

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ДЛЯ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА ПРОТОКОЛЕ ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ)

Н.Н. Савва, О.В. Красько, М.В. Белевцев, В.П. Савицкий, Н.В. Мигаль, О.В. Алейникова
Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, Беларусь

Контакты: Наталья Николаевна Савва nsavva@mail.ru

В исследование включены 220 детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), лечившихся по протоколу ОЛЛ-МБ-2002. Минимальную остаточную болезнь (МОБ) оценивали в костном мозге методом трехцветной проточной цитофлуориметрии на 15-й ($n=99$) и 36-й ($n=107$) дни и перед началом поддерживающей терапии ($n=60$). Установлено, что одним из неблагоприятных факторов, статистически достоверно (log-rank-тест; $p<0,05$) ухудшающих безрецидивную выживаемость, является наличие положительного уровня МОБ на 36-й день ($\geq 0,01\%$). В мультифакторном анализе (Кокс-регрессия) выявлено, что положительный уровень МОБ на 36-й день – самый сильный и независимый прогностический фактор, влияющий на вероятность развития рецидива (hazard ratio 6,6; $p=0,031$). Обоснована необходимость введения дополнительной стратификации пациентов на терапевтические группы с учетом уровня МОБ после индукционной терапии.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, дети, острый лимфобластный лейкоз, прогноз, безрецидивная выживаемость

MINIMAL RESIDUAL DISEASE PROGNOSTIC VALUE FOR RELAPSE-FREE SURVIVAL OF CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATING ACCORDING TO ALL-MB-2002 PROTOCOL (MONOFACTIRIAL AND MULTIFACTIRIAL ANALYSIS)

N.N. Savva, O.V. Kras'ko, M.V. Belevtcev, V.P. Savitskiy, N.V. Migal, O.V. Aleinikova
Republic Centre for Paediatric Oncology and Haematology, Minsk, Belarus

220 children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) treated according to ALL-MB-2002 protocol are included in the study. Minimal residual disease (MRD) estimated in bone marrow by three-color flow cytometry on day 15 ($n=99$), day 36 ($n=107$) and before the maintenance therapy ($n=60$). Day 36 positive MRD level ($\geq 0.01\%$) as one of unfavorable factors statistically significant worsening of relapse-free survival was revealed (log-rank test; $p<0.05$). In multifactorial analysis (Cox regression) it is revealed that positive MRD level on day 36 of treatment is the strongest and independent prognostic factor influencing relapse probability (hazard ratio 6.6; $p=0.031$). Necessity of additional patients' stratification introduction according to MRD level after induction is proved.

Key words: minimal residual disease, children, acute lymphoblastic leukemia, prognosis, relapse-free survival

Введение

Современные успехи в лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей достигнуты благодаря эффективной полихимиотерапии (ПХТ), базирующейся на стратификации пациентов на группы риска. Ведущей проблемой, влияющей на бессобытийную выживаемость (БСВ) при ОЛЛ, являются рецидивы заболевания, в основе развития которых лежит нерадикальная элиминация опухолевого клона [1]. Динамика количества опухолевых клеток в костном мозге (КМ) и периферической крови (ПК) во время индукционной терапии и после ее проведения является важной информацией, отражающей ответ на терапию и риск возникновения рецидива [2, 3]. Один из основных критериев достижения ремиссии при ОЛЛ – $<5\%$ бластных клеток в КМ при морфологическом исследовании, при том что в КМ может присутствовать до 10^{10} лейкоэмических бластов, выявляемых только субмикроскопически проточной цитофлуориметрией (ПЦФ) или методами молекулярной генетики (минимальная остаточная болезнь –

