

DOI: 10.15690/onco.v2i2.1339

А.С. Фёдорова

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии
Минздрава РБ, Минск, Республика Беларусь

Клиническое значение и методы определения минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни при неходжкинских лимфомах у детей: обзор литературы

Несмотря на хорошие результаты лечения неходжкинских лимфом (НХЛ) у детей и более низкую токсичность современных версий терапевтических протоколов, частота рецидивов остается практически неизменной, и прогноз при возврате заболевания в большинстве случаев неблагоприятный. Одним из наиболее весомых предикторов развития рецидива может служить оценка минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни. Учитывая гетерогенность и относительную редкость НХЛ, необходимы крупные исследования для установления приоритетной мишени, метода ее определения, порога позитивности и контрольных точек исследования для каждого варианта НХЛ.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, дети.

(Для цитирования: Фёдорова А.С. Клиническое значение и методы определения минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни при неходжкинских лимфомах у детей: обзор литературы. *Онкопедиатрия*. 2015; 2 (2): 91–97. Doi: 10.15690/onco.v2i2.1339)

91

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на хорошие результаты лечения неходжкинских лимфом (НХЛ) у детей, прогноз при рецидиве заболевания в большинстве случаев неблагоприятный. Достигнутые в 90-х гг. прошлого столетия показатели выживаемости 75–90% в зависимости от стадии НХЛ и морфологическо-

го варианта не были улучшены в дальнейшем при использовании современных версий терапевтических протоколов, но позволили снизить токсичность лечения и минимизировать управляемую летальность [1–5]. Однако частота рецидивов практически не изменилась и составляет при разных нозологических формах от 5 до 30%. Современные

A.S. Fedorova

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Minimal Disseminated and Minimal Residual Disease Assessment in Childhood Non-Hodgkin Lymphomas: Reviewing Literature

In spite of good treatment results of childhood Non-Hodgkin lymphomas (NHL) and lower toxicity of current chemotherapy regimens relapse rate remains the same and prognosis after disease failure is mostly unfavorable. Minimal disseminated and minimal residual disease analysis may be useful as the strong predictor of lymphoma recurrence. Due to the rarity and heterogeneity of NHL large studies need to be performed to determine the priority target, the best method for its detection, positivity cut-off and timepoints for minimal disease assessment in every NHL type.

Key words: Non-Hodgkin lymphomas, children.

(For citation: Fedorova A.S. Minimal Disseminated and Minimal Residual Disease Assessment in Childhood Non-Hodgkin Lymphomas: Reviewing Literature. *Onkopediatria*. 2015; 2 (2): 91–97. Doi: 10.15690/onco.v2i2.1339)

исследования направлены на изучение эффективности и внедрение в клиническую практику новых химиотерапевтических, иммунных и таргетных препаратов, с одной стороны, и дальнейший поиск клинических и биологических факторов прогноза как предикторов прогрессии или рецидива заболевания — с другой.

Являются ли инициальное субмикроскопическое поражение костного мозга (КМ) или определяемые циркулирующие опухолевые клетки в периферической крови (ПК), называемые минимальной диссеминированной болезнью (МДБ), значимым фактором прогноза при НХЛ у детей? Имеет ли клиническое значение скорость элиминации лимфомных клеток из КМ и ПК в процессе лечения? Может ли МДБ или минимальная остаточная болезнь (МОБ) стать новым критерием стратификации и определить группу пациентов с неблагоприятным или, наоборот, благоприятным прогнозом? Какая мишень является возможной и оптимальной для каждого варианта НХЛ, каким методом и в каких временных точках на лечении ее целесообразно определять, а также какой уровень МОБ считать пороговым для позитивности? Учитывая гетерогенность и относительную редкость патологии, ответ на каждый из этих вопросов требует проведения многолетних мультицентровых исследований.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ДИССЕМНИРОВАННОЙ БОЛЕЗНИ И МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Основными методами определения МДБ и МОБ при НХЛ у детей являются проточная цитофлуориметрия (ПЦ), позволяющая установить aberrантный иммунофенотип лимфомных клеток; флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) для визуализации реаранжировок известных генов, а также качественная и количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) слитных/перестроенных генов и/или их транскриптов, в том числе с использованием пациентспецифичных праймеров (для определения клональных перестроек иммунорецепторов или реаранжировки *MYC-IgH*).

