

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

министра здравоохранения

\_\_\_\_\_ В.В. Колбанов

23 октября 2006 г.

Регистрационный № 170-1205

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РЕЦИДИВА  
ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ**

Инструкция по применению

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

Авторы: д-р мед. наук, проф. О.В. Алейникова, Н.В. Борисевич, канд. биол.  
наук Т.В. Шман, канд. биол. наук М.В. Белевцев, В.П. Савицкий, канд. биол.  
наук А.М. Кустанович, А.Н. Мелешко, В.В. Федосенко, И.П. Стасевич

## **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время сохраняется интерес исследователей к проблеме рецидивов острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), что связано, с одной стороны, с частотой их возникновения, а с другой – с результатами лечения детей, у которых развился рецидив заболевания. Рецидивам ОЛЛ принадлежит шестое место в структуре детских онкогематологических заболеваний. Они регистрируются у 25-30 % детей с ОЛЛ. Показатели выживаемости пациентов с рецидивом болезни значительно отличаются от показателей выживаемости больных ОЛЛ и, к сожалению, не превышают 22-35 %. Изучение прогностических факторов развития рецидива ОЛЛ остается актуальным из-за большой частоты рецидивов в группе пациентов стандартного риска, у которых не было каких-либо клинико-лабораторных признаков, предвещавших неблагоприятный исход болезни.

Различные авторы указывают, что 20-45 % случаев рецидивов ОЛЛ характеризуются отсутствием клинических проявлений, в результате чего, большое значение приобретает исследование биологии лейкозной клетки, которое позволит верифицировать рецидив болезни на очень ранних этапах.

До настоящего времени нет единого мнения о роли и частоте изменений иммунофенотипа, молекулярно-биологической и цитогенетической характеристики опухолевых бластов во время рецидива заболевания при сравнении с манифестацией ОЛЛ.

В последние годы возрос интерес к изучению лекарственной чувствительности, способности к апоптозу, пролиферативной активности лейкозных клеток во время рецидивирования ОЛЛ и их влияния на выживаемость детей с первыми рецидивами ОЛЛ.

Исследование и уточнение прогностических факторов для детей с рецидивами ОЛЛ позволит индивидуализировать терапию детей с рецидивами ОЛЛ и, следовательно, улучшить результаты лечения.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Исследование биологии лейкозной клетки в момент постановки диагноза рецидив ОЛЛ включает: иммунофенотипическую, цитогенетическую, молекулярно-биологическую характеристику, лекарственную чувствительность, спонтанный апоптоз, анализ фаз клеточного цикла, гены лекарственной устойчивости. Весь комплекс исследований проводится детям с рецидивом ОЛЛ в возрасте 0-18 лет.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ**

1. Проточный цитофлуориметр FACScan.
2. Микроскоп с флуорисцентной приставкой, цифровая камера с программным обеспечением.
3. Флуоресцентный микроскоп с увеличением x 1500 раз с масляной иммерсией.
4. Термоциклер, для полуколичественной оценки полученных результатов используется документирующая система с программным обеспечением.

## **ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Алгоритм исследования биологии лейкозной клетки.

Базовое исследование включает:

1. Иммунофенотипирование с использованием панели моноклональных антител, результат учитывается методом проточной цитофлуориметрии.
2. Цитогенетическое исследование методом краткосрочного культивирования с последующей дифференциальной G окраской метафазных хромосом.
3. Молекулярно-биологический анализ для выявления химерных онкогенов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

4. Лекарственная чувствительность опухолевых клеток к основным цитостатическим препаратам, применяемым во второй линии лечения, МТТ-тест.

5. Изучение апоптоза лейкемических клеток методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии.

6. Определение параметров клеточного цикла опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии.

7. Анализ экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости методом ПЦР.

### **Анализ прогностических факторов**

Учитывая основные факторы риска для детей с первыми рецидивами ОЛЛ, можно прогнозировать течение болезни, вероятность наступления второй ремиссии.

*1. Иммунофенотипические особенности опухолевых клеток в рецидиве ОЛЛ.*

Фактором прогноза, ухудшающим течение болезни, является Т-иммунологический вариант бластных клеток. Показатели общей выживаемости для детей с Т-линейным иммунофенотипом бластов во время рецидива ОЛЛ значительно ниже, чем для детей с В-линейным иммунофенотипом (6 % и 21 %).

Для детей с очень ранними рецидивами ОЛЛ, возникшими в течение первых 18 месяцев от момента постановки ОЛЛ, характерно преобладание Т-субтипов бластных клеток. Следует отметить, что только у 6 % детей с этим временным типом рецидива вероятна 5-летняя выживаемость.

Появление коэкспрессии миеломаркеров (CD13 и/либо CD33) на бластных клетках во время рецидива заболевания не ухудшает прогноз, так как частота выявления их не различается достоверно среди детей с различными временными типами рецидивов ОЛЛ.