МОБ) [2, 4]. В настоящее время показано, что ответ на терапию, оцениваемый субмикроскопически, является более значимым прогностическим фактором, чем «морфологический» ответ. У больных, достигших «морфологической» ремиссии, но имеющих МОБ после индукционной терапии (МОБ-положительные пациенты), высока ($>80\%$) вероятность развития рецидива [5–8]. Само наличие МОБ после этапа индукции ремиссии является независимым прогностически неблагоприятным фактором, который уже начал использоваться как дополнительный критерий стратификации для определения тактики противоопухолевого лечения [5, 6]. С другой стороны, исследование МОБ – метод, требующий достаточных затрат, особенно если для этой цели используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) для анализа химерных онкогенов или реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора (IgH/TCR) [9]. Показано, что для оценки МОБ при ОЛЛ по чувствительности и сопоставимости результатов метод трехцветной ПЦФ может использоваться как альтернативный и

более доступный, чем ПЦР [9, 10]. Цель данной работы – оценка прогностической значимости МОБ для безрецидивной выживаемости (БРВ) детей, получавших лечение согласно протоколу ОЛЛ-МБ-2002, и обоснование целесообразности использования дополнительной стратификации пациентов, основанной на определении МОБ, для дальнейшего улучшения результатов лечения ОЛЛ.

Материалы и методы

Всего в исследование включены 220 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с ОЛЛ (124 мальчика, 96 девочек), получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МБ-2002 с 2004 г., период наблюдения – от 3 мес от 4,5 года. МОБ оценивалась в КМ больных ОЛЛ методом трехцветной ПЦФ с чувствительностью 1 бластная клетка на 10^4 мононуклеаров КМ. Уровень МОБ расценивали как отрицательный при относительном числе бластных клеток в КМ $<0,01\%$ ($<10^{-4}$), положительный – при $\geq 0,01\%$ (10^{-4} и более). Забор КМ проводили на момент постановки диагноза (день 0) и на следующих временных точках оценки ремиссии на протоколе ОЛЛ-МБ-2002: 15-й ($n=99$) и 36-й ($n=107$) дни и перед началом поддерживающей терапии – ПТ ($n=60$). Протокол лечения и методологический подход определения МОБ подробно описаны ранее [11, 12].

Для статистической обработки была создана база данных, в которую заносили данные о пациентах, включенных в исследование. Показатели выживаемости рассчитывали по методу Каплана – Майера. Прогностические параметры факторов для БРВ при ОЛЛ у детей на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 оценивали с помощью log-rank-теста. Оценку влияния на МОБ в точках оценки ремиссии факторов прогноза у детей с ОЛЛ осуществляли по двустороннему критерию Фишера. Для мультифакторного анализа и оценки Hazard Ratio использована модель Кокса. Все расчеты производили с помощью пакета Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для анализа прогностической значимости МОБ в отношении развития рецидива мы провели однофакторный анализ БРВ по каждому из благоприятных и неблагоприятных факторов риска, используемых для стратификации на терапевтические группы на протоколах ОЛЛ-МБ-2002/2008 и в других международных исследованиях ОЛЛ: инициальный лейкоцитоз $<50\ 000$ в 1 мкл, $<30\ 000$ в 1 мкл; $100\ 000$ в 1 мкл и более при ОЛЛ из предшественников В-клеток; возраст; пол; инициальное поражение

Таблица 1. Прогностически значимые факторы для БРВ при ОЛЛ у детей, получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МБ-2002

