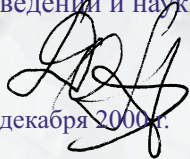


# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

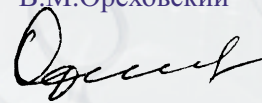
Заместитель начальника  
Главного управления кадровой политики,  
учебных заведений и науки Н.И. Доста



4 декабря 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель  
министра здравоохранения  
В.М.Ореховский



4 декабря 2000 г.

Регистрационный № 141-0011

# СТРАТИФИКАЦИЯ ГРУПП РИСКА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Минск 2001

[Перейти к оглавлению](#)

**Учреждение-разработчик:** Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии

**Авторы:** д-р мед. наук О.В. Алейникова, д-р мед. наук М.П. Потапнев, канд. мед. наук Т.А. Углова, канд. мед. наук С.Е. Буглова, Н.Н. Савва, И.В. Пролесковская, Т.Е. Шман, В.П. Савицкий

**Рецензент:** д-р мед. наук А.Л. Усс

В методических рекомендациях проанализированы как традиционные, так и новые прогностические факторы, определяющие патогенез и исход острого лимфобластного лейкоза у детей. Предложена новая стратификация групп риска детей с ОЛЛ, которая позволяет оптимизировать выбор тактики лечения с учетом как индивидуальных особенностей больного, так и биологических свойств лейкозных клеток.

Рекомендации адресованы врачам гематологических отделений и специализированных онкогематологических центров Республики Беларусь.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

# Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАК ФАКТОРЫ ДОЛГОСРОЧНОГО ПРОГНОЗА .....</b>	<b>6</b>
1.1. Возраст .....	6
1.2. Пол .....	7
1.3. Инициальный лейкоцитоз .....	7
1.4. Иммунофенотип лейкозных клеток .....	9
1.5. Генетические изменение лейкозных клеток .....	12
1.6. Прогностическое значение ответа на терапию у больных ОЛЛ .....	15
<b>2. НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАННЕГО ОТВЕТА НА ХИМИОТЕРАПИЮ .....</b>	<b>19</b>
2.1. Митотический цикл лейкозных клеток .....	19
2.2. Лекарственная чувствительность/устойчивость лейкозных клеток <i>in vitro</i> как критерий прогноза раннего ответа на терапию .....	23
2.3. Апоптотические процессы в лейкозных клетках как фактор прогноза раннего ответа на терапию .....	25
<b>3. СТРАТИФИКАЦИЯ ГРУПП РИСКА У ДЕТЕЙ С ОЛЛ .....</b>	<b>30</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b>	
I. МТТ-тест (Kaspers G.J.L. et al., 1997) .....	33
II. Определение уровня спонтанного апоптоза .....	35



## **ВВЕДЕНИЕ**

Последние двадцать лет характеризуются значительным прогрессом в детской лейкологии. 65–75% детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) имеют стойкую ремиссию более 5 лет. Это стало возможным не только благодаря новым терапевтическим подходам с использованием наиболее эффективных комбинаций различных цитостатических препаратов, но и благодаря применению новых диагностических методов, основанных на характеристике биологических свойств лейкозных клеток, улучшению сопроводительной терапии, внедрению эффективных противорецидивных программ лечения, а также благодаря использованию трансплантации костного мозга при некоторых ранее некурабельных формах острых лейкозов у детей.

В настоящее время при назначении терапии больным ОЛЛ учитывается ряд критериев, которые позволяют отнести пациентов к группам низкого, стандартного (среднего) или высокого риска. Достижение оптимальных результатов лечения больных группы высокого риска требует длительного применения высоких доз цитостатических препаратов, а также дополнительных методов терапии, таких как трансплантация костного мозга. В то же время продолжительная высокодозная полихимиотерапия (ПХТ) повышает на 10–20% риск неблагоприятных исходов, обусловленных ее токсическим действием и развитием отдаленных осложнений. Эффективное лечение пациентов групп низкого и стандартного риска может быть обеспечено более щадящими режимами химиотерапии, в ряде случаев — без профилактического облучения головного мозга.

Хорошо известно, что лечение онкогематологических больных является дорогостоящим. Планирование программ противоопухолевой терапии очень сложно не только с патогенетической, этической или психологической точки зрения, но и с позиций соотношения «цена — выживаемость — качество жизни», что также связано со стратификацией групп риска больных ОЛЛ.

Адекватное отнесение больных ОЛЛ к прогностическим группам риска имеет решающее значение для выбора объема терапии, уменьшения вероятности рецидива заболевания и для улучшения качества жизни больного.

За последние двадцать лет оценено около пятидесяти клинических и биологических потенциально значимых прогностических критериев. По мере внедрения новых, более эффективных комбинаций различных цитостатических препаратов многие клинические и биологические переменные, которые раньше учитывались при прогнозировании исхода заболевания, постепенно утрачивают свое значение.

В настоящее время в мировой клинической практике при определении категории группы риска используют до 15 различных критериев, при этом отсутствие единого подхода затрудняет проведение сравнительного анализа результатов лечения и клинических испытаний в различных клиниках в связи с отсутствием идентичности сопоставляемых популяций.

В данных методических рекомендациях на основе анализа современной литературы и результатов собственных исследований предлагается новая стратификация групп риска детей с ОЛЛ, в которой в качестве прогностических факторов учитываются иммунофенотипические и генотипические особенности бластных клеток в совокупности с некоторыми клиническими и лабораторными показателями (возраст больного, количество лейкоцитов в периферической крови на момент постановки диагноза) и уровнем раннего ответа на терапию.

## **1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАК ФАКТОРЫ ДОЛГОСРОЧНОГО ПРОГНОЗА**

### **1.1. Возраст**

Одним из наиболее значимых прогностических факторов является возраст на момент постановки диагноза. Общая (OS) и бессобытийная выживаемость (EFS) детей младше 1 года и старше 10 лет достоверно ниже, чем у детей в возрасте 3–10 лет (EFS — 45%, 51% и 74% соответственно). Плохой прогноз у детей в возрасте до 1 года связан с тем, что 70–80% из них имеют реаранжировку MLL-гена и высокий лейкоцитоз на момент постановки диагноза. У подростков высока частота как реаранжировки MLL-гена, так и образования химерного гена BCR-ABL. Заболевание у них часто ассоциируется с такими неблагоприятными прогностическими факторами, как высокий уровень лейкоцитов в периферической крови на момент постановки диагноза, Т-клеточный иммунофенотип и L2-морфология лейкемических клеток, индекс ДНК  $< 1,16$  и псевдодиплоидия. У детей же в возрасте 3–9 лет часто встречается гипердиплоидия и химерный ген TEL-AML1.

В результате проведения мультивариантного анализа показано, что возраст при диагностике имеет независимую прогностическую значимость ( $RR1 = 1,77$ ;  $p < 0,00001$ ).



