

*На правах рукописи*

**Гиршова Лариса Леонидовна**

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СТЕПЕНИ РЕДУКЦИИ  
ОПУХОЛЕВОЙ МАССЫ НА РАННИХ СРОКАХ ИНДУКЦИОННОГО  
ЭТАПА ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ  
ЛЕЙКОЗОМ.**

14.01.21 – гематология и переливание крови

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Зарицкий Андрей Юрьевич** - доктор медицинских наук, профессор.

**Официальные оппоненты:**

**Семенова Елена Владимировна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии факультета постдипломного обучения, декан педиатрического факультета Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Семочкин Сергей Вячеславович** - доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии гематологии, гематологии и лучевой терапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при ФГБУ РосНИИГТ ФМБА  
России по адресу 191024, г. Санкт - Петербург, ул. 2 - я Советская, д.16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России ([www.bloodscience.ru](http://www.bloodscience.ru))

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – наиболее распространенный вариант острого лейкоза у взрослых. ОМЛ является гетерогенной группой, включающей в себя различные цитогенетические (ЦГ) и молекулярные аномалии, имеющие доказанное прогностическое значение, на основании которого создана стратификация по группам риска, позволяющая прогнозировать длительность ремиссии (H.Döhner, 2010). Внедрение в повседневную клиническую практику современных программ химиотерапии, включающих стандартные курсы индукции и консолидации, позволяет достигать полной ремиссии у 50-80% пациентов с ОМЛ (Estey E.H., 2013) и приводит к увеличению длительности общей выживаемости (Buchner T., 1999, Савченко В.Г., 2002, Zaritskey A, 1999). Однако, даже внутри определенных групп риска, длительность достигнутой ремиссии и частота рецидивов имеют значительную вариабельность. Современные подходы к терапии ОМЛ ориентированы на создание риск-адаптированных программ лечения и динамического наблюдения.

Развитие рецидива ОМЛ обусловлено сохранением минимального количества химиорефрактерных лейкоэмических клеток на фоне проводимой терапии (Burnett A., 2011, Ossenkoppele G., 2016). Основными задачами в настоящее время являются достижение максимальной элиминации лейкозного клона и определение факторов, указывающих на высокую вероятность рецидива или резистентности ОМЛ. В то время, как для других вариантов гемобластозов, таких как ОЛЛ, ХМЛ, сформировано представление о прогностическом значении не только факта достижения морфологической ремиссии, но также срока и глубины ответа на различных этапах терапии, для ОМЛ возможные динамические прогностические факторы находятся в настоящее время в активном изучении.

В связи с этим, особое значение приобретает поиск факторов, определяющих прогноз не только в дебюте заболевания, но и на фоне проводимой программной терапии (H.Döhner, 2017). В качестве таких дополнительных прогностических факторов рассматриваются: достижение ремиссии после первого курса терапии (Ferguson P., 2016, Савченко В.Г., 2016), определение минимальной остаточной болезни на фоне констатированной полной ремиссии заболевания (Othus M., 2016, Hourigan C. 2017, Грицаев С.В., 2011). Тогда как достижение морфологической ремиссии после первого курса является достаточно широко описанным прогностическим фактором, оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) внесена в международные рекомендации для применения в клинической практике только 2017 году. В настоящее время все еще отсутствуют общепринятые представления об оптимальном времени достижения МОБ-негативности (H.Döhner, 2017). Это обусловлено многообразием молекулярно-генетических маркеров, методов их идентификации, а также отличиями в кинетике ответа на терапию.

Таким образом, становится актуальным поиск наиболее универсального высокочувствительного маркера для оценки редукции опухолевого объема на фоне лечения с доступной воспроизводимостью методики определения. Исходя из этого, наиболее активно в настоящее время изучается прогностическое значение динамики экспрессии гена *WT1* (Cilloni, D., 2009, Мамаев Н.Н., 2016), оцениваемой на этапе окончания индукционного курса. Однако,

наибольший интерес представляет возможность оценки потенциальной химиочувствительности опухолевых клеток на более ранних этапах лечения. Ранняя редукция бластома в костном мозге может считаться маркером чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии у пациентов с ОМЛ и может позволить прогнозировать вероятность достижения ремиссии. Значение данного фактора для прогноза длительности безрецидивной и общей выживаемости описано для режима «двойной» индукции (T.Vuchner, 2003г.). В рамках стандартного индукционного курса "7 + 3" прогностическое влияние ранней элиминации бластов менее изучено, в основном обсуждается в аспекте прогнозирования достижения ПР и в настоящее время не включено в международные и национальные российские рекомендации как фактор неблагоприятного прогноза.