У каждого метода есть достоинства и недостатки: FISH — прост, доступен, но имеет весьма низкую чувствительность (до 10^{-3}), обусловленную прежде всего самим исследователем (точнее количеством посчитанных ядер). Чувствительность ПЦ и ПЦР существенно выше — до 10^{-4-6} . При сравнении чувствительности данных методик — четырехцветной ПЦ и ПЦР — с пациентспецифичными праймерами (VDJ-регион тяжелой цепи иммуноглобулина) было выявлено, что компонент сравним на ранних этапах терапии, однако в дальнейшем показатель становился выше, что связано с большей стабильностью молекулярных мишеней.

Полимеразная цепная реакция и проточная цитофлуориметрия

При острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) у детей определение количества лейкозных клеток в КМ на разных этапах полихимиотерапии (ПХТ) методами ПЦ или ПЦР доказало свое значение, и уровень МОБ при этом является независимым фактором прогноза и используется как критерий стратификации пациентов для редукции или интенсификации лечения (дополнительные введения антрациклинов или проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток) [6–9]. При ОЛЛ методом выбора детекции МОБ на этапе индукционной ПХТ является многоцветная ПЦ, чувствительность метода составляет 10^{-4} , а пороговым уровнем для благоприятного прогноза на 15-й день лечения считают 0,1% лейкозных клеток от миелокариоцитов КМ [10–12]. На более поздних этапах лечения ОЛЛ для мониторинга МОБ предпочтительнее использовать молекулярные методы [13].

К настоящему времени опубликованы результаты ряда исследований по анализу МДБ и МОБ при различных вариантах НХЛ у детей, однако группы пациентов немногочисленны, и полученные данные имеют больше методологическое значение и определяют направления для дальнейших исследований.

При лимфобластной лимфоме (ЛЛ) морфологический субстрат идентичен таковому при ОЛЛ, но фенотипически приблизительно 80% ЛЛ имеют Т-клеточное происхождение. При Т-ЛЛ морфологические признаки опухолевого поражения КМ выявляются у 20–30% пациентов, при В-ЛЛ — примерно у 10% [1, 2, 14]. Однако различия между лимфомными клетками и нормальными лимфоидными предшественниками нечеткие, что затрудняет диагностику диссеминированных форм. Субмикроскопически опухолевые клетки в КМ или ПК у пациентов с ЛЛ можно определять методами ПЦ и ПЦР, используемыми для мониторинга МОБ при ОЛЛ.

В исследовании Группы по детской онкологии (Children's Oncology Group, COG) методом ПЦ определены лимфомные клетки в КМ и ПК у 99 детей с Т-ЛЛ при постановке диагноза, а также в ПК 42 пациентов на этапах лечения [15]. В результате в 72% случаев в КМ были выявлены опухолевые клетки в количестве от 0,01 до 31,6% (медиана 0,22%) от всех мононуклеаров, в том числе у 68% пациентов со II–III стадиями заболевания. Пациенты получили лечение по протоколу COG A5971. Показатель 2-летней бессобытийной выживаемости (event-free survival, EFS) для всей анализируемой когорты составил 85%, в том числе 68% в группе пациентов с количеством лимфомных клеток в КМ $\geq 1\%$ (по данным ПЦ) и 91% у пациентов с меньшим уровнем МДБ ($p < 0,05$); EFS пациентов с количеством Т-лимфобластов в КМ $> 5\%$ составила всего 52% ($p < 0,01$). Рецидивы с поражением КМ или отличной от первичной локализации во всех 9 случаях

возникли у пациентов с уровнем МДБ в КМ > 0,1% ($p < 0,01$). Выявлена высокая конкордантность результатов в обеих точках — в КМ и ПК. У каждого пациента с поражением КМ определялись циркулирующие опухолевые клетки в ПК, а у 8 пациентов клетки Т-ЛЛ были выявлены в ПК, но не были обнаружены в КМ, что может свидетельствовать о преимуществе диагностики МДБ и возможности мониторинга МОБ на ранних этапах лечения по образцам крови. Исследование МОБ на этапе индукционной ХТ позволило выявить пациентов с низким клиренсом циркулирующих опухолевых клеток. На 28-й день индукции ремиссии клетки Т-ЛЛ определялись лишь у 2 из 42 пациентов в количестве 0,01%, у обоих в дальнейшем развился рецидив. Таким образом, МДБ при Т-ЛЛ методом ПЦ выявляется часто, более чем у 2/3 пациентов, и высокая степень диссеминации заболевания ассоциируется с повышенным риском развития рецидива. Эффективность COG A5971 ниже, чем у протоколов исследовательской группы BFM (Berlin-Frankfurt-Munster, Берлин-Франкфурт-Мюнстер) [1, 2], и выживаемость пациентов с IV стадией статистически значимо хуже, чем при II–III стадиях, что не позволяет однозначно интерпретировать МДБ как неблагоприятный прогностический фактор. Однако группа МДБ-негативных пациентов является прогностически благоприятной с потенциальным резервом для уменьшения интенсивности лечения.