## **1.2. Пол**

Пол ребенка также является важным критерием долгосрочного прогноза при ОЛЛ ( $p < 0,00006$ ). Сравнительная оценка результатов лечения ОЛЛ позволила выявить достоверные различия в зависимости от пола пациентов. Бессобытийная выживаемость (EFS) и свободная от болезни выживаемость (DFS) у девочек ( $0,72 \pm 0,06$  и  $0,70 \pm 0,04$  соответственно) была достоверно выше, чем у мальчиков ( $0,60 \pm 0,04$  и  $0,63 \pm 0,04$ ,  $p < 0,05$ ) во всех прогностических группах. Явные различия в результатах лечения могут быть связаны с различиями в индексе ДНК и иммунофенотипе лейкозных клеток. Следует отметить, что пол не влияет на успех индукционной терапии и частоту рецидивов в первые месяцы лечения, однако уже через 6–12 мес. частота рецидивов у мальчиков выше, чем у девочек.

## **1.3. Инициальный лейкоцитоз**

Общепризнано, что содержание лейкоцитов в периферической крови на момент установления диагноза является наиболее важным прогностическим фактором долгосрочной выживаемости пациентов во всех возрастных группах. Инициальный бластоз находится в строгом соответствии с инициальным лейкоцитозом, и оба этих показателя несут равноценную информацию (Goldie J.H., Coldman A.J., 1979).

Пациенты с большим числом лейкоцитов на момент установления диагноза чаще имеют экстрамедуллярные поражения при диагностике и высокий риск экстрамедуллярного рецидива после достижения костно-мозговой ремиссии. Гипотеза Goldie — Coldman на основе математической модели связывает развитие резистентности клеточных клонов после начала терапии с общим количеством злокачественных клеток при диагностике. Однако единого мнения о прогностическом значении того или иного уровня лейкоцитов нет. Американские исследователи придерживаются мнения о том, что лейкоцитоз  $> 50000/\text{мм}^3$  является неблагоприятным прогностическим признаком, в то время как немецкие исследователи группы ВFM используют более жесткие критерии и считают прогностически неблагоприятным лейкоцитоз  $> 20000/\text{мм}^3$ . По нашим данным, критическим уровнем инициального лейкоцитоза, влияющим на прогноз заболевания, является  $10000/\text{мм}^3$ . Показатели EFS и DFS у пациентов с числом лейкоцитов в начале заболевания более  $10000/\text{мм}^3$  были достоверно ниже, чем у пациентов с инициальным лейкоцитозом менее  $10000/\text{мм}^3$ , причем тенденция к снижению выживаемости сохранялась и далее, по мере роста инициального лейкоцитоза.

Таким образом, лейкоцитоз более  $10000/\text{мм}^3$  до начала лечения является одним из значимых неблагоприятных факторов долгосрочного прогноза заболевания.



#### **1.4. Иммунофенотип лейкозных клеток**

Иммунофенотипическая диагностика лейкозов выполняется методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител, специфически связывающихся с антигенами дифференцировки (CD), экспрессия которых на поверхности или в цитоплазме/ядре бластных клеток зависит как от их линейного происхождения, так и от степени дифференцировки. Все лимфолейкозы делят на две большие группы: В-линейные (В-ОЛЛ) и Т-линейные (Т-ОЛЛ). В свою очередь, среди В-линейных ОЛЛ выделяют четыре подгруппы в зависимости от уровня, на котором произошел блок дифференцировки:

Про-В-ОЛЛ — CD34<sup>+</sup>, TdT<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD22<sup>+/-</sup>, cyIgM<sup>-</sup>, sIgM<sup>-</sup>.

Common В-ОЛЛ — CD34<sup>+</sup>, TdT<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD20<sup>+/-</sup>, CD22<sup>+</sup>, cyIgM<sup>-</sup>, sIgM<sup>-</sup>.

Пре-В-ОЛЛ — CD34<sup>+/-</sup>, TdT<sup>+/-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD20<sup>+/-</sup>, CD22<sup>+</sup>, cyIgM<sup>+</sup>, sIgM<sup>-</sup>.

Зрелый В-ОЛЛ — CD34<sup>-</sup>, TdT<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, cyIgM<sup>-</sup>, sIgM<sup>+</sup>.

Негативность маркера CD10 при наиболее раннем субтипе В-линейного ОЛЛ (про-В) является, по данным многих авторов, неблагоприятным прогностическим признаком, особенно в случае сочетания с хромосомными aberrациями в локусе 11q23 (Ribeiro R.C., Pui C.-H., 1993). Common В-ОЛЛ (CD10<sup>+</sup>) составляет примерно 60–70% всех случаев ОЛЛ у детей и ассоциируется с благоприятным прогнозом во всех возрастных группах.

Пре-В фенотип ассоциируется с большим риском возникновения костно-мозговых рецидивов и нейролейкемий. У 20–30% пациентов с пре-В-ОЛЛ выявляется транслокация  $t(1;19)(q23, q13)$ , связанная с образованием химерного гена E2A/PBX1, экспрессия которого ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Выживаемость пациентов без этой хромосомной аберрации аналогична выживаемости пациентов с common В-ОЛЛ. Зрелый В-ОЛЛ встречается у 1–2% детей, как правило, в старшей возрастной группе, и характеризуется более выраженным поражением костного мозга, чем при других В-линейных ОЛЛ. При использовании стандартных режимов терапии острых лимфолейкозов дети с В-ОЛЛ имели плохой прогноз, однако интенсивные протоколы лечения последних лет позволяют добиваться длительных ремиссий в 60% случаев. Сравнивая результаты выживаемости среди различных субтипов В-линейных ОЛЛ, мы выявили, что наихудший прогноз имеют дети с про-В-фенотипом (OS = 0,58; EFS = 0,51;  $p = 0,014$ ;  $p = 0,006$  по сравнению с пре-В соответственно).

Т-линейный ОЛЛ встречается у 10–15% детей с ОЛЛ, чаще у мальчиков, и ассоциируется с высоким инициальным лейкоцитозом, поражением средостения (в 50–60% случаев) и ЦНС. Мультивариантный анализ не выявил независимого прогностического значения Т-иммунофенотипа лейкозных клеток. Современные интенсивные протоколы лечения позволяют достигать выживаемости при Т-ОЛЛ, приближающейся к выживаемости при В-линейных ОЛЛ. Т-ОЛЛ с фенотипом лейкозных клеток  $CD7^+$ ,  $CD4^-$ ,  $CD8^-$  (пре-Т), характеризуется резистентностью к стандартной терапии и плохим прогнозом.