Фактор	Число больных	БРВ (SE), %	Медиана наблюдения (min...max), мес	p
Возраст на момент диагноза:				
>1 и <10 лет	150	86,4 (3,7)	32,9 (1,7...63,8)	0,046
≥ 10 лет	70	62,2 (1,2)	33,3 (1,7...64,3)	
Лейкоциты при диагностике, в 1 мкл:				
$<50\ 000$	190	78,8 (7,4)	35,4 (1,7...64,3)	
$\geq 50\ 000$	30	60,8 (11,5)	30,2 (4,7...59,8)	0,011
$<30\ 000$	176	78,7 (7,5)	36,1 (1,7...64,3)	0,04
$\geq 30\ 000$	44	67,5 (9,3)	27,8 (4,3...59,8)	
Лейкоциты при диагностике ОЛЛ из предшественников В-клеток, в 1 мкл:				
$\geq 100\ 000$	9	41,7 (22,2)	27,7 (4,7...51,8)	0,026
$<100\ 000$	191	77,4 (7,9)	36,3 (1,7...64,3)	
TEL/AML-позитивность:				
да	39	Нет рецидивов	28,6 (4,2...63,8)	0,025
нет	128	68,6 (11,2)	34,7 (1,7...63,4)	
Ответ на терапию преднизолоном в ПК на 8-й день:				
хороший (≤ 1000 бластов/мкл)	175	75,1 (9,4)	33,0 (1,7...64,3)	0,029
плохой (>1000 бластов/мкл)	34	68,0 (9,0)	42,5	
Ремиссия в КМ после индукционной терапии				
да, M1 ($<5\%$ бластов)	213	76,6 (6,8)	34,0 (1,7...64,3)	0,004
нет, M2 и M3 ($\geq 5\%$ бластов)	3	33,3 (27,2)	22,9 (6,1...41,9)	
Спленомегалия, см:				
<4	165	77,9 (8,8)	33,0 (1,7...64,3)	0,021
≥ 4	54	70,3 (7,5)	34,7 (2,7...63,8)	
МОБ на 36-й день:				
«-» ($<10^{-4}$)	60	92,1 (5,8)	19,0 (1,7...53,8)	0,009
«+» ($\geq 10^{-4}$)	47	65,0 (9,2)	28,0 (2,6...54,8)	

Примечание. M1, M2, M3 – морфологический статус КМ (тип M1 – $<5\%$ бластов, M2 5–24%, M3 $\geq 25\%$).

Таблица 2. Доля МОБ-позитивных пациентов в зависимости от фактора прогноза и точки оценки ремиссии на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 у детей с ОЛЛ

Фактор прогноза	День				Перед ПТ	
	15-й	36-й	15-й	36-й	МОБ	МОБ
	«+»	«-»	«+»	«-»	«+»	«-»
Ответ на терапию преднизолоном в ПК на 8-й день:						
хороший (≤ 1000 бластов/мкл)	72 (86)	12 (14)	36 (40)	54 (60)	10 (21)	38 (79)
плохой (> 1000 бластов/мкл)	14 (100)	0	11 (79)	3 (21)	2 (22)	7 (73)
<i>p</i>	0,206		0,009		>0,999	
Спленомегалия, см:						
<4	66 (86)	11 (14)	31 (37)	52 (63)	11 (24)	35 (76)
≥ 4	23 (96)	1 (4)	16 (67)	8 (33)	3 (21)	11 (79)
<i>p</i>	0,285		0,018		>0,999	
Группа риска:						
стандартного (SRG)	73 (86)	12 (14)	37 (41)	54 (59)	13 (25)	39 (75)
промежуточного (ImRG)	13 (100)	0	7 (58)	5 (42)	0	7 (100)
высокого (HR)	3 (100)	0	3 (75)	1 (25)	1 (100)	0
<i>p</i>	0,278		0,226		0,064	

Примечание. Представлено число больных, в скобках – процент.

центральной нервной системы (ЦНС); пре-Т/Т-иммунология; поражение средостения; t(4;11) или MLL/AF4; t(9;22) или BCR/ABL; MLL-аномалии; t(1;19) или E2A/PBX1; наличие TEL/AML; гипер- и гиподиплоидия; ответ на терапию преднизолоном в ПК на 8-й день; ранний ответ в КМ на 15-й день; наличие ремиссии в КМ после индукционной терапии; размеры селезенки ($>$ или < 4 см); CD10-позитивность при ОЛЛ из предшественников В-клеток; МОБ на 15-й день ($>$ или $< 10^{-4}$); МОБ на 36-й день ($>$ или $< 10^{-4}$); МОБ перед ПТ ($>$ или $< 10^{-4}$).