В параллельно проведенном исследовании Stark и соавт. МДБ в КМ была оценена у 17 и МОБ у 10 детей с III стадией Т-ЛЛ методами четырехцветной ПЦ и ПЦР в реальном времени (с определением клональных реаранжировок генов *TCR β/δ/γ*) [16]. Пациенты получили лечение по протоколам BFM (NHL-BFM 90/95 EURO-LB 02) для группы промежуточного риска. В результате мишени для анализа МДБ/МОБ были найдены в 100% случаев. Клетки Т-ЛЛ в КМ были выявлены у всех пациентов хотя бы одним методом: 88% образцов КМ были МДБ-позитивными методом ПЦ и 80% — методом ПЦР; корреляция между двумя методами была статистически значимой ($r = 0,7$; $p < 0,01$). Не было выявлено прогностической значимости уровня МДБ, однако уровень МОБ более 0,05% на 33-й день лечения оставался только у одного пациента, у которого в последующем развился рецидив. Это исследование показало результативность обоих методов для анализа МДБ/МОБ при Т-ЛЛ и возможное прогностическое значение уровня МОБ при проведении лечения по высокоэффективным протоколам BFM.

При анапластической крупноклеточной лимфоме (АККЛ) современные терапевтические протоколы позволяют вылечить до 80% пациентов, однако частота рецидивов остается чрезвычайно высокой и составляет от 25 до 35% [4, 5]. Более 95% случаев АККЛ у детей являются *ALK*-позитивными, экспрессируя ген тирозинкиназы анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, *ALK*),

из которых примерно в 90% определяется экспрессия химерного гена *NPM-ALK* — продукта транслокации $t(2;5)(p23;q35)$ [17]. Морфологически поражение КМ диагностируется примерно у 10% пациентов, а молекулярными методами лимфоциты, экспрессирующие *NPM-ALK*, определяются в КМ или ПК у 50–60% пациентов с *NPM-ALK*-позитивной АККЛ [14, 17–19].

В пионерском по МДБ исследовании Итальянской ассоциации детских гематологов и онкологов (Associazione Italiana di Emato-Oncologia Pediatrica, AIEOP) субмикроскопическое поражение КМ оценивали у детей с АККЛ, получивших лечение по протоколам BFM 90/95 и LNH 92/97 [17]. Экспрессия *NPM-ALK* методом качественной гнездной ПЦР (чувствительность до 10^{-6}) и ПЦР в реальном времени в КМ была выявлена в 25 (61%) случаях из 41. Детекция МДБ коррелировала с поражением средостения и при однофакторном анализе была единственным фактором неблагоприятного прогноза в плане высокого риска развития рецидива. Показатель 5-летней свободной от прогрессирования выживаемости (progression-free survival, PFS) составил 41% для пациентов с определяемым в КМ транскриптом и 100% у МДБ-негативных пациентов, которые составили группу детей с хорошим прогнозом.

