be sent to E.V. Fleishman

115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation
Tel.: +7(499)3234722

Корреспондентский адрес:

Е.В. Флейшман
115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация
Тел.: +7(499)3234722

Принято в печать: 2 апреля 2013 г.

Цитогенетическая ремиссия — важный показатель эффективности лечения острых миелоидных лейкозов у детейЕ.В. Флейшман¹, О.И. Сокова¹, А.В. Попа², В.С. Немировченко²,
Л.Н. Константинова¹, Н.Ф. Метелькова¹**РЕФЕРАТ**

Представлены результаты повторных анализов кариотипа, проведенных у 43 детей на разных этапах течения первичного острого миелоидного лейкоза. В исследование были включены пациенты, в костном мозге которых до лечения обнаружены клональные изменения кариотипа. Срок наблюдения составил 4–79 мес. (медиана 23 мес.).

Пациенты были разделены на две группы: стандартного и высокого риска. В 1-ю группу вошло 13 детей: с транслокацией t(8;21)(q22;q22), инверсией хромосомы 16 и транслокацией t(16;16)(p13;q22). Все остальные пациенты (30 человек) составили 2-ю группу.

При оценке результатов хромосомного анализа клеток костного мозга, выполненного в период 1–3 мес. от начала терапии, установлено, что сохранение даже единичных клеток с хромосомными маркерами на фоне морфологической ремиссии служит неблагоприятным фактором прогноза, поскольку свидетельствует о низкой эффективности проведенного лечения. Это иллюстрируется сопоставлением данных о безрецидивной выживаемости пациентов, у которых в начале морфологической ремиссии констатирована и цитогенетическая ремиссия (1-я группа), и пациентов, у которых цитогенетической ремиссии в это время не было (2-я группа). Безрецидивная 5-летняя выживаемость составила в 1-й группе 64,1 ± 10,3%. В то же время из 5 детей 2-й группы один ребенок находится под наблюдением в полной ремиссии (20 мес.), у остальных пациентов в период 3–20 мес. развились фатальные рецидивы ($p = 0,018$).

Наши результаты позволяют сделать еще одно важное заключение. Обнаружение в костном мозге клеток с аномалиями кариотипа при достижении полной морфологической ремиссии может иметь место как у пациентов с маркерами благоприятного прогноза, так и у больных, отнесенных к другой прогностической группе. Во всех случаях это имеет неблагоприятное прогностическое значение независимо от группы риска. Таким образом, сохранение в костном мозге клеток с хромосомными маркерами при достижении морфологической ремиссии служит более чувствительным критерием неблагоприятного прогноза, чем характер хромосомных аномалий, обнаруженных до начала лечения (группы риска). Полученные факты свидетельствуют о важности проведения цитогенетического анализа не только перед началом лечения, но и в начале морфологической ремиссии.

Ключевые слова:

острый миелоидный лейкоз у детей, хромосомные маркеры, цитогенетическая ремиссия.

¹ НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН
115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация

² НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН
115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация

ВВЕДЕНИЕ

Результаты лечения острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) значительно улучшились за последние годы, однако их все еще нельзя считать удовлетворительными: гематологические ремиссии удается получить не во всех случаях, а лишь у 80–90 % пациентов; 5-летняя выживаемость не превышает 50 % у взрослых и 70 % в педиатрической клинике. Такие показатели приводят лишь самые успешные авторы, в большинстве публикаций результаты хуже.

Главной причиной летальности служат рецидивы, возникающие на разных сроках ремиссии — от нескольких месяцев до 10 лет и более.

Разработка надежных методов прогнозирования рецидивов и их успешного лечения входит в число важнейших задач онкогематологии. Рецидивы развиваются из лейкозных клеток, которые, оказавшись резистентными к терапии, остаются в организме больного, несмотря на достижение морфологической ремиссии. Эти клетки являются субстратом так называемой минимальной остаточной болезни (МОБ). Определение их количества очень важно для установления степени риска рецидива [1–6].

В клинической практике заключение о достижении ремиссии, а также о развитии рецидива традиционно делается на основании морфологического анализа, который не позволяет обнаружить МОБ и тем самым оценить глубину ремиссии и риск рецидива. Эти задачи решаются с помощью современных молекулярно-биологических и иммунофенотипических методов, чувствительность которых в тысячи раз выше.

Хромосомный анализ, столь важный для диагностики ОМЛ и прогнозирования ответа на лечение, в настоящее время практически не применяется для выявления лейкозных клеток во время морфологической ремиссии из-за его трудоемкости и низкой чувствительности по сравнению с молекулярными и иммунологическими подходами. Однако разрешающая способность и специфичность кариологического анализа гораздо выше, чем у морфологического исследования, и это стимулировало попытки использовать хромосомные маркеры для мониторинга лейкозного клона и оценки эффективности лечения. Пока опубликованы лишь единичные работы, выполненные на первых этапах лечения взрослых больных ОМЛ и посвященные обнаружению клеток с хромосомными маркерами в популяции элементов костного мозга. На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что при достижении морфологической ремиссии сохранение в костном мозге даже единичных клеток с аномалиями кариотипа служит неблагоприятным прогностическим признаком [7–10].

В настоящей статье приведены результаты нашей работы, посвященной изучению информативности повторных хромосомных анализов, выполненных на разных этапах заболевания (цитогенетический мониторинг), для оценки эффективности лечения детей с первичным ОМЛ. Ранее такие исследования в педиатрической клинике не проводились.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для мониторинга были отобраны только те пациенты, у которых до начала лечения обнаружены клоны клеток с

хромосомными маркерами. Больные с острым промиелоцитарным лейкозом (М3-вариант) не были включены в исследуемую группу в связи с тем, что для этой формы ОМЛ разработана специфическая терапия, отличающаяся от программ, применяемых при других морфоцитохимических вариантах острых миелоидных лейкозов.