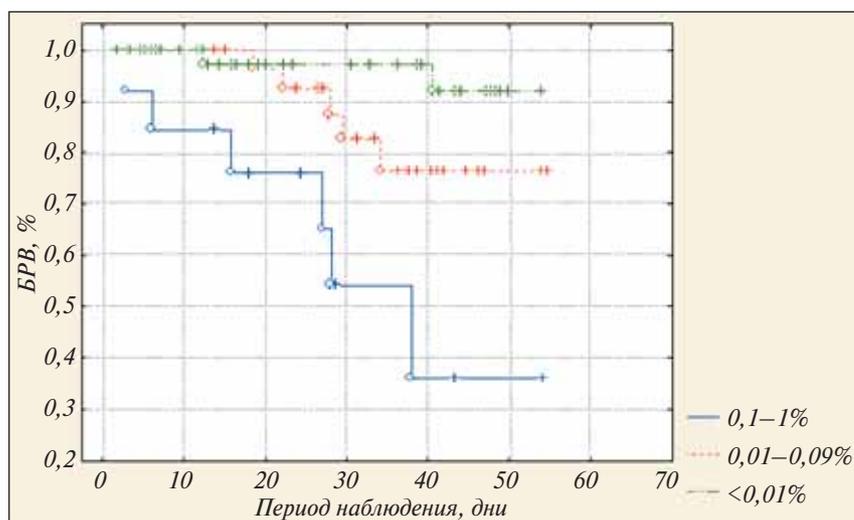
В табл. 1 приведена информация по тем факторам, которые статистически достоверно ($p < 0,05$) влияли на БРВ.

Кроме того, каждый из вышеперечисленных критериев стратификации анализировался на наличие МОБ в зависимости от точки оценки ремиссии на протоколе лечения ОЛЛ. Плохой индивидуальный ответ на терапию преднизолоном на 8-й день и объем опухолевого поражения (спленомегалия > 4 см) статистически достоверно определяли позитивность по МОБ на главной точке оценки ответа на терапию – 36-й день от начала индукции ремиссии. В табл. 2 приведена информация только по тем факторам, по которым получены статистически значимые различия, а также отражено распределение пациентов с отрицательным и положительным уровнем МОБ в зависимости от группы риска. В целом же ни один из проанализированных

критериев, используемых для стратификации на группы риска, не являлся абсолютным, т.е. «внутри» каждого существовала примерно равная доля пациентов с наличием или отсутствием остаточных опухолевых клеток. Все это говорит о том, что МОБ должна быть дополнительным критерием при оценке эффективности индукционной терапии.

Далее мы оценили влияние уровня позитивности по МОБ ($> 1\%$; $0,1-1\%$; $0,01-0,09\%$ бластных клеток в КМ) на БРВ у детей с ОЛЛ. Достоверные различия ($p < 0,05$) были выявлены только на 36-й день (см. рисунок): очевидно, что чем больше число остаточных лейкоэмических бластов после окончания индукционной терапии, тем хуже показатели БРВ у детей с ОЛЛ.

В многофакторный анализ (Кокс-регрессия) влияния различных неблагоприятных факторов на



БРВ в зависимости от уровня МОБ на 36-й день (после этапа индукции ремиссии) лечения ОЛЛ у детей на протоколе ОЛЛ-МБ-2002

Таблица 3. Результаты многофакторного анализа

Фактор	Hazard ratio	p
Положительный уровень МОБ на 36-й день ($\geq 0,01\%$)	6,6	0,031
Лейкоцитоз $\geq 30\ 000$ в 1 мкл	5,3	0,021
Спленомегалия ≥ 4 см	2,4	0,130
M2- и M3-статус в КМ на 36-й день	2,0	0,564
Возраст ≥ 10 лет	1,7	0,351
Плохой ответ на терапию преднизолоном на 8-й день (>1000 бластов/мкл в ПК)	1,0	0,959

вероятность развития рецидива наряду с МОБ включили все вышеперечисленные факторы, достоверно влияющие на БРВ у больных с ОЛЛ в нашем исследовании. Результаты многофакторного анализа представлены в табл. 3, из которой видно, что наличие МОБ на 36-й день и инициальный лейкоцитоз $\geq 30\ 000$ в 1 мкл являются самыми сильными независимыми прогностическими факторами, влияющими на вероятность развития рецидива.