Результаты исследования группы BFM созвучны с полученными AIEOP данными [18]. Экспрессия *NPM-ALK* в КМ и/или ПК была выявлена у 38 (48%) из 80 пациентов, получивших лечение по протоколам NHL-BFM95 и ALCL99. Частота рецидивов составила 50% в группе МДБ-позитивных и 15% в группе МДБ-негативных пациентов ($p < 0,01$). В отличие от результатов AIEOP в данном исследовании была выявлена корреляция между уровнем транскрипта и риском развития рецидива, что может быть объяснено различными методологиями проведения количественной ПЦР. При уровне *NPM-ALK* в КМ до начала лечения более 10 нормализованного числа копий (normalised copy numbers, NCNs) частота рецидивов была значительно выше (71 против 18%; $p < 0,01$), и они наступали раньше (медиана наступления рецидива/прогрессирования 0,4 против 6,5 мес после окончания интенсивной ПХТ; $p < 0,01$) в сравнении с группой с более низким уровнем транскрипта в КМ. В результате уровень МДБ > 10 NCNs *NPM-ALK* в КМ/ПК являлся единственным независимым фактором высокого риска развития рецидива ($p < 0,05$). Таким образом, проведение количественной ПЦР (чувствительность 10^{-5}) в 70% случаев позволяет уже на этапе диагностики определить группу пациентов (около 20%) с риском развития рецидива. Прогностически благоприятной (показатели EFS 95% и OS 100%) является группа пациентов (около 30%) с МДБ-негативным статусом и общим гистологическим вариантом (common type).

В дальнейшем объединенное исследование итальянской и немецкой групп позволило на

достаточно большей когорте пациентов ($n = 180$) с *NPM-ALK*-позитивной АККЛ подтвердить неблагоприятное прогностическое значение МДБ и изучить влияние МОБ на исход заболевания [19]. Показатели 5-летней общей выживаемости (overall survival, OS) и EFS для всей группы составили 84 и 65%, соответственно; частота рецидивов — 32%. Методом ПЦР в реальном времени МДБ в КМ и/или ПК была выявлена у 57% пациентов, у которых частота рецидивов составила 46% ($p < 0,001$), а 5-летняя EFS — 51% ($p < 0,0001$). Уровень МОБ перед вторым курсом ПХТ определяли у 52 МДБ-позитивных пациентов. В результате детектируемая МОБ коррелировала с отличным от обычного (not common) гистологическим вариантом и являлась самым весомым независимым фактором неблагоприятного прогноза (5-летняя OS 65 против 91%; HR 6,00; $p = 0,01$). Частота рецидивов составила 81% в группе МДБ/МРБ-позитивных пациентов, 31% — в группе МДБ-позитивных/МРБ-негативных пациентов, 15% — в группе МДБ-негативных пациентов ($p < 0,001$). Результаты этого исследования предполагают превалирующее неблагоприятное значение низкого клиренса циркулирующих опухолевых клеток над статусом МДБ. Еще на этапе индукционной ПХТ можно выявить группу (около 20%) пациентов с очень высоким (примерно 80%) риском прогрессии или развития рецидива.

В небольшом исследовании чешских авторов во всех образцах КМ в случаях рецидива АККЛ или перед рецидивом были выявлены *NPM-ALK* и CD30 [20]. Однако экспрессия CD30 не может использоваться для мониторинга МОБ: только в двух случаях рецидив сопровождался повышенным уровнем экспрессии CD30 (ПЦР в реальном времени) в сравнении с детектируемым в КМ и ПК здоровых людей.

Таким образом, все исследования показали высокий процент выявления признаков МДБ при АККЛ. Высокая конкордантность результатов качественной и количественной ПЦР в КМ и ПК предполагает, что по аналогии с Т-ЛЛ позитивность в КМ отражает больше циркуляцию опухолевых клеток, чем истинное микрометастазирование, как при солидных опухолях.

Оценка антительного ответа

Молекулярные методы являются приоритетными, но не единственными для анализа МДБ и МОБ при АККЛ. Было проведено исследование, в котором параллельно методами ПЦ (опухолевый фенотип *ALK+ CD30+*) и количественной ПЦР определяли клетки АККЛ в КМ и ПК у 11 пациентов с *NPM-ALK* положительной АККЛ, и была показана высокая конкордантность результатов [21]. Метод ПЦ показал свою высокую специфичность, так как оба маркера (*ALK* и *CD30*) одновременно не экспрессируются здоровыми гемопоэтическими клетками. Метод ПЦ дешевле, требует меньше

времени, менее трудоемкий и позволяет избежать работы с достаточно нестабильной РНК, но он менее чувствительный, минимум на 1 log меньше, чем ПЦР. Результаты предполагают, что 20 NCNs *NPM-ALK* соответствуют $1 \cdot 10^{-4}$ *ALK+ CD30+* клеток. Но как было показано выше, минимальная чувствительность, необходимая для идентификации пациентов с очень высоким риском развития рецидива, составляет 10 NCNs *NPM-ALK*. Также клетки АККЛ в пределах одной опухоли могут иметь разный уровень экспрессии *ALK* и *CD30* и приводить к ложноотрицательным результатам. С другой стороны, число копий mRNA *NPM-ALK* в пределах одной опухолевой клетки может отличаться у разных пациентов, что может быть причиной разных результатов между ПЦР и ПЦ. Каким методом определение количества опухолевых клеток более объективно отражает высокий риск развития рецидива — пока не известно и требует дальнейшего исследования.