Повторные цитогенетические исследования костного мозга и/или периферической крови проведены у 43 пациентов с ОМЛ *de novo* в возрасте от 3 мес. до 16 лет (табл. 1).

Из данных табл. 1 видно, что группа больных состояла из 28 мальчиков и 15 девочек с разными вариантами ОМЛ по FAB-классификации: М0 — 1 больной, М1 — 2, М2 — 15, М4 — 10, М5 и М5а — 10, М6 — 1 и М7 — 4. Представленные в табл. 1 результаты цитогенетического мониторинга и клинического наблюдения будут обсуждаться в последующих разделах статьи.

Пациенты проходили лечение в детских онкологических и гематологических отделениях ФГБУ «РОИЦ им Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва, Московского областного онкологического диспансера (МООД), г. Балашиха, и Морозовской детской городской клинической больницы, г. Москва. До 2007 г. больные получали терапию, состоявшую из интенсивных курсов индукции ремиссии со стандартными дозами цитарабина (200 мг/м²/сут 8 дней), даунорубицина 60 мг/м²/сут и этопозида 150 мг/м²/сут 3 дня (VP-16). Постиндукционная терапия включала цитарабин в высоких дозах (2000–6000 мг/м²/сут 3 дня), VP-16 (суммарная доза в каждом курсе — 500 мг/м²) или митоксантрон 12 мг/м²/сут в течение 3 дней с целью консолидации ремиссии. Начиная с 2007 г. используется протокол с включением вальпроевой и полностью транс-ретиноевой кислот. У большинства больных в дальнейшем проводится аутологичная или аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Хромосомные препараты, приготовленные после краткосрочного культивирования клеток и окрашенные на G-полосы, анализировали с помощью светового микроскопа и компьютера. Кариотипирование проводили в соответствии с международной номенклатурой [11, 12]. При стандартном цитогенетическом исследовании обычно анализируют не более 20 метафазных пластинок, что достаточно для выявления аномалий кариотипа, важных для уточнения диагноза и включения больного в ту или иную прогностическую группу. Для решения задач, поставленных в нашей работе, в ходе лечения мы старались исследовать максимально возможное количество метафаз, чтобы увеличить вероятность обнаружения аномальных клеток.

У каждого пациента цитогенетические анализы выполняли до начала лечения, на разных этапах ремиссии и при рецидивах. Число цитогенетических анализов колебалось от 3 до 17 на каждого больного, срок наблюдения — от 4 до 79 мес. (медиана 23 мес.).

Анализ, проведенный до начала лечения, позволяет обнаружить клон аномальных клеток и определить хромосомные изменения, которые служат поводом для включения больного в одну из групп риска, а также являются маркерами лейкозных клеток данного больного при мониторинге.

Следующий цитогенетический анализ проводили по окончании курса индукции ремиссии в конце 1-го месяца от начала лечения.

Таблица 1. Основные характеристики больных

Пациент			До начала лечения		Результаты цитогенетического анализа в 1–3 мес. от начала лечения*			Рецидив (месяц от начала лечения)	Продолжительность жизни от начала лечения, мес.
№	Шифр	Пол	Возраст, лет	FAB-вариант	Месяц				
					1	2	3		
Морфологическая ремиссия достигнута в 1–3 мес. лечения									
1	Афр	М	2	M5	0	НД	НД	—	22+
2	Блн	Ж	15	M4	НД	НД	0	7	9
3	Всл	М	10	M4	0	НД	0	—	46+
4	Гвр	Ж	3 мес.	M5	0	0	НД	—	79+
5	Гкм	М	2	M7	НД	НД	0	10	13
6	Гзв	М	10	M2	НД	0	0	36	40
7	Дев	Ж	3 мес.	M7	0	0	НД	—	60+
8	Дрв	Ж	5	M0	0	НД	0	—	14+
9	Елф	М	5	M4	НД	0	НД	6	23+
10	Жрк	Ж	12	M6	НД	0	НД	—	12+
11	Зрц	Ж	1	M2	0	0	НД	—	19+
12	Знр	М	3	M2	0	НД	НД	—	53+
13	Клд	М	8	M2	НД	НД	0	8	10
14	Лнт	М	13	M2	0	НД	НД	—	28+
15	Лтк	М	15	M5	0	НД	НД	21	27
16	Мгм	Ж	3	M2	НД	0	НД	13	15
17	Нзм	М	8	M4	НД	0	0	—	22+
18	Плт	М	3	M2	НД	НД	0	—	53+
19	Плк	М	13	M4	0	0	НД	—	39+
20	Птп	Ж	9 мес.	M4	0	НД	НД	—	20+
21	Рдк	М	9	M2	0	0	НД	—	28+
22	Рсх	Ж	2	M5a	НД	0	НД	—	46+
23	Смн	М	12	M4	0	0	НД	—	18+
24	Смр	Ж	5 мес.	M7	0	0	НД	—	32+
25	Счк	Ж	1	M4	НД	НД	0	12	14+
26	Трш	М	10 мес.	M5	0	НД	НД	9	30+
27	Улн	Ж	2	M1	0	НД	0	—	61+
28	Уст	Ж	16	M4	0	НД	0	—	60+
29	Цкн	М	11	M2	0	НД	НД	—	26+
30	Бгм	Ж	8	M5a	0	+	+	10	10
31	Исв	М	5	M2	+	НД	+	3	5
32	Кзн	М	10	M5	НД	+	0	15	28
33	Лбн	М	12	M1	НД	НД	+	21	36
34	Ффн	М	7 мес.	M4	+	+	0	—	20+
35	Анд	М	3 мес.	M2		НД		—	18+
36	Клк	М	7 мес.	M5		НД		6	8
37	Мкн	Ж	7	M2		НД		39	39+
38	Мрт	М	11	M2		НД		—	54+
39	Орз	М	1	M5		НД		—	29+
Морфологическая ремиссия не достигнута									
40	Бдр	М	14	M7	НД	НД	+	—	10
41	Млл	М	1	M5	+	НД	НД	—	4
42	Свв	М	11	M2	+	НД	НД	—	20+**
43	Сдр	М	4	M2	+	НД	НД	—	14

НД — нет данных.