Во всех международных протоколах лечения ОЛЛ у детей разделение пациентов проводится на группы низкого (стандартного), промежуточного и высокого риска неблагоприятного исхода. По данным литературы, мощным прогностическим фактором служит ответ на терапию [5]. Детерминантами ответа на лечение являются факторы организма, биологические свойства опухоли (пролиферативный потенциал, резистентность к препаратам), лечение (доза, взаимодействие лекарств) [13]. Индивидуальный ответ на терапию – важный фактор в прогнозе рецидива. Так, в 1991 г. было начато исследование группой IBFM «субмикроскопического» раннего ответа на терапию на протоколе ALL-BFM-90 путем молекулярно-генетического анализа МОБ (Ig/TCR). Продемонстрировано, что позитивность по МОБ – более мощный прогностический фактор, чем «морфологический» ответ; выявлены пациенты с крайне низкой вероятностью развития рецидива (достижение отрицательного уровня МОБ через 5 и 11 нед лечения); выделена группа больных с высокой ($>80\%$) вероятностью развития рецидива (сохраняющих позитивный уровень МОБ). Позже было показано, что оценка МОБ методом ПЦФ по чувствительности и сопоставимости результатов может использоваться как альтернативный и более доступный метод, чем ПЦР [5, 9, 10]. В 2008 г. опубликованы данные участников протокола ALL IC-BFM 2002 (Международный консорциум по лечению ОЛЛ у детей в рамках исследовательской группы БФМ), попытавшихся ответить на вопрос – можно ли все-таки обойтись без стратификации пациентов на группы риска в странах с ограниченными возможностями, если ис-

пользовать динамику морфологического ответа на индукционное лечение [8]. Ответ был однозначным – морфологическая стратификация позволяет выявить пациентов только высокой группы риска, но является несостоятельной для идентификации больных, подлежащих редукции терапии. Тогда же опубликованы результаты группы БФМ по ретроспективному (с 1991 г.) и проспективному (с 2000 г.) анализу прогностического влияния МОБ

на ответ на лечение и исход при ОЛЛ у детей [5]. Отмечено, что 10-летнее наблюдение в рамках протокола I-BFM-SG MRD study 91 продемонстрировало стабильные результаты БСВ: в группе стандартного риска – MRD-SR – 93%, промежуточного риска – MRD-IR – 74%, высокого риска – MRD-HR – 16%. МОБ является независимым сильным фактором, влияющим на вероятность развития рецидива при ОЛЛ как из предшественников В-клеток [6], так и из зрелых В-клеток [7]. Кроме того, показано, что уровень МОБ сопоставим в ПК и КМ у детей с Т-фенотипом лейкоэмических клеток ОЛЛ, но не у пациентов с ОЛЛ из предшественников В-клеток [14]. У последних уровень резидуальных опухолевых клеток в КМ может быть выше в 1000 раз по сравнению с ПК, таким образом исследование ПК не подходит для стратификации, но может быть использовано для мониторинга, например после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В целом показана важная прогностическая роль МОБ в отношении предсказания рецидива после ТГСК при ОЛЛ [15]. Следует отметить, что сохранение позитивного уровня МОБ имеет большее влияние на исход заболевания при проведении ТГСК во 2-й и 3-й ремиссии, чем в 1-й [16]. В настоящее время МОБ начинает применяться как способ сравнения эффективности химиотерапевтических режимов и отдельных препаратов, поскольку чувствительность к лекарству *in vivo* и *in vitro* может не совпадать [17]. Кроме того, в литературе обсуждается вопрос о том, что детям с ранним исчезновением (отсутствием) МОБ не показаны интенсификация лечения и проведение ТГСК, им даже может быть снижена интенсивность лечения, но это – предмет дальнейших исследований [9]. К сожалению, до настоящего времени не идентифицированы гены, ассоциированные с персистенцией МОБ и высоким риском возникновения рецидива, хотя некоторые авторы уже выделяют группы по генному профилю, состоящие в основном из пациентов, остающихся в ремиссии после лечения, или из больных с развившимися рецидивами [18].