Приблизительно у 40% детей с ОЛЛ в РБ лимфобласты экспрессируют миелоидные маркеры. Наличие коэкспрессий миелоидных маркеров при ОЛЛ у детей до настоящего времени является предметом широких дискуссий. Некоторые авторы связывают коэкспрессию миеломаркеров с плохим прогнозом (Uckun E.V. et al., 1997), другие не находят достоверных различий (Uckun E.V. et al., 1996). При оценке прогностической значимости миелоидных коэкспрессий при унивариантном анализе мы не выявили самостоятельного влияния этого феномена на свободную от болезни и безрецидивную выживаемость (RFS) больных с В-линейными ОЛЛ, тогда как при Т-ОЛЛ наличие коэкспрессий миеломаркеров ассоциировалось с ухудшением отдаленных результатов лечения ( $p < 0,05$ ).



### **1.5. Генетические изменение лейкозных клеток**

Возникновение опухоли, как правило, связано с перестройками в геноме клетки. Генетические перестройки определяют морфоцитохимические особенности и иммунофенотип опухолевых клеток, отражающие уровень блока их дифференцировки. Наличие той или иной аномалии кариотипа позволяет судить о степени злокачественности опухоли (низкая, средняя, высокая) и в соответствии с этим назначать адекватное лечение и прогнозировать эффективность терапии. У детей с гипердиплоидным кариотипом бластных клеток (общее количество хромосом  $> 50$ ) отмечалась более продолжительная ремиссия и лучшая выживаемость по сравнению с другими вариантами кариотипов. Прогноз у детей, бласты которых содержат 47–50 хромосом, не отличается от такового у детей с нормальным числом хромосом в лейкозных клетках. Дети с псевдодиплоидией лимфобластов (структурные реаранжировки без изменения общего числа хромосом) имеют короткую ремиссию и плохую выживаемость. Гиподиплоидия лейкозных клеток (количество хромосом  $< 46$ ) ассоциируется с плохим прогнозом. Дети с псевдодиплоидными или гиподиплоидными лейкозными клетками, независимо от их возраста или числа лейкоцитов при постановке диагноза, должны пройти такое же агрессивное лечение, как и пациенты стандартной группы риска.

Изменение ploидности бластных клеток можно выявить путем определения методом проточной цитофлуориметрии индекса ДНК, который представляет собой отношение содержания ДНК в лейкозных клетках к содержанию ДНК в нормальных диплоидных клетках). Популяцию лейкозных клеток считали диплоидной при индексе ДНК  $1,0 \pm 0,1$ , что соответствует техническим возможностям метода. При гипердиплоидии индекс ДНК  $> 1,1$ , при гиподиплоидии —  $\leq 0,9$ .

Согласно данным литературы (Salord H. et al., 1996), прогностически благоприятным является индекс ДНК  $\geq 1,16$  ( $> 50$  хромосом). Для этих пациентов характерна большая продолжительность ремиссии ( $> 5$  лет). Больные с менее выраженной гипердиплоидностью бластов (индекс ДНК — в диапазоне от 1,1 до 1,16), а также больные с диплоидными бластами отличаются менее благоприятным прогнозом. Больные с более редкими гиподиплоидными лейкозами погибают в течение 4–6 мес. после постановки диагноза. Индекс ДНК бластных клеток  $\geq 1,16$  в большинстве случаев ассоциируется с такими независимыми благоприятными факторами, как трисомия 4-й и 10-й хромосом, возраст от 1 года до 9 лет, лейкоцитоз  $< 25000$  ( $p < 0,01$ ), а также низкие значения фактора риска по протоколу ВФМ ( $< 0,7$ ). Тетраплоидные (индекс ДНК —  $2,0 \pm 0,1$ ) случаи острых лейкозов и случаи с высокой степенью анеуплоидии (индекс ДНК  $> 1,5$ ) выявляются редко, и их клиническое значение неизвестно. Следует отметить, что однозначной связи между индексом ДНК и ответом на терапию к настоящему моменту не установлено. Определение индекса ДНК методом проточной цитометрии не позволяет идентифицировать хромосомы, с которыми связаны генетические нарушения в опухолевой клетке. Такую информацию можно получить с помощью цитогенетического анализа.

Структурные изменения хромосом при ОЛЛ у детей в виде транслокаций (t), инверсий (inv) или делеций (del) имеют огромное значение для раннего определения прогноза заболевания и выбора оптимальной тактики лечения. В **табл. 1** представлены некоторые из наиболее часто встречающихся неслучайных транслокаций и их характерные черты.

## Сравнительный метаанализ генетических нарушений у детей при ОЛЛ

Тип нарушений	Частота, %	Молекулярно-генетические изменения	Ассоциации	EFS (5 лет)
Гиперплоидия (> 50 хромосом)	27–29	неизвестны	преимущественно common В-ОЛЛ, возраст 1–10 лет, низкое количество лейкоцитов, благоприятный прогноз при применении антиметаболитов	80–90
t(12;21)(p12–13; q22)	20–25	TEL-AML1	фенотип common В, псевдодиплоидия, возраст 1–10 лет, благоприятный прогноз	85–90
t(1;19)(q23; p13)	5–6	E2A-PBX	фенотип пре-В, псевдодиплоидия, выраженный лейкоцитоз, нейролейкемия, улучшение прогноза при интенсивной ПХТ	70–80
t(4;11)(q21, q23) и другие t(11) q23	4–8	MLL-AF4	фенотип про-В CD10 <sup>-</sup> /CD15 <sup>+</sup> , встречается преимущественно у детей в возрасте до 6 мес., характерен гиперлейкоцитоз, нейролейкемия, прогноз плохой.	10–30
t(9;22)(q34; q11)	3–4	BCR-ABL	фенотип преимущественно common В, старший возраст, лейкоцитоз, плохой прогноз в подгруппе с количеством лейкоцитов > 25000/мм <sup>3</sup> .	20–35
t(8;14)(q24; q32.3), t(2;8) (p12; q24) или t(8;22)(q24; q11)	2	усиленная экспрессия MYC с реаранжировкой IGH, IGK, IGL	зрелый В-ОЛЛ; L3 морфология, мужской пол, экстрамедулярное поражение, хороший прогноз при применении коротких курсов высоких доз метотрексата, цитозара, циклофосамида	70–80
t(1;14)(p34; q11)	3–4	TAL(SCL)	T-ОЛЛ CD10 <sup>-</sup> , мужской пол, гиперлейкоцитоз	60–70
dic(9;12)(11–12;? p12)	1	–	ранний В-линейный фенотип, мужской пол, хороший ответ на терапию антиметаболитами	80–90



Следует отметить, что помимо определения структурных изменений хромосом, для стратификации групп риска необходимо параллельное проведение и молекулярно-биологического анализа. Наиболее распространенная в детском возрасте и ассоциированная с хорошим прогнозом транслокация, приводящая к образованию химерного гена TEL/AML1, может быть выявлена только с помощью данного метода. Плохой прогноз при генетической перестройке в локусе 11q23 отмечается лишь при вовлечении MLL-гена. У больных ОЛЛ с t(1;19) и отсутствием химерного гена E2A-PBX1 хороший ответ достигается применением стандартных схем лечения, включающих антиметаболиты. Наличие же химерного гена E2A-PBX1 требует интенсивной ПХТ.