* «0» — аномальные метафазы не обнаружены; «+» — аномальные метафазы обнаружены.

** АллоТГСК на 4-й месяц от начала лечения.

В большинстве современных клинических протоколов контрольная пункция костного мозга проводится на 21-й день после окончания индукции ремиссии. Именно этот срок считается важным для определения эффективности терапии и принятия решения о необходимости ее коррекции. Однако этот этап представляется наиболее трудным для выполнения хромосомного исследования, поскольку цитостатические препараты тормозят пролиферативную активность клеток и хромосомный анализ не

всегда возможен. У некоторых пациентов его удавалось провести лишь во 2-й или 3-й месяц лечения.

На протяжении первого полугодия после достижения морфологической ремиссии повторные хромосомные анализы у большинства больных проводили с интервалом 1–2 мес., далее интервалы удлинялись, поскольку было практически невозможно часто вызывать пациентов, постоянно проживающих в других регионах страны.

Разделение больных на группы риска проводили в соответствии с рекомендациями, опубликованными в недавних работах, посвященных прогностическому значению хромосомных аномалий при ОМЛ у детей [13–15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группы риска и ответ на лечение

Результаты хромосомного анализа, проведенного до начала лечения, и распределение больных по группам риска представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что в группу стандартного риска (относительно благоприятного прогноза) вошло 13 пациентов: 7 — с транслокацией t(8;21)(q22;q22) в сочетании с различными дополнительными аномалиями, 5 — с инверсией хромосомы 16 (трое из них с дополнительными изменениями) и 1 — с транслокацией t(16;16)(p13;q22).

Группа неблагоприятного прогноза состояла из 17 пациентов и была гетерогенной. В нее вошли больные с перестройками длинного плеча хромосомы 3, утратой хромосомы 7, утратой длинного плеча хромосомы 5 (5q-), транслокациями хромосомного района 11q23. Кроме того, в эту группу включены больные с перестройками коротких плеч хромосом 12 и 17, а также со сложным кариотипом — 3 и более хромосомных аномалии в каждой клетке лейкозного клона. Случаи со сложным кариотипом, в состав которого входили t(8;21), а также inv(16) и t(16;16), к группе неблагоприятного прогноза не относили. У 2 больных (№ 16 и 24; см. табл. 2) в лейкозных клетках наблюдались сочетания разных маркеров плохого прогноза.

Группа промежуточного прогноза состояла из 13 больных с разнообразными аномалиями кариотипа, не вошедшими в две названные выше группы. У 5 пациентов (№ 34, 35, 36, 37, 40; см. табл. 2) обнаружены аномалии, которые встречаются крайне редко, поэтому их прогностическое значение пока остается неясным.

Современная классификация хромосомных аномалий при ОМЛ с разделением их на три прогностические группы [13–15], хотя и является общепризнанной, все еще остается несовершенной. Мы, как и многие другие исследователи, сравнивали между собой две группы: стандартного и высокого риска. Во 2-й группе были объединены пациенты с маркерами неблагоприятного и промежуточного прогноза.

При сравнении результатов лечения пациентов, включенных в названные две группы риска, обнаружены некоторые различия в частоте достижения морфологических ремиссий: их удалось получить у всех 13 пациентов в группе стандартного риска и у 26 из 30 больных в группе высокого риска.

Различий в показателях безрецидивной (БРВ) и общей (ОВ) выживаемости не выявлено. Так, 5-летняя БРВ для группы стандартного риска составила $41,0 \pm 16,9\%$, для группы высокого риска — $60,4 \pm 9,6\%$ ($p = 0,94$); ОВ — $65,9 \pm 14,0$ и $66,9 \pm 9,2\%$ соответственно ($p = 0,9$).

Цитогенетический мониторинг и эффективность лечения

Как уже было сказано выше, срок наблюдения за больными составил 4–79 мес. (медиана 23 мес.), причем подавляющее большинство (35 из 43) пациентов находились под наблюдением более 1 года (19 — более 2 лет,