*2. Цитогенетическая характеристика опухолевых клеток больных с рецидивами ОЛЛ.*

Для больных ОЛЛ установлено и изучено влияние хромосомных aberrаций:  $t(4;11)(q21;q23)$  и  $t(9;22)(q34;q11)$ , которые являются неблагоприятными прогностическими факторами. В рецидиве ОЛЛ указанные структурные нарушения кариотипа blastов сохраняются. При проведении стандартной противорецидивной терапии без трансплантации костного мозга длительность второй ремиссии у детей с описанными нарушениями кариотипа не превышает 0-3 месяцев.

У 64 % детей во время рецидива болезни появляются дополнительные структурные и/или числовые хромосомные aberrации, ухудшающие течение болезни, снижающие продолжительность второй ремиссии.

### *3. Молекулярно-биологическая характеристика бластных клеток.*

Молекулярно-биологическое исследование бластных клеток костного мозга детей с рецидивом ОЛЛ подтвердило сохранение таких химерных онкогенов, как BCR-ABL, MLL- AF4, TEL-AML1, E2A-PBX.

В анализируемой группе детей наиболее часто встречался BCR-ABL ген, аналог  $t(9;22)(q34;q11)$ , в 21 % случаев, тогда как при первичном заболевании ОЛЛ частота встречаемости его не превышала 2,3-5 % случаев.

Наличие данного химерного онкогена у пациента свидетельствует о неблагоприятном прогнозе течения болезни и требует проведения во второй линии лечения трансплантации костного мозга.

### *4. Лекарственная чувствительность опухолевых клеток и способность к апоптозу.*

Бластные клетки детей с рецидивами ОЛЛ характеризуются низкой лекарственной чувствительностью к кортикостероидным препаратам (дексаметазону и преднизолону), рубомицину, доксорубицину и цитозару.

Продолжительность второй ремиссии детей с рецидивом ОЛЛ зависит от лекарственной чувствительности (LC50, мкг/мл) к дексаметазону и преднизолону. Медианы лекарственной чувствительности к дексаметазону и преднизолону составили 3,1 и 43,7 мкг/мл. У детей с лекарственной чувствительностью опухолевых клеток ниже полученной медианы

продолжительность второй ремиссии была короче, чем у детей с показателями лекарственной чувствительности более высокими, чем установленная медиана.

Низкая лекарственная чувствительность к дексаметазону, рубомициту и цитозару отмечена у детей, не ответивших на индукционную терапию. Это дети, в костном мозге которых количество бластных клеток было более 5% после проведения 2 индукционных курсов полихимиотерапии. Таким образом, важным фактором неблагоприятного прогноза для пациентов с рецидивами ОЛЛ является снижение чувствительности клеток опухоли к глюкокортикоидным препаратам.

Установлено достоверное различие лекарственной чувствительности бластных клеток Т-линейной и В-линейной принадлежности к цитозару и вепезиду. Для детей с Т-линейным рецидивом ОЛЛ лекарственная чувствительность бластных клеток была ниже, чем для детей с В-линейным рецидивом ОЛЛ ко всем исследуемым препаратам, кроме кортикостероидных.

Способность к апоптозу бластных клеток детей с рецидивом ОЛЛ достоверно ниже, чем во время постановки диагноза ОЛЛ. Сравнительный анализ показателей выживаемости двух групп детей с рецидивом ОЛЛ: первая группа детей с более низкими значениями апоптоза, чем полученная медиана 20 %, и вторая – со значениями, превышающими медиану 20 %, - установил, что общая выживаемость первой группы составила 10 %, а второй группы – 18 %.

##### *5. Пролиферативная активность клеток опухоли, клеточный цикл.*

При рецидивах ОЛЛ у детей большее количество опухолевых клеток являются пролиферирующими, т.е. находятся в фазе синтеза (S-), премитотической (G2) и фазе митоза (M). В 2,7 раза увеличено количество бластных клеток, находящихся в S-фазе при рецидивах ОЛЛ по сравнению с первичным заболеванием.

Общая выживаемость детей с рецидивом ОЛЛ, чьи опухолевые клетки находились в S-фазе, превышающей полученную медиану 12 %, была ниже 18 %, чем детей с показателями клеточного цикла (S-фаза) ниже медианы – 39 %.

Таким образом, количество бластных клеток, находящихся в S-фазе, превышающей 12%, является неблагоприятным для детей с рецидивами ОЛЛ.

*б. Экспрессия гена MDR1 (ген лекарственной резистентности) опухолевыми бластами.*

Уровень экспрессии гена MDR1 бластными клетками в момент постановки диагноза ОЛЛ 0,8 условных единиц по отношению к уровню экспрессии нормального гена GAPDH и выше свидетельствует о повышенном риске развития рецидива заболевания у этих пациентов.

### **Неблагоприятные прогностические критерии для детей с рецидивами ОЛЛ у детей**

Критерии	Ухудшают результаты лечения
- Иммунофенотип бластов:	
Т	+
В	-
- Лекарственная чувствительность:	
Низкая	+
Высокая	-
- Спонтанный апоптоз:	
Высокий	-
Сниженный	+
- Пролиферативная активность:	
Высокая	
Низкая	+
- Наличие:	-
t (4;11)/MLL/AF4	+
t (9;22)/BCR/ABL	+

- не ухудшают

+ ухудшают