Актуальным представляется проведение исследования, оценивающего прогностическое значение морфологической и молекулярно-генетической редукции опухолевого объема на 14±3 день индукционного курса у пациентов с ОМЛ. Формирование представлений о вероятности длительного сохранения достигнутой ремиссии может позволить своевременно определить показания к интенсификации лечения и выполнению аллогенной трансплантации костного мозга.

#### **Степень разработанности темы**

Ранняя оценка редукции бластома внедрена в клиническую практику программной терапии пациентов с ОМЛ. Для ОМЛ оценка уровня бластома через 7 дней после окончания индукции включена в рекомендации группы NCCN. Как показывает анализ литературы в большинстве исследований оценивается влияние сохранения остаточного бластома на вероятность достижения ремиссии. В части исследований есть указания на сохранение негативного прогноза для пациентов, достигших ремиссии (Wheatley K.,1999, Kern W.2003). Однако, на настоящий момент нет единого мнения о прогностически значимом уровне редукции бластома оцененного на 14-16 день терапии и необходимости изменения стратегии дальнейшей терапии. Несмотря на имеющиеся представления о резидуальном опухолевом объеме как о потенциальном маркере химиорезистентности клона (Ferrara F. 2008), актуальным является вопрос возможности идентификации бластов как опухолевых или регенирирующих клеток. В качестве дополнительного метода оценки редукции опухолевого клона на 14-й день ряд авторов предлагает использовать метод проточной цитофлуориметрии, оценивающей ассоциированный с лейкозом иммунофенотип (ЛАИФ) (Grimwade D,2014). Однако, метод оценки МОБ проточной цитофлуориметрией достаточно сложен в интерпретации, требует обязательной стандартизации и может отличаться в различных центрах. Доступным методом определения химиочувствительности опухолевого клона может являться оценка МОБ с помощью ОТ-ПЦР (Hourigan C.S.,2017). В настоящее время активно проводятся исследования прогностического влияния сохранения МОБ на этапе ремиссии заболевания, в том числе оценка уровня экспрессии гена *WT1*. Определение динамики молекулярных маркеров на ранних этапах индукции является принципиально новым подходом, позволяющим получить дополнительную информацию для прогнозирования результатов терапии ОМЛ (Gianfaldoni G. 2010). В настоящей диссертационной работе впервые исследовался комбинированный подход к оценке степени редукции опухолевого объема и его влиянию на прогноз пациентов с ОМЛ.

### **Цель исследования**

Оценить прогностическое значение степени редукции опухолевой массы на раннем этапе индукционной терапии острого миелобластного лейкоза.

### **Задачи исследования**

1. Оценить возможные факторы прогнозирования длительного сохранения ремиссии: достижение морфологической и молекулярной ремиссии после первого курса терапии.
2. Определить прогностическое влияние редукции бластоза в день  $14 \pm 3$  индукционного курса на достижение ремиссии, безрецидивную и общую выживаемость пациентов с ОМЛ.
3. Исследовать влияние уровня экспрессии гена *WT1* в день  $14 \pm 3$  индукционного курса у пациентов с повышенным уровнем экспрессии в дебюте заболевания на безрецидивную и общую выживаемость.
4. Установить прогностический потенциал оценки степени редукции бластоза и экспрессии гена *WT1* для определения группы пациентов неблагоприятного прогноза.
5. Определить прогностический потенциал оценки МОБ для стратификации пациентов низкой и промежуточной групп риска.
6. Оценить влияние индукционных режимов химиотерапии, отличающихся от стандартно рекомендованных, на результаты терапии впервые выявленного ОМЛ.

### **Научная новизна**

Определен прогностический потенциал оценки редукции опухолевой массы на ранних этапах индукционного курса как маркера химиочувствительности опухолевого клона.

Впервые выполнена оценка уровня экспрессии гена *WT1* методом количественной ПЦР на раннем этапе индукционного периода. Определена высокая чувствительность, специфичность и точность теста для прогнозирования развития раннего рецидива заболевания.

Выявлено неблагоприятное влияние сохранения повышенного уровня *WT1* на ранних сроках индукционного курса на безрецидивную и общую выживаемость.