Проблемой при АККЛ является мониторинг МОБ в *ALK*-положительных случаях с вариантными транслокациями, суммарно не превышающими у детей 10%, или при *ALK*-негативных АККЛ. Циркулирующие лимфомные клетки *ALK*-негативным пациентам можно определять методом ПЦ с использованием моноклональных антител анти-CD30 и анти-*ALK* (опухолевый фенотип *CD30+ ALK-*).

АККЛ — идеальная модель для изучения опухолево-специфичного иммунного ответа. Установлено, что гиперэкспрессия *ALK* может индуцировать аутоиммунную реакцию с выработкой анти-*NPM-ALK* антител у пациентов с *ALK*-позитивной АККЛ. В исследовании Mussolin и соавт. проводилась оценка уровня анти-*ALK* антител при постановке диагноза и после окончания лечения у 28 пациентов с *ALK*-позитивной АККЛ, получивших лечение по протоколу ALCL99, и изучалась возможная корреляция с МРБ статусом [22]. Циркулирующие антитела были выявлены в 89,3% образцов крови, признаки МДБ — в 54%. Уровень МДБ в крови > 10 NCNs *NPM-ALK* и титр анти-*ALK* антител $\leq 1/2250$ ассоциировались с более высокой частотой рецидивов (63 против 15% для остальных пациентов; $p < 0,05$). На момент окончания лечения МОБ стала отрицательной у всех пациентов, кроме двоих, в то время как уровень антител был очень разным. У 7 из 8 пациентов с рецидивом титр антител снизился $\leq 1/100$ к окончанию лечения и не достиг при рецидиве инициального уровня при постановке первичного диагноза. А большинство пациентов (14 из 20), у которых не наступил рецидив, поддерживали высокий титр антител. Результаты данного исследования свидетельствуют, что анти-*ALK* антитела определяются в большинстве случаев *NPM-ALK*-позитивных АККЛ. Предположительно, титр и кинетика анти-*NPM-ALK* антител также являются прогностическими маркерами, и совместная оценка антительного ответа и МОБ может улучшить

идентификацию пациентов с плохим прогнозом. В следующей работе Mussolin и соавт. было изучено прогностическое значение МДБ и анти-*ALK* иммунного ответа на момент диагностики, и оценено их значение для стратификации по группам риска 128 пациентов с АККЛ [23]. В этой когорте МДБ была позитивной у 59% пациентов, у 96% определялся титр анти-*ALK* антител. В зависимости от МДБ-статуса и титра анти-*ALK* антител пациенты были разделены на группы высокого (МДБ+/анти-*ALK* $\leq 1/750$; 20% пациентов), низкого (МДБ-/анти-*ALK* $> 1/750$; 31% пациентов) и промежуточного (все остальные пациенты) риска. Показатель PFS составил 28; 68 и 93% ($p < 0,0001$), а показатели OS — 71, 83 и 98% ($p < 0,05$) у пациентов группы высокого, промежуточного и низкого риска, соответственно. В результате многофакторного анализа отнесение к группе высокого риска было самым весомым независимым фактором неблагоприятного прогноза. Результатами данного исследования может быть оправдана стратификация пациентов на группы риска в зависимости от МДБ-статуса и титра анти-*ALK* антител.