Таким образом, информация о генетических изменениях в лейкозных клетках существенно дополняет охарактеризованные выше такие критерии прогнозирования, как число лейкоцитов на момент постановки диагноза, возраст больного и иммунофенотип бластных клеток. Однако следует отметить, что у 20% детей с гиперплоидией или наличием гена TEL/AML1, т.е., с благоприятным прогнозом, отмечаются рецидивы заболевания.

### **1.6. Прогностическое значение ответа на терапию у больных ОЛЛ**

Важным и независимым прогностическим фактором при ОЛЛ у детей является ответ на терапию, который оценивается по эффективности преднизолоновой профазы (уровень бластов в периферической крови на 8-й день терапии) и раннему костно-мозговому ответу на терапию (содержание бластов на 15-й день индукционной терапии).

Ответ на преднизолоновую профазу, несмотря на его низкую информативность у больных с малым количеством бластов в периферической крови в начале заболевания, является важным для прогноза выздоровления и биологически связан, по-видимому, с глюкокортикоидзависимым апоптозом. По нашим данным, в группе пациентов, имеющих в периферической крови на 8-й день лечения бласты более  $1000/\text{мм}^3$ , показатели DFS и RFS составляли 0,38 и 0,56 соответственно, в группе больных с хорошим ответом на преднизолоновую профазу — 0,71 и 0,81 соответственно.

Ранний ответ на терапию, который оценивается по количеству бластов в костном мозге на 14–15-й день лечения, во многих прогностических классификациях является приоритетным фактором риска. Нами установлено, что у детей с числом бластных клеток на 15-й день лечения менее 5% 9-летняя DFS составляет 77%, в то время как у пациентов с числом бластных клеток более 5% DFS — 51% ( $p < 0,001$ ). Плохой ранний ответ на терапию ассоциируется с другими неблагоприятными прогностическими признаками. Так, плохой ранний ответ на терапию отмечается у 90% детей в возрасте до 1 года и старше 10 лет и лишь у 15% детей в возрасте от 1 года до 10 лет. При инициальном лейкоцитозе более  $10000/\text{мм}^3$  у 30% пациентов регистрируется плохой ответ на индукционную терапию.

Исследованные в качестве факторов риска традиционные клинико-лабораторные показатели имеют разную значимость при прогнозировании результатов лечения ОЛЛ. Их сравнительная характеристика, основанная на литературных данных, представлена в **табл. 2**.

В настоящее время нами и другими авторами изучается возможность использования биологических характеристик лейкозных клеток в качестве критериев прогноза заболевания и выбора тактики лечения. В следующей главе представлены теоретические основы и методические подходы к их исследованию.

## Сравнительный метаанализ кооперативных исследований фактора прогноза при ОЛЛ у детей

Штудия	Годы изучения	Число больных	Факторы значимые ( $p < 0,05$ )	Факторы незначимые
JUDE X, XI	1980–89	139	цитогенетика, пол	возраст, индекс ДНК, морфология бластов, инициальный лейкоцитоз, размеры печени и селезенки
JUDE VIII, IX, X, XI	1972–88	1333	возраст*, инициальный лейкоцитоз*, пол, размеры печени	поражение ЦНС и средостения, тромбоцитопения, увеличение селезенки
UKALL VIII	1980–84	829	инициальный лейкоцитоз*, возраст, цитогенетика, ранний костномозговой ответ	CD 10, морфология бластов, размеры печени и селезенки, тромбоцитопения



Штудия	Годы изучения	Число больных	Факторы значимые ( $p < 0,05$ )	Факторы незначимые
UKALLX	1985–90	1612	инициальный лейкоцитоз*, возраст, ранний ответ на ПХТ, цитогенетика, пол, морфология	Pre-T-ALL, CD 10 <sup>+</sup>
BFM86	1986–90	998	возраст, первичный ответ на преднизолоновую профазу, фактор риска, инициальный лейкоцитоз, Т-иммунофенотип, резистентность к стероидам <i>in vitro</i> *	экспрессия CD 10, морфология бластов, коэкспрессия миеломаркеров, поражение ЦНС
JUDE XI	1984–88	297	первичный ответ на преднизолоновую профазу*, инициальный лейкоцитоз	возраст только при В-линейных ОЛЛ
CCG 100 CCG1800	1983–94	651	возраст, экспрессия CD2, размеры печени и селезенки*	инициальный лейкоцитоз

\*наиболее значимые факторы

## **2. НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАННЕГО ОТВЕТА НА ХИМИОТЕРАПИЮ**

### **2.1. Митотический цикл лейкозных клеток**

Клеточный цикл представляет собой детерминированный ряд закономерно меняющихся друг друга состояний, протекающих в строгой последовательности и регулируемых как генетическим аппаратом клетки, так и влиянием внешних факторов. Обязательным компонентом его является митотический (пролиферативный) цикл — комплекс взаимосвязанных и согласованных во времени событий, происходящих в процессе подготовки клетки к делению и на протяжении самого деления. В митотическом цикле выделяют периоды: G1 — пресинтетический, S — синтетический, G2 — постсинтетический (премитотический), M — митоз (рис. 1).