Установлена значимость ранней оценки редукции бластоза для выделения среди пациентов промежуточного цитогенетического риска и пациентов, достигших ремиссии после первого индукционного курса, группы неблагоприятного прогноза с высокой вероятностью развития раннего рецидива.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Определено неблагоприятное влияние на исход заболевания использования индукционных режимов химиотерапии, отличающихся от стандартно рекомендованных, а также преимущество в достижении ремиссии при использовании в качестве второго индукционного курса режима «FLAG». Определение редукции опухолевого объема морфологическим и молекулярно-генетическим методом позволяет точнее прогнозировать развитие рецидива ОМЛ у пациентов, достигших ремиссии после первого индукционного курса химиотерапии. Выявление уровня бластов более 10% на раннем этапе индукционного курса позволяет выделить среди пациентов промежуточного риска группу неблагоприятного прогноза с низкой вероятностью достижения и сохранения ремиссии. При достижении значимой редукции бластоза (0-10% бластов) в день  $14 \pm 3$  индукционного курса выявление уровня

экспрессии *WT1* превышающее нормальные значения позволяет достоверно выделить группу пациентов с наиболее неблагоприятным прогнозом и определить в дальнейшем показания к интенсификации лечения на постремиссионном этапе, в том числе к выполнению аллогенной трансплантации костного мозга.

#### **Методология и методы исследования**

Работа проводилась с использованием лабораторной диагностики (морфологической, цитогенетической, цитофлуориметрической, молекулярно-генетической) и статистических методов анализа.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Оценка редукции опухолевой массы на раннем этапе индукционного курса является достоверным фактором прогноза достижения ремиссии, длительности безрецидивной и общей выживаемости пациентов с ОМЛ.

2. Морфологическая оценка редукции опухолевой массы в день  $14\pm 3$  индукционного курса позволяет прогнозировать развитие рецидива у пациентов промежуточной группы риска и пациентов, достигших ремиссии после первого курса химиотерапии.

3. Определение МОБ после окончания первого индукционного курса с использованием оценки уровня экспрессии гена *WT1* позволяет выявить пациентов с неблагоприятным прогнозом.

4. Оценка уровня экспрессии гена *WT1* в день  $14\pm 3$  индукционного курса является высокочувствительным, специфичным и точным прогностическим фактором, позволяющим выделить группу высокого риска раннего рецидива и короткой общей выживаемости, в том числе среди пациентов, не имеющих неблагоприятных прогностических факторов.

5. Комплексный подход к оценке прогноза у пациентов с ОМЛ, включающий группу риска, оценку уровня экспрессии гена *WT1* в день  $14\pm 3$  и  $28\pm 7$  индукционного курса позволяет оптимизировать определение прогноза ответа на терапию пациентов с ОМЛ.

6. Использование отличающихся от стандартно рекомендованных российскими и международными гематологическими сообществами индукционных режимов химиотерапии ОМЛ негативно влияет на вероятность достижения ремиссии заболевания, ее длительность и общую выживаемость пациентов. Преимущество может быть получено для данной группы пациентов при использовании на следующих этапах терапии режимов с высокодозным цитозаром.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов исследования определяется объемом проведенного обследования 167 пациентов, с использованием достоверных объективных методов исследования, качеством проведенных лабораторных анализов и статистической обработкой полученных результатов. Материалы, основные положения и результаты диссертации были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», посвященной 85-летию ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (Санкт-Петербург, 2017), на V Евразийском гематологическом форуме, XXVI семинаре по онкопатологии «Клиническая гематология»

(Санкт-Петербург, 2017 г.), научно-практической конференции «Современный взгляд на возможности лечения "трудных" онкогематологических пациентов» (Санкт-Петербург, 2015 г.), IV Конгрессе гематологов России (Москва, 2018). Материалы представлялись на симпозиуме ACUTE LEUKEMIAS XVII Biology and Treatment Strategies (Мюнхен, 2017), конференции Society of Hematologic Oncology (Хьюстон 2017) в виде стендовых докладов. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 2 в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 107 страницах машинописного текста и содержит 30 рисунков и 26 таблиц. Структура диссертации включает в себя введение, обзор литературы, подробную характеристику исследуемой группы и методов проведенных исследований, собственные результаты исследования, заключение, выводы, практические рекомендации и библиографию. Список литературы содержит 12 отечественных и 88 зарубежных источников.