Таблица 2. Кариотип лейкозных клеток и группы риска до начала лечения

Пациент		Кариотип лейкозных клеток
№	Шифр	
Группа стандартного риска		
1	Всл	46,XY, +8, +22, inv(16)(p13;q23)
2	Гзв	46,X(-Y), t(8;12;21), del(10p)
3	Исв	45,X(-Y), t(8;21)(q22;q22)
4	Клд	47,XY, t(8;21)(q22;q22), del(9q)
5	Лбн	46,XY, t(16;16)(p13;q23)
6	Мгм	46,XX, t(1;8;21)(p32;q22;q22)
7	Мрт	46,XY, t(8;21)(q22;q22), del(7)(q22)
8	Мкн	45,X(-X), t(8;21)(q22;q22)
9	Нзм	46,XY, inv(16)(p13;q22)
10	Плт	47,XY, +21, inv(16)(p13;q22)
11	Рдк	46,X(-Y), del(9q), 21q+, AML1/ETO
12	Смн	46,XY, inv(16)(p13;q22)
13	Цкн	47,XY, +6, t(8;21)(q22;q22)
Группы высокого риска		
Группа неблагоприятного прогноза		
14	Афр	48,XY, +21, t(1;16)(p13;q23), +der(8)t(1;8)(q21;p12)
15	Блн	46,XX, t(6;11)(q26;q23)
16	Бдр	45,XY, -7, t(3;3)(q21;q26)
17	Гвр	49,XX, +8, +8, -10, -11, +16, +der(10)t(10;11;12)(p13;q23;q13;q15), +t(10;11)(p13;q13), del(12)(q15)
18	Гкм	48,XY, +8, +19, del(7)(q34), add(12)(p12)
19	Елф	46,der(X),Y, t(X;11)(q26), inv(q13;q23)
20	Знр	46,XY, add(11)(q23)
21	Кзн	46,XY, t(3;12)(q26;p13)
22	Клк	45,XY, -11, t(10;11)(p12;q23), t(11;16)(q11;p13)
23	Орз	47,XY, +iso(8q), t(7;11)(p15;q23)
24	Рсх	48,XX, +16, +19, del(10)(p12)/iden, del(3)(q21) и/или add(17p)
25	Сдр	45,XY, -7
26	Счк	47,XX, +19, t(9;11)(p22;q23)
27	Трш	46-48,XY, -12, -13, t(9;11)(p21;q23), +iso(12q), +1-3r
28	Улн	46,XX, t(5;6)(q31;q15-16)
29	Уст	46,XX, +8, t(11;16)(q13;p13), del(16)(q22)
30	Ффн	46,XY, t(11;17)(q23;q25)
Группа промежуточного прогноза		
31	Анд	46,XY, t(11;19)(q23;p13)
32	Бгм	46,XX, t(9;11)(p22;q23)
33	Дев	46,XY, t(1;22)(p13;q13)
34	Дрв	47,XX, del(6p), +m
35	Жрк	46,XX, del(16)(q21-22)
36	Зрц	47,X, der(X), +8, t(X;?)(p21;?)
37	Лнт	47,XY, +4
38	Лтк	47,XY, +8, t(11;16)(q13;p13)
39	Млл	46,XY, t(9;11)(p22;q23)
40	Плк	46,XY, del(6)(p22)
41	Птп	46,XX, del(6)(q11), t(6;11)(q21;p15)
42	Свв	47,XY, +8
43	Смп	46,XX, t(1;22)(p13;q13)

13 из них — более 3 лет и 3 — более 5 лет). Количество цитогенетических анализов колебалось от 3 до 17 на каждого больного.

В период 1–3 мес. от начала лечения хромосомный анализ проведен у 38 больных (см. табл. 1). Эти больные разделены на две группы:

1-я группа — 29 пациентов, у которых клетки с хромосомными аномалиями после начальной терапии перестали определяться;

2-я группа — 9 пациентов, у которых сохранились клетки с хромосомными аномалиями, обнаруженными до начала лечения.

У всех 29 пациентов 1-й группы получены гематологические ремиссии. У 9 из них в дальнейшем возникли рецидивы в 6–36 мес. (медиана 10 мес.) от начала лечения. В этой группе 4 ребенка умерли через 2–4 мес. от начала рецидива, двое выбыли из-под наблюдения и трое находятся во второй ремиссии (№ 9, 25, 26, см. табл. 1; продолжительность жизни от начала лечения — 14, 23 и 30 мес. соответственно). У остальных 20 пациентов продолжается первая ремиссия (срок наблюдения 10–79 мес., медиана 27 мес.).

Из 9 пациентов с сохранением аномальных клеток в период 1–3 мес. от начала лечения (2-я группа) гематологическая ремиссия после начальной терапии была достигнута лишь у 5 (№ 30–34; см. табл. 1). Количество клеток с хромосомными маркерами у них значительно уменьшилось: до начала лечения доля аномальных клеток составляла 50–100 %, а после индукции этот показатель снизился до 2–30 %. У 4 из них (№ 30–33; см. табл. 1) рецидивы возникли в 3, 10, 15 и 21 мес. соответственно, а у пятого (№ 34; см. табл. 1) ремиссия продолжается 20 мес.

Резистентными к проводимой терапии оказались 4 других пациента (№ 40–43; см. табл. 1): гематологическую ремиссию получить не удалось. В 2 из этих случаев (№ 41 и 42; см. табл. 1) наблюдалось существенное уменьшение количества клеток с хромосомными аномалиями, а у 2 пациентов (№ 40 и 43; см. табл. 1) все исследованные метафазы костного мозга как до лечения, так и после индукции были аномальными. Важно

отметить, что у последних 2 больных кариотип содержал хромосомную аномалию (моносомию 7), неблагоприятное прогностическое значение которой ни у кого не вызывает сомнений. Больные Бдр, Млл и Сдр (№ 40, 41 и 43; см. табл. 1) умерли в результате прогрессирования ОМЛ на 4, 10 или 14-й месяц от начала заболевания. У двух из них (Бдр и Сдр) в ходе заболевания была выявлена эволюция кариотипа. У больного Бдр кроме обнаруженных до лечения аномалий — транслокации $t(3;3)(q21;q25)$ и моносомии 7 — появилась трисомия хромосомы 16. У больного Сдр, у которого до лечения обнаружена моносомия 7, в ходе клональной эволюции появилась еще и трисомия 22.

Пациенту Свв (№ 42; см. табл. 1) на 4-й месяц проведена гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от родственного донора. Полученная полная ремиссия продолжается уже более 20 мес.

Прогностическое значение сохранения в костном мозге в период 1–3 мес. от начала терапии клеток с аномалиями кариотипа вполне очевидно при сравнении кривых выживаемости пациентов 1-й и 2-й групп. 5-летняя БРВ составила $64,1 \pm 10,3\%$ в группе детей, у которых в 1–3 мес. обнаружены только клетки с нормальным кариотипом, в то же время этот показатель был близок к 0 у пациентов, у которых на этом этапе еще сохранялись клетки с хромосомными маркерами. Разница статистически высокозначима — $p = 0,001$ (рис. 1). Сходные результаты получены при сравнении кривых общей выживаемости (рис. 2).