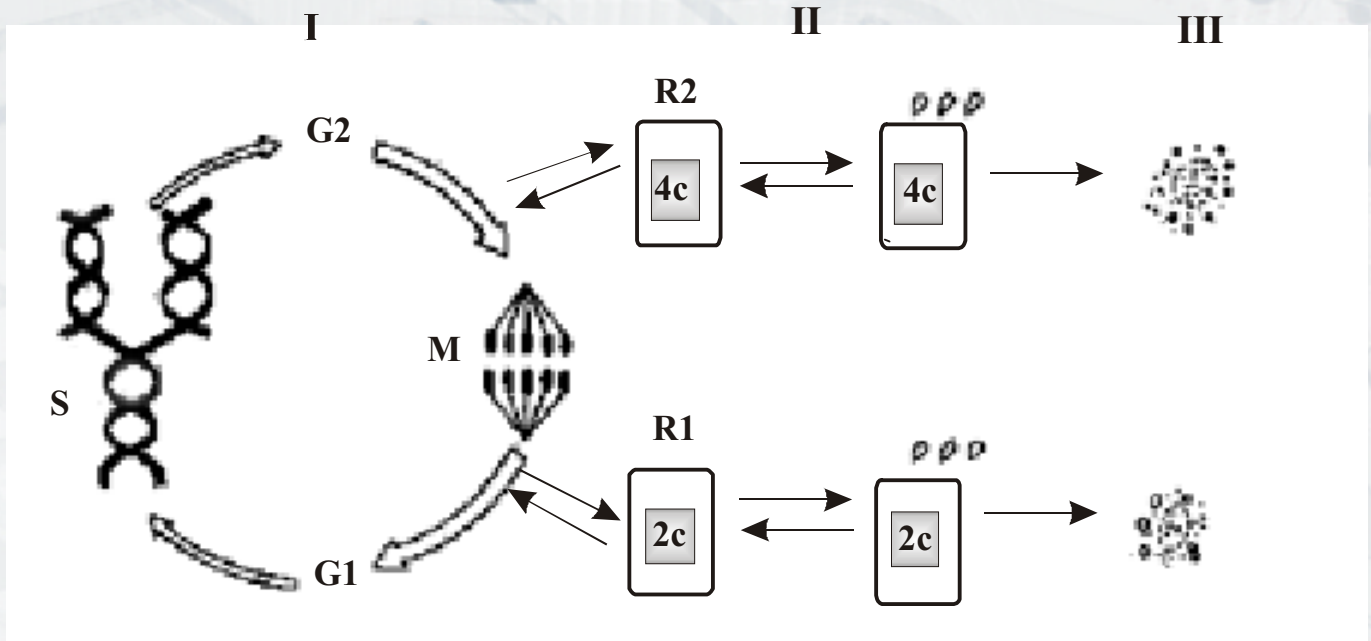


Рис. 1. Жизненный цикл клетки. I — митотический цикл; II — переход в дифференцированное состояние; III — гибель клетки; R1, R2 — периоды покоя клеточного цикла; 2c — количество ДНК в диплоидном наборе хромосом; 4c — удвоение количества ДНК



Исследование лейкозных клеток методом проточной цитометрии позволяет охарактеризовать их распределение в разных фазах клеточного цикла, которое может варьировать в зависимости от интенсивности пролиферации. Снижение относительного содержания клеток в стадии синтеза ДНК происходит за счет блока в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>. О высоком уровне пролиферации лейкозного клона свидетельствует одновременное увеличение доли клеток в фазах G<sub>2</sub> + M и S. Достаточно высокая доля клеток в фазе G<sub>2</sub> + M при низкой доле клеток в S-фазе выявляется при блоке в стадии G<sub>2</sub>. Для оценки такого варианта изменений более информативным является показатель соотношения S/G<sub>2</sub> + M.

Цитостатические препараты действуют на клетки, находящиеся в различных фазах клеточного цикла: преднизолон, винкристин, рубомицин действуют на лейкозные клетки, находящиеся в фазах G<sub>1</sub> и S; рубомицин действуют на лейкозные клетки, находящиеся в фазах G<sub>1</sub> и S; винкристин, цитозар, аспарагиназа — на клетки в S-фазе; этопозид, идарубицин — в фазах G<sub>2</sub> и M. Циклофосфан действует на бластные клетки во всех фазах митотического цикла.

Количественная оценка процентного соотношения клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла, методом проточной цитофлуориметрии (рис.2) может иметь большое значение для прогнозирования характера течения заболевания и ответа на терапию. По данным ряда авторов, лейкозный клон, в котором более 3% клеток находится в S-фазе, считается активно пролиферирующим, что, предположительно, можно связать с более высокой чувствительностью к определенным цитостатическим препаратам. Однако мы не выявили достоверной связи пролиферативной активности лейкозных клеток с ранним ответом на химиотерапию у больных детей с ОЛЛ.

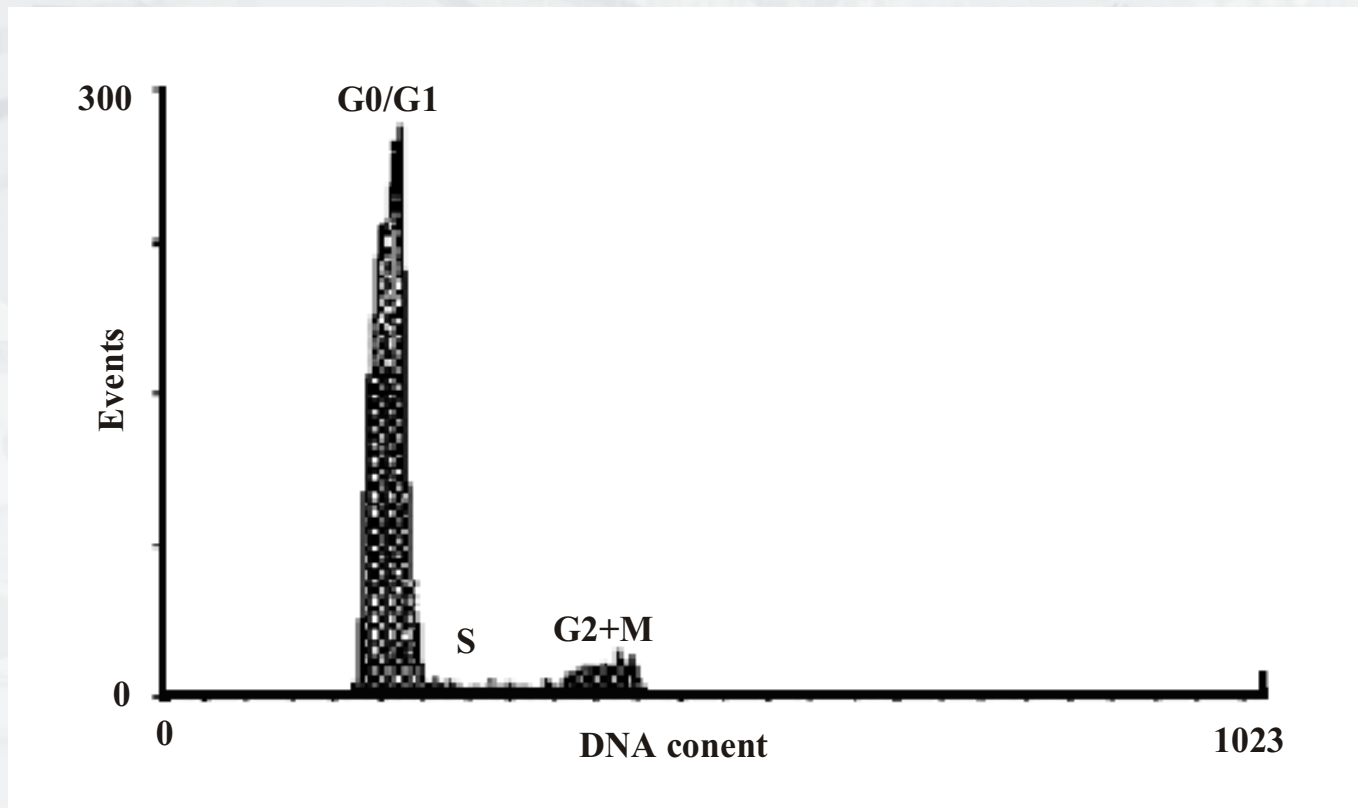


Рис. 2. Гистограмма распределения клеток в фазах клеточного цикла

## 2.2. Лекарственная чувствительность/устойчивость лейкозных клеток *in vitro* как критерий прогноза раннего ответа на терапию