#### **Внедрение результатов исследования**

Основные положения диссертации внедрены в практическую и научно-исследовательскую работу отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в учебный процесс на кафедре факультетской терапии с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики имени Г.Ф. Ланга с клиникой ФГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Результаты исследования применяются в лечебно-диагностической работе гематологического отделения Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко г. Улан-Удэ Республики Бурятия.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **Материалы и методы исследования.**

#### **Характеристика исследуемой группы пациентов.**

В исследование включены данные ретроспективного анализа историй болезни 167 пациентов с диагнозом впервые выявленного ОМЛ в возрасте от 17 до 70 лет, которым проводилась программная цитостатическая терапия на базе отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» в период 2008г.- 2017 г. и на базе ГКБ №31 г 1991-1999 года. Санкт-Петербурга. В анализ не включались пациенты с диагнозом острого промиелоцитарного лейкоза, рецидивом заболевания и пациенты, которым проводилась терапия низкой интенсивности или симптоматическая терапия. Медиана наблюдения составила 34 месяца. Средний возраст на момент постановки диагноза - 40,2 года. Среди них 50,3% (84/167) составили мужчины и 49,7% (83/167) женщины. 91,0% (152/167) пациентов были моложе 60 лет. Преобладание доли пациентов молодого возраста обусловлено критериями включения в исследование – возможность проведения стандартного индукционного

курса. При ретроспективном анализе данных историй болезни прогностическая группа риска была определена на основании рекомендаций NCCN 2017 года у 80,2% (134/167) пациентов: 11,2% (15/134) - низкая группа риска, 56% (75/134) относились к промежуточной группе риска, у 32,8% (44/134) были выявлены неблагоприятные прогностические факторы. Из 167 пациентов, включенных в исследование, 77,8% (130/167) проводились курсы индукции ремиссии в режимах «7+3», «TAD», «FLAG». 37 пациентам из 167 (22,2%) на базах других гематологических отделений были проведены курсы индукционной терапии, отличающиеся от стандартно рекомендованных режимов. К нестандартным индукционным режимам были отнесены курсы терапии со снижением доз (без расчета на м<sup>2</sup>); уменьшением количества дней введения цитостатических препаратов - «5+2»; «малые дозы антрациклинов». В ряде случаев, в связи с недостаточным объемом проводимого в других гематологических стационарах обследования на этапе верификации диагноза, в качестве индукционных курсов терапии использовались режимы, стандартно применяемые для терапии других гемобластозов («6MP+Prd+Vcr+Doxo»; «C-ROMP»; «VAD» «VCD»; «ОЛЛ 2009»; "RACOP"; глюкокортикостероиды).

После достижения ПР заболевания в рамках программной терапии пациентам проводился консолидирующий этап лечения, включающий стандартные («7+3», «TAD») или высокие (HiDAC», «HAM», «FLAG») дозы цитозара. Аллогенная родственная или неродственная трансплантация костного мозга при наличии HLA-совместимого или гаплоидентичного донора выполнялась пациентам моложе 65 лет высокой группы риска согласно комплексной прогностической шкале предложенной европейскими экспертами ELN в 2012.

Ретроспективный анализ влияния ответа после первого индукционного курса на исход заболевания был выполнен в группе 130 пациентов, которым проводились стандартные индукционные режимы ХТ: 85,5% (115/130) - курсы, включавшие стандартные дозы цитозара («7+3» и «TAD»), 15,5% (15/130) - с высокими дозами цитозара. 118 пациентам, достигшим ремиссии, проводился консолидационный этап терапии: 45,8% (54/118) - со стандартными и 54,2% (64/118) с высокими дозами цитарабина. 5 пациентам, не достигшим ремиссии, была выполнена аллогенная родственная трансплантация костного мозга. 35 пациентам аллогенная трансплантация костного мозга выполнялась в первой ремиссии заболевания.

#### **Лабораторные методы исследования**

Для верификации диагноза в рамках рутинной практики проводилось морфологическое исследование препаратов костного мозга с дифференциальным подсчетом не менее 500 клеток в мазках, цитохимическое и цитофлюориметрическое исследования. Повторное морфологическое исследование костного мозга выполнялось в дни  $14 \pm 3$  и  $28 \pm 7$  от начала индукционного курса. В дальнейшем анализ миелограммы с подсчетом бластов проводился после каждого курса терапии для исключения рецидива заболевания.