Поскольку известно, что отсутствие полной гематологической ремиссии после проведения первого курса лечения само по себе считается крайне неблагоприятным прогностическим признаком, мы исключили из дальнейшего анализа 4 пациентов (№ 40–43; см. табл. 1), резистентных к начальной терапии.

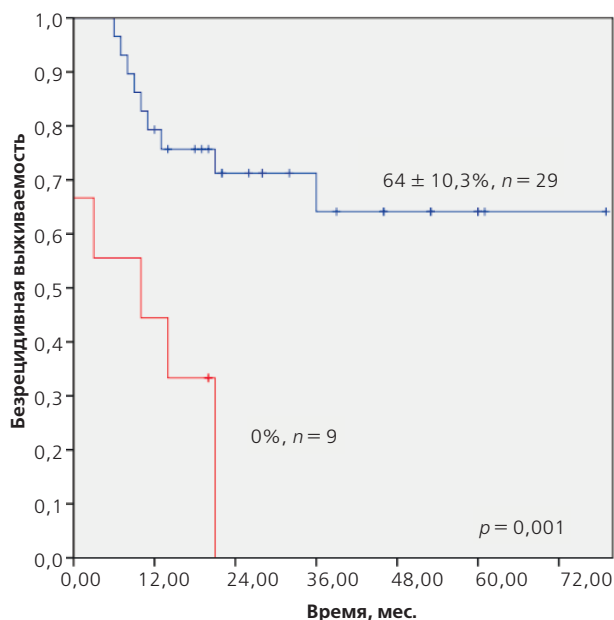


Рис. 1. Безрецидивная 5-летняя выживаемость детей с ОМЛ в зависимости от обнаружения клеток с хромосомными маркерами в костном мозге в 1–3 мес. от начала индукционного лечения. Синяя линия — больные с цитогенетической ремиссией (клеток с хромосомными аномалиями, выявленными до начала лечения, на этом этапе не было). Красная линия — больные, у которых в костном мозге сохранялись клетки с хромосомными маркерами

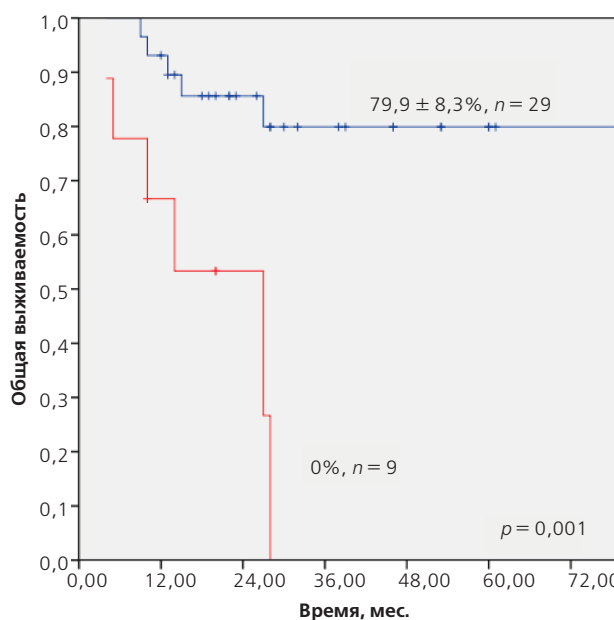


Рис. 2. Общая 5-летняя выживаемость в группах детей с ОМЛ в зависимости от обнаружения клеток с хромосомными маркерами в костном мозге в 1–3 мес. от начала индукционного лечения. Синяя линия — больные с цитогенетической ремиссией (клеток с хромосомными аномалиями, выявленными до начала лечения, на этом этапе не было). Красная линия — больные, у которых в костном мозге сохранялись клетки с хромосомными маркерами

Таким образом, мы располагаем данными о 5 пациентах, у которых при достижении морфологической ремиссии цитогенетической ремиссии не было. У четырех из них (№ 30–33; см. табл. 1) в 3, 10, 15 и 21 мес. соответственно развились рецидивы, пятый больной находится на 20-м месяце гематологической ремиссии.

Приведенные факты показывают, что сохранение клеток с хромосомными маркерами спустя 1–3 мес. от начала лечения однозначно служит неблагоприятным критерием прогноза, поскольку свидетельствует о низкой эффективности начальной терапии независимо от данных морфологического анализа.

Нам удалось сделать еще одно важное заключение: задержка в костном мозге клеток с аномалиями кариотипа при достижении полной морфологической ремиссии может иметь место как у пациентов с маркерами относительно благоприятного прогноза, так и у больных, отнесенных к группам промежуточного и плохого прогноза.

Например, при установлении полной морфологической ремиссии мы наблюдали сохранение клеток со специфическими маркерами благоприятного прогноза у 2 (№ 31 и 33 в табл. 1; № 3 и 5 в табл. 2) из 11 пациентов, обследованных в 1–3 мес. от начала лечения. Причем в первом случае с транслокацией $t(8;21)$ цитогенетическая ремиссия не наступила в 1-й месяц терапии, а на 3-й месяц уже развился рецидив. Во втором случае клетки с хромосомной транслокацией $t(16;16)(p13;q23)$ сохранялись в костном мозге в 3, 5, 7 и 8 мес., а затем при исследовании на 17-й месяц констатирована не только морфологическая, но и цитогенетическая ремиссия. У этого пациента задержка цитогенетической ремиссии была предвестником рецидива, наступившего в 20-й месяц от начала лечения.

Доля больных (6 из 27) с задержкой цитогенетической ремиссии в 1–3-й месяц лечения в группе высокого риска была примерно такой же, как и в группе стандартного риска (22 и 18 % соответственно).

Иными словами, отставание цитогенетической ремиссии служит более чувствительным критерием неблагоприятного прогноза, чем характер хромосомных аномалий, обнаруженных до начала лечения.

Полученные факты свидетельствуют о важности проведения цитогенетического анализа сразу после начальной терапии.