Одной из причин неудач в лечении острых лейкозов является резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам. Устойчивость к цитостатикам может быть обусловлена различными причинами. Во-первых, она может быть сопряжена с повышенной экспрессией Р-гликопротеина и других белковых продуктов, способствующих выбросу из клетки антрациклинов и винкаалкалоидов; во-вторых, с недостаточной доставкой препарата к месту его действия. Биологическая резистентность может быть связана и с тем, что в определенные фазы клеточного цикла клетка оказывается невосприимчивой к действию цитостатических препаратов. Существует также резистентность повторного роста, заключающаяся в том, что клетки, обладая высокой степенью чувствительности к химиотерапии, имеют в то же время такой высокий пролиферативный потенциал, что цитотоксическое действие химиотерапии нивелируется размножением клеток, оставшихся в живых после действия цитостатического препарата. Биологической основой разнообразных механизмов лекарственной устойчивости являются изменения в геноме лейкозной клетки, приводящие к потере клеткой способности подвергаться апоптозу. Самым распространенным и наиболее подходящим для использования в клинических условиях методом определения лекарственной чувствительности является МТТ-тест, предложенный Т. Mosmann в 1983 г. Суть метода заключается в измерении способности исследуемых клеток превращать хорошо растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в нерастворимые кристаллы МТТ-формаза. Эффективность такого превращения отражает общий уровень дегидрогеназной активности исследуемых клеток и, в известных пределах, прямо пропорциональна концентрации живых (но не мертвых) клеток. Определенная с помощью этого метода медикаментозная чувствительность является итоговой на клеточном уровне.



Чувствительность к химиопрепаратам в зависимости от иммунофенотипа лейкемических клеток различна: common/пре-В-ОЛЛ → Т-ОЛЛ → про-В-ОЛЛ (рост резистентности по медиане). Установлена значимая корреляция между чувствительностью клеток при ОЛЛ к преднизолону, винкристину и аспарагиназе и трехлетней DFS ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,003$  и  $p < 0,001$  соответственно). Выявлена также корреляция между суммарной чувствительностью клеток к этим трем препаратам и трехлетней DFS ( $p < 0,001$ ).

Как правило, у детей с ОЛЛ наблюдается перекрестная резистентность бластных клеток *in vitro* к преднизолону и винкристину с аспарагиназой: низкая чувствительность к преднизолону всегда сочетается с низкой чувствительностью к этим препаратам. Объяснения подобной перекрестной резистентности к глюкокортикоидам и другим цитостатическим препаратам в настоящее время не известно. Возможно, она связана с общим снижением внутриклеточной кумуляции препаратов, с усилением процессов репарации клетки, с нарушениями в механизмах индуцированного апоптоза.

У детей, лейкозные клетки которых обладают высокой чувствительностью к преднизолону *in vitro*, отмечается хороший клинический ответ как на монотерапию преднизолоном, так и на комбинированную ПХТ. Они отличаются также более высокими показателями выживаемости ( $p < 0,001$ ). Таким образом, оценка чувствительности даже только к одному преднизолону дает информацию и о ближайших, и о долговременных результатах лечения.

Многофакторный анализ выявил независимую прогностическую значимость профиля лекарственной чувствительности/устойчивости при ОЛЛ, которая была самой точной ( $p < 0,001$ ) по сравнению с другими факторами: возрастом ( $p = 0,33$ ); фактором риска по BFM ( $p = 0,16$ ); иммунофенотипом ( $p = 0,09$ ); индексом ДНК ( $p = 0,97$ ).

Таким образом, определение лекарственной чувствительности лейкозных клеток *in vitro* может быть полезным при разработке новых критериев стратификации больных по группам риска и индивидуализации терапии при наличии лекарственной резистентности.

### **2.3. Апоптотические процессы в лейкозных клетках как фактор прогноза раннего ответа на терапию**

Апоптоз — это процесс генетически запрограммированной клеточной гибели, который является важным регуляторным механизмом поддержания нормального гомеостаза и развития тканей организма. Приобретенная устойчивость к апоптозу может приводить не только к развитию злокачественных заболеваний, но, как уже отмечалось выше, обуславливать резистентность опухолевых клеток к проводимой терапии.

Апоптоз инициируется внутриклеточными (спонтанный) и внешними (индуцированный) факторами, а также запускается при отсутствии постоянного воздействия внешних антиапоптотических стимулов. Точки приложения действия индукторов и ингибиторов апоптоза могут находиться на клеточной мембране, в цитоплазме, в ядре. Ответ на апоптотический стимул зависит от типа клетки, степени их дифференцировки, фазы клеточного цикла и других факторов. Клеточный ответ (деление, дифференцировка или гибель) регулируется продуктами онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста, из которых наиболее важными при лейкозах являются p53 и члены семейства Bcl-2. Практически каждая клетка содержит гены, кодирующие протеазы клеточной гибели (caspases), осуществляющие апоптоз, в том числе и индуцированный.

Апоптоз отражает способность организма элиминировать те или иные клетки. Генетические мутации индукторов апоптоза ведут к снижению уровня апоптоза опухолевых клеток, появлению химиорезистентности к препаратам, действующим через активацию этих генов.

При ОЛЛ спонтанный апоптоз лейкозных клеток можно наблюдать только после культивирования *in vitro*, при этом он обусловлен снижением питательных свойств и нехваткой ростовых факторов. Значимый уровень апоптоза ( $> 5\%$  клеток) выявляется методом проточной цитометрии примерно у половины больных (см. **рис. 3**). По данным флуоресцентной микроскопии, статистически значимые различия в уровне спонтанного апоптоза лейкозных клеток выявлены нами между Т-линейными и В-линейными ОЛЛ, а также между common В-ОЛЛ и пре-В-ОЛЛ, между common В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ ( $p < 0,05$ ). Уровень спонтанного апоптоза лейкозных клеток коррелирует с ранним ответом на химиотерапию. У детей с хорошим ранним ответом на 15-й день лечения спонтанный апоптоз лейкозных клеток в 1,6 раза выше, чем у детей с плохим ответом, и составляет соответственно  $41,1 \pm 4,4\%$  и  $26,7 \pm 4,1\%$ . При ранних В-линейных лейкозах высокая способность бластных клеток подвергаться спонтанному апоптозу определяет впоследствии длительную выживаемость.