Стандартное кариотипирование при верификации диагноза было выполнено у 159 пациентов. Кариотипирование проводилось на клетках костного мозга по стандартной методике. Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) выполнялся с использованием ДНК-зондов Vysis согласно протоколам производителя. Информативные результаты



цитогенетического исследования были получены у 133 пациентов. У 70 (52,6%) пациентов определен нормальный кариотип. Наиболее часто выявляемыми генетическими аномалиями были: t(8;21)(q22; q22) – 13(9,8%), комплексный кариотип – 13(9,8%). Среди количественных хромосомных нарушений определялись: трисомия 8 хромосомы - 9 (6%), утрата Y хромосомы – 3 (2%), полиплоидный кариотип (1%), моносомия 7 хромосомы в изолированном варианте была выявлена у 1 пациента (<1%), в остальных случаях обнаруживалась в составе комплексного кариотипа. Делеции выявлены у 19 пациентов (14,5%).

Молекулярный метод диагностики был использован для выявления химерных генов, мутаций и гиперэкспрессии генов. Для экстракции РНК использовались коммерческие наборы реактивов QIAamp RNA Blood mini kit (“Qiagen”). Реакцию ОТ проводили с использованием коммерческого набора реактивов для синтеза кДНК: RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва). Образцы кДНК для обнаружения вариантов онкогенов и референсного гена *ABL* амплифицировали с использованием микрочипов и отечественных реактивов (“Евроген”, Россия). Анализ мутаций *TKD* и *ITD* гена *FLT3*, выполняли методом прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием секвенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Для количественного определения уровня экспрессии мРНК гена *WT1* и референс-гена *ABL*, проводилась амплификация по стандартному протоколу ПЦР с использованием набора реактивов для ПЦР Fusion Quant kit for RT-QPCR (“Qiagen”) и Universal PCR Master Mix (“Applied Biosystems”). Анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения к термоциклеру “Rotor-Gene 6000”. Перед выполнением количественной оценки экспрессии гена *WT1* у пациентов, была проведена внутренняя стандартизация методики. Для этого было выполнено определение пороговых уровней экспрессии *WT1* в костном мозге и периферической крови среди здоровых доноров (n=30). Полученные значения не отличались от ПУ экспрессии *WT1*, определенных для группы здоровых доноров в исследовании, опубликованном ранее, и составляли <math><250</math> копий гена *WT1* на  $10^4$  копий гена *ABL* для костного мозга и 50 копий гена *WT1* на  $10^4$  копий *ABL* для периферической крови, соответственно. Количественная оценка уровня экспрессии *WT1* была выполнена в образцах костного мозга, полученных до начала курса химиотерапии, в день  $14 \pm 3$  и день  $28 \pm 7$  от начала лечения параллельно с морфологическим анализом костного мозга.

При ретроспективном анализе была выделена группа пациентов (107/167) с выполненным при верификации диагноза молекулярно-генетическим исследованием. Молекулярные аномалии были выявлены у 57% (61/107) пациентов. Всего выявлено 75 молекулярно-генетических изменений: 13,1% (14/107) *RUNX1-RUNX1T1*, 2,8%(3/107) *CBF-MYH11*, 12,1% (13/107) *NPM1A*, 11,2% (13/107) *FLT3-ITD*, 29,9% (32/107) гиперэкспрессия *BAALC*. У 78,7% (48/61) пациентов были определены одиночные аномалии. У 21,3% (13/61) молекулярно-генетические изменения имели сочетанный характер. Определение уровня экспрессии гена *WT1* в дебюте заболевания было выполнено у 56 пациентов в период с 2009 по 2017 год.

#### **Статистическая обработка данных**

Полученные в процессе проведения анализа данные обрабатывались с использованием программной системы Microsoft Excel for Mac Версия 15.40 (171108) 2017, XLSTAT-Biomed for

Mac и IBM SPSS Statistics Version 23, 2015. Для выявления пороговых уровней (ПУ) blastов и отношения *WT1/ABL1*, использовался метод характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых R version 2.15.0 (2012-03-30)). Оценка значимости различий между количеством исходов в зависимости от факторов прогноза проводилась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона и точного критерия Фишера. Анализ ОБ и БРВ проводился с использованием метода Каплана-Майера. Для оценки достоверности различий применялся лог-ранк-тест. Критерием статистической достоверности принята величина  $p < 0,05$ . При оценке БРВ анализировался период от момента достижения ПР до окончания периода наблюдения (01.08.2017) или даты последней имеющейся информации о пациенте, когда он был жив и находился в ПР. Событиями считались рецидив или смерть от любой причины. Для сравнения кривых кумулятивной частоты рецидивов (КЧР) использовался тест Грея. ОБ анализировалась от даты верификации диагноза до даты окончания наблюдения или последней информации о пациенте, когда он был жив. Событием считалась смерть пациента от любой причины. Пациенты, которым была выполнена аллогенная трансплантация, цензурировались датой ТКМ. Многофакторный анализ выполнялся с помощью модели пропорциональных интенсивностей Кокса и показателя отношения рисков (HR).