Таким образом, очевидно, что оценка ответа на терапию на основании определения МОБ — мощный прогностический фактор, а современная система стратификации ОЛЛ без оценки МОБ далека от совершенства. Мы считаем необходимым внедрение оценки МОБ для стратификации на терапевтические группы с учетом уровня остаточных лейкоэмических клеток, в первую очередь, после этапа индукции ремиссии, в рутинную практику лечения ОЛЛ, так как благоприятные критерии, на основании которых формируется группа стандартного риска, не обеспечивают хороший прогноз для всех пациентов. Одной из причин этого является сохранение субмикроскопически определяемых в КМ бластных клеток, т.е. МОБ, на основных временных точках оценки ремиссии, что означает недостаточный ответ на терапию и влечет за собой риск развития рецидива.

Заключение

По результатам проведенного анализа положительный уровень МОБ, определяемый методом ПЦФ после проведения индукционной терапии (36-й день в рамках протокола ALL-MB-2002) является самым сильным и независимым прогностическим фактором, влияющим на вероятность развития рецидива. На основании данного исследования мы считаем, что стратификация на терапевтические группы должна включать оценку МОБ на 36-й день (оценка индивидуального ответа на индукцию ремиссии) и осуществляться в 2 этапа: I — перед началом лечения с использованием клинико-морфологических и генетических критериев; II — после проведения индукционной терапии на основании субмикроскопического ответа (количественной оценки показателя МОБ). Эффективность такой стратификации должна быть оценена в проспективном мультицентровом исследовании.

Л и т е р а т у р а

1. Савва Н.Н., Зборовская А.А., Алейникова О.В. Злокачественные новообразования у детей Республики Беларусь: заболеваемость, выживаемость, смертность, паллиативная помощь. Минск: РНМБ, 2008.
2. Campana D., Pui C. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85:1416—34.
3. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:2691—6.
4. Campana D. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: expectations, possibilities and initial clinical results. *Int J Clin Lab Res* 1994;24:1—7.
5. International BFM Study Group (I-BFM-SG). 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(4):771—82.
6. Children's Oncology Group. Clinical significance of MRD in childhood ALL and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477—85.
7. Mussolin L., Pillon M., Conter V. et al. Prognostic role of minimal residual disease in mature B-cell ALL of childhood. *J Clin Oncol* 2007;25(33):5254—61.
8. Fronkova E., Mejstrikova E., Avigad S. et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* 2008;22(5):989—97.
9. Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in ALL? *Leukemia* 2007;21(4):622—6.
10. Dvorkin M.N., Panzer-Grumaer E.R. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1445—55.
11. Karachunskiy A., Herold R., von Stackelberg A. Results of the first randomized multicenter trial on childhood acute lymphoblastic leukaemia in Russia. *Leukemia* 2008;22(6):1144—53.
12. Белевцев М.В., Савицкий В.П., Савва Н.Н. и др. Определение остаточных опухолевых клеток в костном мозге детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом методом проточной цитофлюориметрии. *Клин лабор диагност* 2006;10:42—5.
13. Davies S., Borowitz M., Rosner G. Pharmacogenetics of minimal residual disease response in children with B-precursor ALL: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2008;111(6):2984—90.
14. Van der Velden V. MRD levels in BM and PB are comparable in children with T cell ALL, but not in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16(8):1432—6.
15. Sramkova L., Muzikova K., Fronkova E. et al. Detectable MRD before alloHSCT predicts extremely poor prognosis in children with ALL. *Pediatr Blood Cancer* 2007;8(1):93—100.
16. Schilham M., Balduzzi A., Bader P. PD-WP of the EBMT. Is there a role for minimal residual disease levels in the treatment of ALL patients who receive allogeneic stem cells? *Bone Marrow Transplant* 2005;35(Suppl 1):49—52.
17. Kwok C., Kham S., Ariffin H. et al. Minimal residual disease (MRD) measurement as a tool to compare the efficacy of chemotherapeutic drug regimens using Escherichia Coli-asparaginase or Erwinia-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(3):299—304.
18. Andersson A., Ritz C., Lindgren D. et al. Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia* 2007;21(6):1198—203.