Цитогенетический мониторинг и прогнозирование рецидивов

В период морфологической ремиссии нам удалось провести повторные цитогенетические исследования у 35 из 43 наблюдавшихся пациентов. У 15 из них в 3–39 мес. от начала лечения развились рецидивы, причем в 11 случаях это произошло в течение первых полутора лет (ранние рецидивы). Прогнозировать наступление рецидивов по результатам цитогенетического мониторинга удалось только в 5 из 15 случаев: в 4 — по сохранению клеток с хромосомными маркерами при достижении морфологической ремиссии и в 1 — по развитию цитогенетического рецидива, обнаруженного за месяц до констатации морфологического рецидива.

Важной причиной неудач в прогнозировании рецидивов мы считаем нарушение запланированного ритма мониторинга у больных. В большинстве случаев, к сожалению, повторные анализы кариотипа клеток костного мозга во время полной ремиссии удавалось проводить с

большими интервалами, иногда превышавшими 1 год. За 1 мес. до начала рецидива цитогенетический анализ выполнен только в 1 случае, за 2 мес. — в 3, в остальных 10 случаях больные были обследованы за 4 мес. и более до морфологического рецидива.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наша работа посвящена поиску новых критериев индивидуального прогнозирования при ОМЛ у детей. Такие критерии необходимы для адаптации терапевтических программ к особенностям течения заболевания у каждого конкретного больного.

Одним из ведущих показателей, важных для прогнозирования ответа на лечение ОМЛ, считается кариотип лейкозных клеток. Оценка результатов каждой новой терапевтической программы невозможна без хромосомного анализа, проведенного до начала лечения. Однако нельзя не сказать, что вопрос о прогностическом значении многих характерных для ОМЛ аномалий кариотипа до сих пор не решен и остается дискуссионным. Если сравнивать определение групп риска в работах весьма авторитетных авторов, то можно увидеть, что конкретные хромосомные маркеры одними исследователями включаются в группу высокого риска, а другими — в группу промежуточного риска. В группу же благоприятного прогноза все включают одни и те же аномалии кариотипа. Это транслокация $t(8;21)(q22;q22)$ и инверсия хромосомы 16 $inv(16)(p13;q22)$, а также транслокация $t(16;16)(p13;q22)$.

Необходима большая работа для достижения согласия по вопросу о формировании групп риска по цитогенетическим критериям.

Если рассматривать результаты лечения больных с одной и той же хромосомной аномалией, можно увидеть, как велики различия между больными по показателям выживаемости. Сроки жизни колеблются в очень широких пределах — от нескольких месяцев до 10 лет и более. В настоящее время невозможно индивидуальное прогнозирование риска рецидива, основанное исключительно на хромосомной характеристике каждого случая ОМЛ. Помогают дополнительные показатели.

Как известно, в детском возрасте среди острых лейкозов преобладают лимфоидные варианты, а миелоидные формы наблюдаются гораздо реже, чем у взрослых, и поэтому они гораздо хуже изучены.

В последние годы были получены факты, свидетельствующие о различиях ОМЛ у взрослых и детей по прогностическому значению отдельных характерных изменений кариотипа [14–17]. Например, нередко удается получить длительные гематологические ремиссии при лечении ОМЛ у детей, у которых обнаружены перестройки длинного плеча хромосомы 3, у взрослых же пациентов эти аномалии практически всегда имеют крайне неблагоприятное прогностическое значение [13].

Сведения, изложенные выше, свидетельствуют об актуальности поисков новых прогностических критериев при ОМЛ, особенно у детей. Усовершенствование индивидуального прогнозирования течения ОМЛ важно для выбора тактики терапии.

Одним из важных критериев индивидуального прогнозирования служит оценка ответа на начальное лечение, т. к. в последние годы установлена четкая зависимость продолжительности жизни пациентов от первичного

ответа на лечение, определяемого как традиционными лабораторными методами, так и более новыми молекулярно-биологическими тестами. Стало очевидным, что рецидивы развиваются из лейкозных клеток, оставшихся в костном мозге после достижения гематологической ремиссии. Эти клетки не выявляются с помощью морфологического анализа и могут быть обнаружены только высокочувствительными иммунологическими и молекулярно-генетическими методами.

Популяция злокачественных клеток, редуцированная под влиянием лечения настолько, что ее нельзя определить стандартными клинико-лабораторными методами, называется минимальной остаточной (резидуальной) болезнью (МОБ) [18, 19]. На протяжении последнего десятилетия этот феномен интенсивно изучается и получены данные, важные для прогнозирования ОМЛ. В частности, установлено, что относительно высокий уровень МОБ после курсов консолидации ремиссии предвещает ранний рецидив [20–23]. Чувствительность молекулярно-биологических методик в тысячи раз выше, чем чувствительность иммунофенотипического подхода и стандартного цитогенетического метода в выявлении небольшого количества лейкозных клеток среди массы нормальных элементов.

К сожалению, разработанный к настоящему времени спектр надежных молекулярных маркеров позволяет отслеживать МОБ примерно в половине случаев ОМЛ. Для изучения МОБ используются и хромосомные маркеры [7–10], но это делается лишь в единичных лабораториях из-за трудоемкости и относительно низкой чувствительности цитогенетических методик. В то же время нельзя сбрасывать со счетов уникальные возможности хромосомного анализа. При кариотипировании видны все перестройки хромосом, маркирующие на данном этапе клон лейкозных клеток пациента, тогда как молекулярно-генетические подходы позволяют определить при каждом анализе лишь небольшую часть изменений, хотя выявляются и субмикроскопические изменения, которые невозможно увидеть при цитогенетическом исследовании.

Каждый метод мониторинга МОБ имеет свои преимущества и недостатки. Эти недостатки могут быть сведены к минимуму при соотнесении применения разных маркеров, что пока не получило широкого применения в клинической практике.