### **Результаты исследования**

При ретроспективном анализе была оценена частота достижения ПР заболевания. После первого курса ремиссия была достигнута у 56,3% (94/167). Частота ПР после двух и более курсов терапии составила 82,6% (138/167). Пяти пациентам в связи с отсутствием ремиссии после 2-х индукционных курсов была выполнена аллогенная родственная ТКМ вне ремиссии. У всех пациентов ПР была достигнута к 30-му дню после ТКМ. Общая частота достижения ПР составила 85,6% (143/167). Безрецидивная выживаемость достоверно отличалась в цитогенетических группах риска. Медиана БРВ в низкой группе риска составила 30,5 месяцев, в промежуточной группе риска – 16,2 месяцев, в высокой группе риска – 6,3 месяца ( $p=0,026$ ). ОБ так же значимо отличалась в зависимости от группы риска: медиана в низкой группе риска не была достигнута, в промежуточной 20,2 месяца, в высокой – 14,2 месяца ( $p=0,01$ ).

### **Влияние нестандартных индукционных курсов терапии на достижение ремиссии, безрецидивную и общую выживаемость**

При сравнительном анализе было выявлено, что использование нестандартных индукционных режимов приводило к значительному снижению частоты достижения ПР после 1 курса, по сравнению с использованием стандартных схем: 35,1% (13/37) против 62,3% (81/130) ( $p=0,006$ ). Отсутствие статистически значимых достоверных отличий в частоте ПР после двух индукционных курсов терапии (83,6% против 75,7%,  $p=0,06$ ) было обусловлено тем, что на этапе второго индукционного курса были использованы стандартные режимы химиотерапии. Однако, несмотря на отсутствие достоверных отличий в общей частоте ПР и проведение в дальнейшем стандартных и высокодозных режимов консолидирующей терапии, негативное влияние распространялось на БРВ и ОБ ( $p=0,02$  и  $p=0,022$  соответственно) (таблица 1).

При анализе группы пациентов, не достигших ремиссии после нестандартного индукционного курса химиотерапии, было выявлено отличие в частоте достижения ремиссии в зависимости от

варианта второго курса терапии (таблица 1). Частота ПР была достоверно выше при использовании в качестве второго индукционного курса режимов с высокими дозами цитарабина, таких как «FLAG» 92,3%(12/13) в сравнении с 45,5% (5/11) при использовании режимов «7+3» или «TAD» ( $p=0,039$ ). Однако, статистически значимого улучшения результата безрецидивной выживаемости достигнуто не было ( $p=0,19$ ).

Таблица 1 – Влияние на результаты терапии нестандартных режимов индукции ремиссии

Режим индукции	Стандартный	Нестандартный	<i>p</i>
Количество пациентов	130	37	
ПР после 1 курса ХТ	62,3% (81/130)	32,4% (12/37)	0,003
ПР после 2-х и более курсов ХТ	83,6% (109)	75,7% (29/37)	0,6
Безрецидивная выживаемость (медиана)	12,2 месяцев	8,5 месяцев	0,02
Общая выживаемость (медиана)	40,6 месяца	13,5 месяцев	0,022

### Влияние достижения ремиссии после первого курса на исход заболевания

Влияние достижения ПР после первого индукционного курса на прогноз оценивалось при ретроспективном анализе 130 пациентов. При стратификации по группам риска была выявлена достоверная корреляция вероятности достижения ПР после первого курса с цитогенетической группой риска ( $p < 0,01$ ) (рисунок 1). Все пациенты низкой группы достигли ПР после 1 курса. В группе промежуточного риска ремиссия после 1 курса была достигнута у 70,5% (43/61). В высокой группе риска ремиссии после первого курса достигали меньше половины пациентов – 45,5% (20/44). Недостижение ПР после 1 курса оказывало негативное влияние на БРВ (медиана 5,9 месяцев против 18,7 месяцев,  $p=0,009$ ), КЧР (80% против 60%,  $p=0,01$ ) и ОВ (медиана 13,6 месяцев против 65,1 месяцев,  $p=0,000027$ ). Частота ранних рецидивов была достоверно выше в группе пациентов не достигших ремиссии после первого курса индукции (72,2% против 25,4%,  $p=0,0017$ ; ОШ с ДИ 95% 7,6 (2,06-29,93); чувствительность -46,5%; специфичность-89,5%).