В аналогичном исследовании Ait-Tahar K. и соавт. анти-*ALK* антитела были обнаружены у 87/95 (92%) пациентов с АККЛ [24]. Была выявлена обратная корреляция между титром антител и стадией, а также количеством циркулирующих опухолевых клеток: I–II стадия у 45% пациентов с высоким титром антител, у 15% — со средним и низким титром ($p < 0,01$). Кроме продвинутой стадии низкий титр антител ассоциировался также с поражением структур средостения и висцеральных органов ($p = 0,01$). Причем титр антител у девочек был выше, чем у мальчиков ($p < 0,05$). Также была выявлена обратная корреляция между титром антител, статусом и уровнем МДБ ($p < 0,05$). У всех пациентов с высоким титром антител уровень МДБ был < 10 NCNs *NPM-ALK* ($p = 0,001$). Высокие титры антител коррелировали также с низкой частотой рецидивов. Так, при очень высоком титре ($\geq 1/60\ 750$; $n = 29$) кумулятивная частота рецидивов составила 11%, при низком ($\leq 1/750$; $n = 27$) — 63% ($p < 0,001$), а показатели EFS — 89 и 33%, соответственно. Результаты этого исследования клинически подтвердили, что выраженный иммунный ответ на онкоантиген *ALK* может предотвращать лимфомную диссеминацию и снижает риск развития рецидива.

ПЦР длинных фрагментов

При лимфоме/лейкозе Беркитта патогенетической является транслокация между протоонкогеном *c-MYC* (8q24) и геном одной из цепей иммуноглобулина (Ig). В 70–80% случаев выявляется хромосомная транслокация $t(8;14)(q24;q32)$, при которой *c-MYC* переносится на тяжелую цепь иммуноглобулина IgH (14q32). Рearанжировка *MYC-IgH* является высокоспецифичной мишенью для оценки циркулирующих клеток и может быть выявля-

на методом ПЦР длинных фрагментов (ПЦР-ДФ) [25–28]. Однако положения точек разрыва на хромосомах в гене *c-MYC* и различных генах Ig очень рассеяны и индивидуальны для каждого пациента. Таким образом, перестройка *c-MYC/IgH* является также пациентспецифичным опухолевым молекулярным маркером, который может быть использован для определения МДБ и МОБ при лимфоме/лейкозе Беркитта.

В исследовании AIEOP реаранжировка *MYC-IgH* методом ПЦР-ДФ (чувствительность 10^{-3-4}) была выявлена в КМ у 12 (36%) из 33 пациентов с лимфомой Беркитта без морфологических признаков поражения КМ при постановке диагноза [26]. В дальнейшем проспективном исследовании проводился анализ прогностического значения МДБ при лимфоме Беркитта высокого риска [27]. Рearанжировка *MYC-IgH* была выявлена в 96 (72%) случаях ЛБ из 134. Морфологически поражение КМ было выявлено у 18% пациентов, в то время методом ПЦР-ДФ — у 31%. 85% МДБ-положительных пациентов относились к группе высокого риска (R4, согласно стратификации NHL-BFM95/2004). Пациенты получили лечение по протоколу итальянской модифицированной версии этого протокола AIEOP LNH-97. Показатель 3-летней PFS в группе риска R4 составил 68% для МДБ-позитивных и 93% для МДБ-негативных пациентов ($p < 0,05$). При многофакторном анализе МДБ-позитивный статус был единственным независимым фактором неблагоприятного прогноза (HR 4,7; $p < 0,05$). Таким образом, и при лимфоме Беркитта в группе высокого риска определение МДБ позволяет выявить группу пациентов с неблагоприятным прогнозом и, вероятно, может быть использовано как критерий для модификации терапии.

Теми же исследователями было установлено, что при лейкозе Беркитта мониторинг МОБ на ранних этапах терапии также позволяет определить пациентов с высоким риском развития рецидива [29]. Из 68 пациентов, получивших лечение по протоколу LNH-97, у 69% была выявлена $t(8;14)(q24;q32)$ методом ПЦР-ДФ. Все пациенты достигли ремиссии и большинство (31 из 39) стали МОБ-негативными после первого курса ПХТ. Показатель 3-летней безрецидивной выживаемости (relapse-free survival, RFS) составил 38% у МОБ-позитивных и 84% у МОБ-негативных пациентов ($p < 0,001$). При многофакторном анализе положительный результат МОБ после первого курса ПХТ являлся независимым фактором высокого риска развития рецидива (HR 6,95; $p < 0,01$).