В 2003–2004 гг. были опубликованы исследования, проведенные в двух американских клиниках с целью выяснить прогностические возможности повторных хромосомных анализов у взрослых пациентов с ОМЛ [7, 8]. В статьях представлены результаты цитогенетических исследований, выполненных до начала лечения и после первого курса терапии (21 день). На основании полученных данных был сделан предварительный вывод о том, что отсутствие цитогенетической ремиссии на первом этапе лечения даже при достижении морфологической ремиссии имеет неблагоприятное прогностическое значение, т. е. в подавляющем большинстве случаев свидетельствует о скором развитии рецидива. Авторы указанных статей считали важным подтверждение своего вывода в других клиниках. В 2009–2011 гг. были опубликованы еще три работы: две зарубежные, в которых исследовали ОМЛ у взрослых пациентов [9, 10], и наша работа с данными, полученными при повторных цитогенетических анализах костного мозга у 23 детей с ОМЛ [24]. Результаты этих

исследований подтверждают вывод о неблагоприятном прогностическом значении сохранения клеток с хромосомными маркерами после начальной терапии. Для ОМЛ взрослых этот вывод сомнений не вызывает, поскольку он получен при исследовании нескольких сотен больных. Необходимо подтверждение его в детской клинике, и наша работа в этом направлении пока единственная.

К настоящему времени мы располагаем результатами клинического наблюдения и динамического цитогенетического исследования у 43 детей с ОМЛ, у которых до лечения обнаружены хромосомные аномалии, относящиеся к разным прогностическим группам.

Срок наблюдения за больными составил 4–79 мес. (медиана 23 мес.). Подавляющее большинство (35 из 43) пациентов находились под наблюдением более 1 года, а 19 из них — более 2 лет. Количество цитогенетических анализов колебалось от 3 до 17 на каждого больного.

Сравнение эффективности лечения больных из группы стандартного риска (13 человек) и группы высокого риска (30 человек) не выявило различий между этими группами. Так, 5-летняя БРВ для группы стандартного риска составила $41,0 \pm 16,9\%$, для группы высокого риска — $60,4 \pm 9,6\%$ ($p = 0,94$), 5-летняя ОВ — $65,9 \pm 14,0$ и $66,9 \pm 9,2\%$ соответственно ($p = 0,9$). Этот результат объясняется малочисленностью каждой из сравниваемых групп и их резко выраженной гетерогенностью. Необходимо подчеркнуть, что данные литературы о значительных различиях между цитогенетическими группами риска по показателям выживаемости основаны на работах, в которых проведены клинико-цитогенетические сопоставления у больших групп пациентов — сотни и тысячи случаев [13, 25–27].

В последние годы ведется интенсивная работа по усовершенствованию классификации групп риска. Многие авторы с этой целью предлагают сочетать особенности кариотипа с другими критериями: морфологическими показателями ответа на начальную терапию, молекулярными и иммунофенотипическими маркерами и др.

Весьма важным и чувствительным прогностическим критерием считается цитогенетическая ремиссия, обнаруженная после проведения курса начальной терапии. Результаты наших исследований, которым посвящена настоящая статья, подтверждают такой вывод, сделанный ранее другими авторами при изучении взрослых пациентов.

При сравнении данных хромосомного анализа клеток костного мозга, проведенного нами до лечения и в 1–3-й месяц от его начала, установлено, что сохранение клеток с хромосомными маркерами на этом этапе однозначно служит неблагоприятным фактором прогноза, поскольку свидетельствует о низкой эффективности начальной терапии. Это иллюстрируется сравнением кривых выживаемости у пациентов, у которых в начале морфологической ремиссии обнаружена и цитогенетическая ремиссия (1-я группа), и у пациентов, у которых цитогенетической ремиссии в это время не было (2-я группа). БРВ составила в 1-й группе $64,1 \pm 10,3\%$, тогда как во второй группе этот показатель был близок к 0. Разница статистически значима. Сходные результаты получены при сравнении ОВ в тех же группах.

При анализе наших результатов удалось сделать еще одно важное заключение. Оказалось, что задержка в костном мозге клеток с аномалиями кариотипа при

достижении полной морфологической ремиссии может иметь место как у пациентов с маркерами благоприятного прогноза, так и у больных, отнесенных к другим прогностическим группам. Например, при установлении полной морфологической ремиссии мы наблюдали сохранение клеток со специфическими маркерами благоприятного прогноза у 2 из 11 пациентов, обследованных в 1–3-й месяц от начала лечения. В группе высокого риска задержка цитогенетической ремиссии наблюдалась со сходной частотой.

Таким образом, результаты нашей работы свидетельствуют о том, что в период морфологической ремиссии присутствие в костном мозге клеток с хромосомными маркерами, обнаруженными до лечения, служит более чувствительным критерием неблагоприятного прогноза, чем характер хромосомных аномалий, выявленных до начала лечения (группа риска). Полученные факты подтверждают важность проведения цитогенетического анализа не только перед началом лечения, но и в начале морфологической ремиссии.

Прогнозировать наступление рецидивов по результатам цитогенетического мониторинга нам удалось только у 5 из 15 детей: в 4 случаях — по сохранению клеток с хромосомными маркерами при достижении морфологической ремиссии и в 1 — по развитию цитогенетического рецидива, обнаруженного за месяц до постановки этого диагноза. Главной причиной своих неудач мы считаем нарушение запланированного ритма отслеживания клеток с хромосомными маркерами. В большинстве случаев, к сожалению, повторные анализы кариотипа клеток костного мозга во время полной ремиссии удавалось проводить с большими интервалами, иногда превышавшими 1 год.