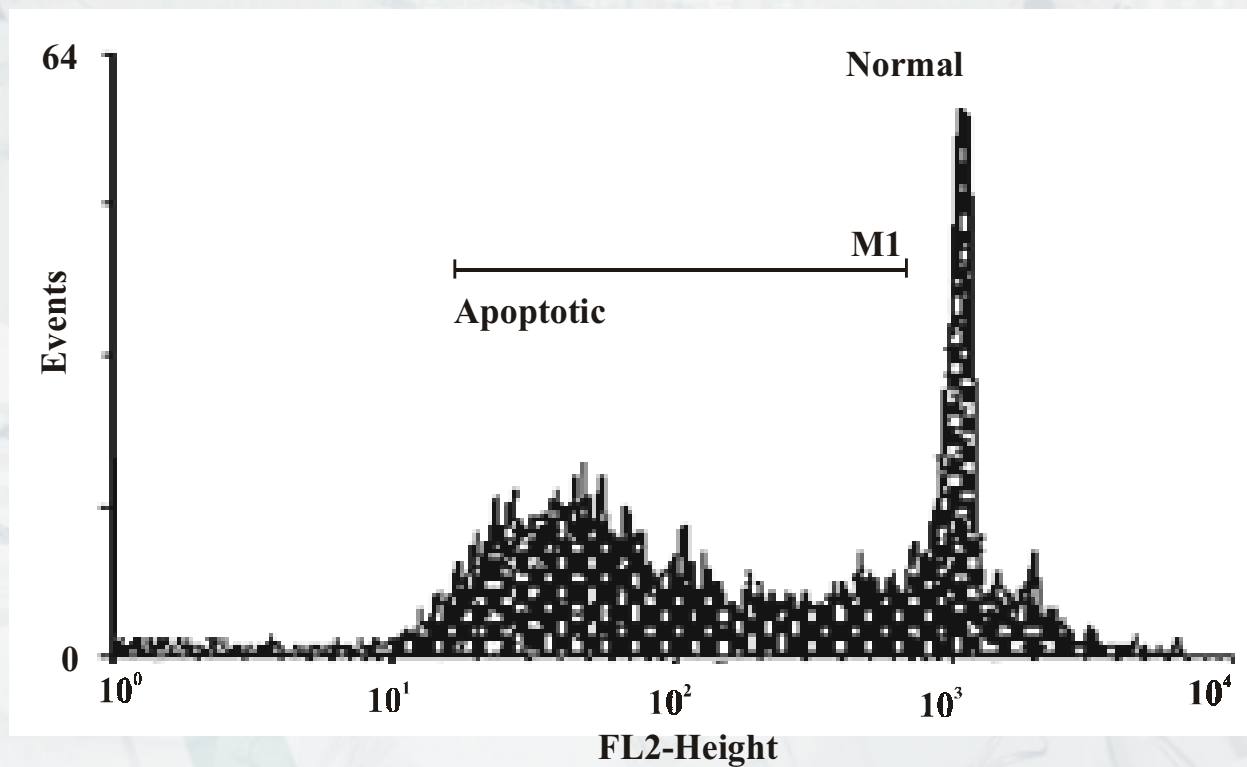


Рис. 3. Оценка содержания апоптотических (apoptotic) и жизнеспособных (normal) лейкозных клеток через 24 ч после культивирования *in vitro*

Как уже отмечалось выше, лекарственная чувствительность лейкозных клеток при ОЛЛ во многом зависит от пролиферативного пула и апоптотической фракции. Цитотоксическое действие большинства противоопухолевых препаратов реализуется путем индукции апоптоза независимо от конкретного механизма действия каждого из них. Нарушение клеточного цикла, вызванное лечением, может быть общим инициатором индуцированного апоптоза. Противоопухолевые препараты индуцируют апоптоз, используя те же пути, что и физиологические индукторы апоптоза: активацию гена p53, модуляцию генов семейства Bcl-2, индукцию экспрессии Fas-рецептора, активацию эффекторных протеаз и эндонуклеаз, блокирование рецепторов антиапоптотических и стимуляцию проапоптотических ростовых факторов. При этом многие исследования показывают, что химиотерапевтические средства индуцируют апоптоз чаще всего через Fas-независимые пути. Уровень индуцированного апоптоза после воздействия химиотерапевтических средств во многом зависит от исходного баланса проапоптотической и антиапоптотической регуляции.

Снижение индуцированного апоптоза приводит к устойчивости клеток к химиотерапевтическим препаратам, прогрессированию и неблагоприятному исходу заболевания. Во многих случаях ОЛЛ это ассоциируется с мутациями в проапоптотических генах, ведущими к их инактивации, а также с повышенной экспрессией антиапоптотических генов.

При ОЛЛ апоптотическая фракция клеток, как правило, не зависит от статуса пloidии и эупloidных аномалий кариотипа. Однако бластные клетки при ОЛЛ с набором хромосом от 51 до 65 отличаются значительной способностью подвергаться апоптозу, а также проявляют высокую чувствительность к противоопухолевым препаратам, что коррелирует с хорошими результатами лечения.

Таким образом, оценка апоптоза может быть более полезной, чем оценка пролиферативной активности лейкозных клеток по параметрам клеточного цикла. Измеряя процент апоптотических клеток *ex vivo* и/или после культивирования клеток *in vitro*, можно предопределить эффективность терапии.



### 3. СТРАТИФИКАЦИЯ ГРУПП РИСКА У ДЕТЕЙ С ОЛЛ

Анализ долгосрочного прогноза показывает, что наиболее значимыми прогностическими факторами являются: ранний ответ на терапию (количество бластов в костном мозге на 15-й день лечения), возраст больного, инициальный лейкоцитоз и генетические изменения лейкозных клеток. Проведенный анализ позволил нам предложить новую стратификацию групп риска при ОЛЛ у детей.

#### ***Группа низкого риска (LRG) \****

1. Хороший ответ на 15-й день.\*\*
2. В-линейный фенотип.
3. Возраст от 1 года до 10 лет.
4. Инициальный лейкоцитоз  $< 10\ 000/\text{мм}^3$ .
5. Гиперплоидия ( $> 50$  хромосом).
6. Наличие  $t(12;21)$  или гена TEL/AML1.

\*при отсутствии  $t(12;21)$  или TEL/AML1 наличие первых четырех параметров обязательно

\*\*хороший ответ на 15-й день — содержание бластов в костном мозге  $< 5\%$ .

#### ***Группа стандартного риска (SRG) \****

- 1 Ремиссия после завершения индукции.
2. Отсутствие  $t(9;22)$  или гена BCR/ABL.
3. Отсутствие перестроек с участием 1 lq23 или гена MLL.