ПЦР в реальном времени

Так как ПЦР-ДФ может быть использован для определения МДБ/МОБ только примерно у 70% пациентов с лимфомой/лейкозом Беркитта, необходим альтернативный метод, основанный в данном случае на определении клональных

реаранжировок генов иммуноглобулинов, которые являются универсальными мишенями при В-клеточных неоплазиях [30, 31]. В исследовании AIEOP определяли клональные реаранжировки гена Ig методом ПЦР в реальном времени [параллельно с ПЦР-ДФ для t(8;14)] у 36 пациентов с лейкозом Беркитта и у 19 с лимфомой Беркитта. В результате хотя бы одна чувствительная мишень для МДБ/МОБ была выявлена в 84% случаев лейкоза и 95% при лимфоме Беркитта [32]. Чувствительность метода составила 10^{-4} для 88% мишеней. Все мишени, идентифицированные при первичной диагностике, определялись также во всех 4 случаях рецидивов. В сравнении с ПЦР-ДФ этот метод более трудоемкий и дорогостоящий, но он может быть использован при лимфоме Беркитта без t(8;14), а также является количественным, с большей чувствительностью, что также важно для мониторинга минимальной болезни. При сравнении двух молекулярных методов в этом исследовании в большинстве случаев были получены конкордантные результаты по оценке МОБ. Только в одном случае лейкоза и в 2 случаях лимфомы Беркитта были получены положительные результаты МОБ методом реаранжировок и отрицательные — методом ПЦР-ДФ.

Определение клональных реаранжировок генов иммуноглобулинов

В исследовании COG оценка МДБ и МОБ (после окончания индукции и лечения) методом опреде-

ления клональных реаранжировок генов Ig проводилась у 32 пациентов с III–IV стадиями лимфомы Беркитта группы промежуточного риска, получивших лечение по протоколу FAB/LMB96 [33]. В результате признаки МДБ были выявлены в ПК и/или КМ у всех (100%) пациентов. У двоих пациентов, у которых развился рецидив, МОБ была положительной после индукции или после завершения ПХТ. Аналогичные данные получены в исследовании Agsalda и соавт. [34]. Рецидив наступил у 2 из 14 пациентов, которые оставались МОБ-положительными после 2 мес лечения.

Представленные результаты свидетельствуют, что, аналогично ОЛЛ и АККЛ, стратификация пациентов на группы риска с учетом статуса МДБ/МОБ может быть клинически оправдана также и при лимфоме/лейкозе Беркитта, и может быть использована в дизайне новых терапевтических протоколов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в данной статье результаты исследований демонстрируют возможность оценки и мониторинга минимальной болезни для большинства пациентов детского возраста с НХЛ и ее клиническую значимость как фактора прогноза развития раннего рецидива.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Reiter A., Schrappe M., Ludwig W.D. et al. Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: A BFM group report. *Blood*. 2000; 95: 416–421.
- Burkhardt B., Woessmann W., Zimmermann M. et al. Impact of cranial radiotherapy on central nervous system prophylaxis in children and adolescents with central nervous system-negative stage III or IV lymphoblastic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 491–499.
- Patte C., Auperin A., Gerrard M. et al. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood*. 2007; 109: 2773–2780.
- Le Deley M.-C., Reiter A., Williams D. et al. Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study. *Blood*. 2008; 111: 1560–1566.
- Le Deley M.-C., Rosolen A., Williams D. et al. Vinblastine in children and adolescents with high-risk anaplastic large-cell lymphoma: results of the randomized ALCL99-vinblastine trial. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3987–3993.
- Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008; 111: 5477–5485.
- Shultz K., Pullen D.J., Sather H., Shuster J. et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007; 109: 926–935.
- Davies S., Borowitz M., Rosner G., Ritz K. et al. Pharmacogenetics of minimal residual disease response in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*. 2008; 111: 2984–2990.
- Popov A.M., Verzhbitskaia T.Yu., Tsauro G.A. et al. Minimal residual disease monitoring by simplified flow cytometry assay in children with pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia: advantages and limitations. *Haematopoiesis Immunology*. 2010; 2: 21–28.
- Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5168–5174.
- Ratei R., Basso G., Dworzak M. et al. Monitoring treatment response of childhood precursors B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with

- multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia*. 2006; 20: 1422–1429.
12. Grivtsova L., Popa A., Serebryakova I., Tupitsyn N. To further standartization in detection of residual blasts in bone marrow of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia on day 15 of induction therapy. *Haematopoiesis Immunology*. 2011; 1: 36–54.
 13. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G. et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008; 22: 771–782.
 14. Sandlung J., Downing J., Crist W. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *N Engl J Med*. 1996; 334: 1238–1248.
 15. Coustan-Smith E., Sandlung J.T., Perkins S.L. et al. Minimal disseminated disease in childhood T-cell lymphoblastic lymphoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 3533–3539.
 16. Stark B., Avigad S., Luria D. et al. Bone marrow minimal disseminated disease (MDD) and minimal residual disease (MRD) in childhood T-cell lymphoblastic lymphoma stage III, detected by flow cytometry (FC) and real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR). *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 52: 20–25.
 17. Mussolin L., Pillon M., d'Amore E.S. et al. Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2005; 19: 1643–1647.
 18. Damm-Welk C., Busch K., Burkhardt B. et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2007; 110: 670–677.
 19. Damm-Welk C., Mussolin L., Zimmermann M. et al. Early assessment of minimal residual disease identifies patients at very high relapse risk in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2014; 123: 334–337.
 20. Kalinova M., Krskova L., Brizova H. et al. Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma — residual disease monitoring and a correlation with the disease status. *Leuk Res*. 2008; 32: 25–32.
 21. Damm-Welk C., Schieferstein J., Schwalm S. et al. Flow cytometric detection of circulating tumour cells in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma: comparison with quantitative polymerase chain reaction. *Br J Haematol*. 2007; 138: 459–466.
 22. Mussolin L., Bonvini P., Ait-Tahar K. et al. Kinetics of humoral response to ALK and its relationship with minimal residual disease in pediatric ALCL. *Leukemia*. 2009; 23: 400–402.
 23. Mussolin L., Damm-Welk C., Pillon M. et al. Use of minimal disseminated disease and immunity to NPM-ALK antigen to stratify ALK-positive ALCL patients with different prognosis. *Leukemia*. 2013; 27: 416–422.
 24. Ait-Tahar K., Damm-Welk C., Burkhardt B. et al. Correlation of the autoantibody response to the ALK oncoantigen in pediatric anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with tumor dissemination and relapse risk. *Blood*. 2010; 115: 3314–3319.
 25. Busch K., Borkhardt A., Wosmann W. et al. Combined polymerase chain reaction methods to detect c-myc/IgH rearrangement in childhood Burkitt's lymphoma for minimal residual disease analysis. *Haematologica*. 2004; 89: 818–825.
 26. Mussolin L., Basso L., Pillon M. et al. Prospective analysis of minimal bone marrow infiltration in pediatric Burkitt's lymphomas by long-distance polymerase chain reaction for t(8;14)(q24;q32). *Leukemia*. 2003; 17: 585–589.
 27. Mussolin L., Pillon M., d'Amore E.S. et al. Minimal disseminated disease in high-risk Burkitt's lymphoma identifies patients with different prognosis. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1779–1784.
 28. Akasaka T., Muramatsu M., Ohno H. et al. Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood*. 1996; 88: 985–994.
 29. Mussolin L., Pillon M., Conter V. et al. Prognostic role of minimal residual disease in mature B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 5254–5261.
 30. Sabesan V., Cairo M.S., Lones M.A. et al. Assessment of minimal residual disease in childhood non-Hodgkin lymphoma by polymerase chain reaction using patient-specific primers. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003; 25: 109–113.
 31. Schreuder M., Hoeve M., Groothuis L. et al. Monitoring gastric lymphoma in peripheral blood by quantitative IgH allele-specific oligonucleotide real-time PCR and API2-MALT1 PCR. *Br J Haematology*. 2005; 131: 619–623.
 32. Lovisa F., Mussolin L., Corral L. et al. IGH and IGK gene rearrangements as PCR targets for pediatric Burkitt's lymphomas and mature B-ALL MRD analysis. *Lab Invest*. 2009; 89: 1182–1186.
 33. Shiramizu B., Goldman S., Kusao I. et al. Minimal disease assessment in the treatment of children and adolescents with intermediate-risk (stage III/IV) B-cell non-Hodgkin lymphoma: a Children's Oncology Group report. *Br J Haematol*. 2011; 153: 758–763.
 34. Agsalda M., Kusao I., Troelstrup D. et al. Screening for residual disease in pediatric Burkitt lymphoma using consensus primer pools. *Adv Hematol*. 2009; 2009: 412163.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Фёдорова Алина Степановна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинических исследований научного отдела Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии МЗ РБ

Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, д. 43,

тел.: +375 (17) 265-40-98, **e-mail:** alina_fedorova@list.ru