Обсуждая возможности цитогенетического мониторинга в прогнозировании рецидивов ОМЛ, нельзя не обратиться к огромному опыту молекулярного мониторинга МОБ [3]. Этот опыт показывает, что скорость развития рецидива существенно варьирует у разных пациентов даже с однотипными формами лейкоза. Время от молекулярного до гематологического рецидива у одних больных составляет всего несколько дней, а у других — приближается к году или превышает этот срок [20, 28]. Отсюда ясно, что для того, чтобы «поймать» большинство цитогенетических рецидивов, необходимо повторять хромосомные анализы костного мозга не реже 1 раза в месяц. Это практически невозможно, главным образом, из-за травматичности для больного частых костномозговых пункций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты показывают, что проведение хромосомного анализа не только до начала лечения ОМЛ, но и в начале морфологической ремиссии дает информацию, важную для индивидуального прогнозирования. Обнаружение клеток с хромосомными маркерами на этом этапе лечения свидетельствует о его недостаточной эффективности и ставит вопрос об интенсификации терапии. Конечно, в это время следовало бы оценивать количество оставшихся лейкозных клеток, используя комплекс современных методов, включая молекулярные, иммунофенотипические и др. К сожалению, эти подходы, во-первых, позволяют выявлять специфические маркеры

далеко не при всех вариантах лейкоза, а во-вторых, в настоящее время они в отличие от хромосомного анализа не доступны большинству гематологических отделений нашей страны.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Российский фонд фундаментальных исследований). Проект № 10-04-00567.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marcucci G., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring useful clinically? *Eur. J. Haematol.* 2003; 21: 143–54.
2. Beretta C., Gaipa G., Rossi V. et al. Development of quantitative-PCR method for specific FLT3/ITD monitoring in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1441–4.
3. Grimwade D., Vias P., Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 2010; 22: 000–000.
4. Guieze R., Reneville A., Cauella J.M. et al. Prognostic value of minimal residual disease by real-time quantitative PCR in acute myeloid leukemia with CBFbeta-MYH11 rearrangement: the French experience. *Leukemia* 2010; 24: 1386–8.
5. Rizzari C., Cazzaniga G., Goliva T. et al. Predictive factors and survival in childhood acute myeloid leukemia: role of minimal residual disease. *Exp. Rev. Anticancer Ther.* 2011; 11(9): 1391–401.
6. Buccisano F., Maurillo L., Del Principe M.I. et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119: 332–41.
7. Konopleva M., Cheng S.-C., Cortes J.E. et al. Independent prognostic significance of day 21 cytogenetic findings in newly-diagnosed acute myeloid leukemia or refractory anemia with excess blasts. *Haematologica* 2003; 88: 733–6.
8. Marcucci G., Mrozek K., Ruppert A.S., Archer A.J. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia; results from Cancer and Leukemia Group B study 8461. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 2410–8.
9. Balleisen S., Kuendgen A., Hilderbrandt B. et al. Prognostic relevance of achieving cytogenetic remission in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome following induction chemotherapy. *Leuk. Res.* 2009; 33: 1189–93.
10. Chen Y., Cortes J., Estrov Z. et al. Persistence of cytogenetic abnormalities at complete remission after induction in patients with acute myeloid leukemia: prognostic significance and the potential role of allogeneic stem cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 2507–13.
11. ISCN-2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Ed. by L.G. Shaffer, N. Tommerup. Basel: Karger, 2005.
12. ISCN 2009: An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. Ed. by L. Schaffer, M. Slovak, L. Campbell. Basel: Karger, 2009.
13. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adults treated in the UK Medical Research Council trials. *Blood First Edition Paper*; prepublished online April 12, 2010. doi: 10.1182/blood-2009-11-254441.
14. Harrison Ch.J., Hills R.K., Moorman A.V. et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council treatment trials AML 10 and 12. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 2674–81.
15. von Neuhoff Ch., Reinhardt D., Sander A. et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM98. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 2682–9.
16. Schoch C., Kern W., Schnittger S. et al. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica* 2004; 89(9): 1082–90.
17. Balgobind B.V., Raimondi S.C., Harbott J. et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL rearranged acute myeloid leukemia: results of international retrospective study. *Blood* 2009; 114: 2489–96.
18. Campana D., Pui C.-H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodological advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416–24.
19. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br. J. Haematol.* 2003; 121: 823–38.
20. Muto A., Mori S., Matsushita H. et al. Serial quantification of minimal residual disease for t(8;21) acute myelogenous leukemia with RT-competitive PCR assay. *Br. J. Haematol.* 1996; 95: 85–94.
21. Krauter J., Gorlich K., Ottman O. et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase

chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 4413–22.

22. *Viehman S., Teigler-Schlegel A., Bruch J. et al.* Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real-time PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO transcripts rearrangements. *Leukemia* 2003; 17: 1130–6.

23. *Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X. et al.* Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 3625–32.

24. Флейшман Е.В., Сокова О.И., Попа А.В. и др. Цитогенетический мониторинг острого миелоидного лейкоза детей. *Вестн. РАМН* 2009; 9: 28–32.

Fleyshman Ye.V., Sokova O.I., Popa A.V. i dr. Tsitogeneticheskiy monitoring ostrogo miyeloidnogo leykoza detey [Cytogenetic monitoring of pediatric acute myeloid leukemia]. *Vestn. RAMN* 2009; 9: 28–32.

25. *Grimwade D., Walker S., Oliver F. et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322–33.

26. *Byrd J.C., Mrozek K., Dodge R.K. et al.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (GALB 8461). *Blood* 2002; 100: 4325–36.

27. *Pfirschmann M., Ehninger G., Thiede Ch. et al.* Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukemia: post-hoc analysis in the AML-96 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 207–14.

28. *Takenokuchi M., Yasuda C., Takeuchi K. et al.* Quantitative nested reverse transcriptase PCR vs real-time PCR for measuring AML1/ETO (MTG8) transcripts. *Clin. Lab. Haem.* 2004; 26: 107–14.