\*наличие всех трех параметров обязательно

#### ***Группа высокого риска (HRG) \****

1. Отсутствие ремиссии после завершения индукции.

2. Наличие t(9;22) или гена BCR/ABL.

3. Наличие перестроек с участием 1 lq23 или гена MLL.

\*наличие хотя бы одного параметра позволяет отнести пациента к HRG

Нами применена новая стратификация групп риска у 308 больных детей с ОЛЛ, получавших лечение по протоколу BFM-90-M с 1.07.1990 г. по 31.12.1996 г. в соответствии со стратификацией BFM (табл. 3).

Таблица 3

*Сравнительные результаты новой стратификации групп риска у детей с ОЛЛ и BFM-стратификации*

Группы риска	BFM-стратификация (n)	Новая стратификация (n)	EFS		ППР* (n)	
			BFM	новая	BFM	новая
Низкого	67	100	0,75	0,82	52	84
Среднего	209	196	0,68	0,62	146	120
Высокого	32	12	0,24	0,17	8	2

Таким образом, с применением новой стратификации в группу низкого риска войдет большее число пациентов, для лечения которых потребуется менее интенсивная химиотерапия, что будет способствовать улучшению качества жизни ребенка и уменьшению стоимости лечения. В то же время терапия пациентов группы высокого риска, несмотря на использование коротких интенсивных блоков химиотерапии, дает крайне неудовлетворительные результаты. Возможно, в программу лечения этой категории больных необходимо включение ранней трансплантации костного мозга.



## I. МТТ-ТЕСТ (KASPERS G.J.L. et al., 1997)

1. Бластные клетки из костного мозга или периферической крови выделяют в градиенте плотности Histopaque-1077. После двукратной отмывки клетки помещают в концентрации 2 млн/мл в среду RPMI-1640 с добавлением 15% ЭТС, 2 ммоль глутамина, антибиотиков, а также 5 мкг/мл инсулина (0,5мкл/мл), 5 мкг/мл трансферрина и 5 нг/мл селенита натрия (1мкл/мл). На 1 микропланшету необходимо 5 мл среды.

2. Клеточную суспензию вносят по 80 мкл в 1-й ряд лунок микропланшеты, содержащих различные разведения тестируемых препаратов в объеме 20 мкл в дуплетах, и во 2-й ряд лунок, содержащих по 20 мкл физиологического раствора (контрольные лунки). 3-й ряд лунок содержит только среду (контроль среды).

3. Применяют следующие концентрации препаратов (с 10-кратным шагом + на высоких концентрациях — 2, 3, 5- кратным шагом в зависимости от препарата).

Для ОЛЛ: дексаметазон 0,0002–6 мкг/мл; преднизолон 0,03–600 мкг/мл; винкристин 0,001–50 мкг/мл; аспарагиназа 0,002–20 мкг/мл.

Для ОМЛ: доксорубин 0,00002–2 мкг/мл; цитозар 0,002–200 мкг/мл; этопозид 0,002–200 мкг/мл.

4. Микропланшеты помещают в инкубатор с 5% содержанием CO<sub>2</sub>, где они находятся 4 сут при температуре 37° С.

5. По истечении времени инкубации в каждую лунку добавляют по 10 мкл раствора МТТ (3–4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) с концентрацией 5 мг/мл. Инкубируют 5 ч.

6. Гранулы образовавшегося формазана растворяют кислым изопропанолом (0,1 N HCl, 10% SDS). В каждую лунку добавляют по 100 мкл изопропанола. Аккуратно ресуспендируют. Микропланшету и растворитель ставят в морозильник.

7. Оптическую плотность считывают на ридере (Sanofi Diagnostics Pasteur PR2100) при длине волны 540 нм.

8. Выживаемость клеток вычисляют по формулам:

$$ВК(\%) = (ОПо/ОПк) \times 100\%,$$

где ВК — выживаемость клеток; ОПо — оптическая плотность опытных лунок; ОПк — оптическая плотность контрольных лунок.

$$ВК(\%) = (Опо - ОПс / Опк - ОПс) \times 100\%,$$

где ОПс — оптическая плотность лунок, содержащих только среду.

9. Определяют величину полуметальной концентрации химиопрепарата (LC50), то есть, концентрацию, при которой гибнет 50% клеток.

## II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ СПОНТАННОГО АПОПТОЗА

### *А. Предварительная обработка образцов*

Клетки крови или костного мозга, а также среду для культивирования готовят так, как описано в п. I.1. К 1,5 мл среды добавляют взвесь клеток в концентрации 1,5 млн/мл. Инкубируют при  $t +37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере воздуха с 5%  $\text{CO}_2$ . Через 24 ч и 48 ч фиксируют и оценивают % апоптотических клеток как описано ниже.

### *Б. Метод флуоресцентной микроскопии (Dai J. et al., 1999)*

1. Клетки фиксируют в равном объеме 2% раствора параформальдегида в PBS. Инкубируют 30 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ .

2. Клетки отмывают от питательной среды, добавляют 1% раствор параформальдегида в PBS. Клетки в таком состоянии могут храниться в холодильнике.

3. Центрифугируют 7 мин (1500 об./мин), надосадок сливают.

4. Ресуспендируют в 25 мкл PBS.

5. К клеточной суспензии добавляют 1 мкл раствора, содержащего 100 мкг/мл акридинового оранжевого и 100 мкг/мл этидия бромида.

6. Апоптотические клетки учитывают с помощью флуоресцентного микроскопа (Люам) под увеличением  $\times 100$  раз с иммерсией. Живые и мертвые клетки дифференцируют по окраске (зеленая и красная соответственно). Апоптотические клетки определяют как живые с конденсированной структурой хроматина. Процент апоптотических клеток учитывают по отношению к живым клеткам.

### *В. Метод проточной цитометрии (Ormerod M.G., 1994)*

1. Клетки отмывают от среды.

2. Добавляют 1 мл PBS (теплый), хорошо ресуспендируют.



### *Стратификация групп риска у детей с острым лимфобластным лейкозом*

3. Центрифугируют 10 мин при 1000 об./мин.
4. Надосадок сливают, осадок мягко ресуспендируют в оставшейся капле.
5. По стенкам пробирки добавляют 1,5–2,0 мл 70% этанола (охлажденный до  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
6. Быстро закрывают пробкой и аккуратно перемешивают.
7. Приготовленные таким образом пробы хранятся при  $-20^{\circ}\text{C}$ .
8. Фиксированные клетки отмывают фосфатным буфером (PBS). Обработывают раствором РНК-азы (активность 150 ед./мл) 30 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ .
10. Клетки повторно отмывают фосфатным буфером, окрашивают раствором пропидиума иодида (50 мкг/мл) 30 мин при комнатной температуре.
12. Анализ проводят на проточном цитофлуориметре. Регистрируют процент гиподиплоидных (апоптотических) клеток.