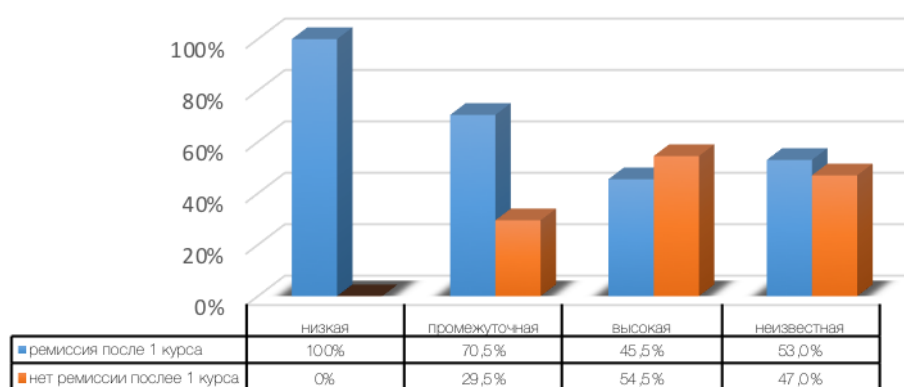


Рисунок 1 – Достижение ремиссии после 1 индукционного курса химиотерапии в молекулярно-генетических группах риска

### Экспрессия гена *WT1* в дебюте заболевания

Уровень экспрессии *WT1* оценивался у 56 пациентов в дебюте заболевания. Гиперэкспрессия выявлена у 92,2% (51/56) пациентов. У 5 пациентов определялся нормальный уровень экспрессии гена *WT1* (0,25 - 25,0 копий /10<sup>4</sup> *ABL*, медиана: 7 копий /10<sup>4</sup> *ABL*). Медиана

уровня гиперэкспрессированного гена *WT1* в дебюте заболевания составила 5763,8 копий /10<sup>4</sup> *ABL* (1831,9 – 8017,0 копий /10<sup>4</sup> *ABL*). Не было выявлено статистически значимых различий между медианными значениями уровней экспрессии гена *WT1* в цитогенетических группах риска ( $F_{1,73} = 0,188$ ;  $p=0,082$ ;  $p=0,414$ ).

#### Уровень экспрессии гена *WT1* после окончания индукционного курса в день 28±7

Средний уровень *WT1* в 28-30 день индукционного курса составлял 1885,76 копий /10<sup>4</sup> *ABL*, медиана – 246 копий /10<sup>4</sup> *ABL* (0,66-15182 копий /10<sup>4</sup> *ABL*). Значимая степень редукции определялась как десятичный логарифм от отношения уровня выявленного в дебюте и в 28 ±7 день индукционного курса. Прогностически значимый для рецидива пороговый уровень был определен методом ROC-анализа, а влияние на БРВ с помощью log-rank теста. Прогностическое значение имел ПУ 2,0 log с чувствительностью 81,2% и специфичностью 66,7% ( $p=0,031$ ,  $OR=0,08$ ). У 40,4% (23/51) уровень экспрессии *WT1* снизился на  $\geq 2\log$ .

Уровень редукции *WT1* в день 28±7 индукционного курса коррелировал с группой риска (рисунок 2). Однако, в отличие от морфологической оценки ремиссии, 12,5% пациентов низкой группы риска не достигали оптимального уровня редукции. В группе промежуточного риска меньший процент пациентов (31,3%) имел оптимальный молекулярный ответ, что достоверно отличалось от частоты достижения ПР после 1 курса в данной группе (70,5%) ( $p=0,01$ ). 35,3% (18/51) пациентов в анализируемой группе не достигли ПР после индукционного курса. У всех пациентов сохранялся уровень экспрессии выше нормальных значений и отсутствовало снижение экспрессии на 2 log. Медиана экспрессии *WT1* составила 3169,0 копий *WT1* /10<sup>4</sup> *ABL* (от 508 до 15182 копий /10<sup>4</sup> *ABL*).

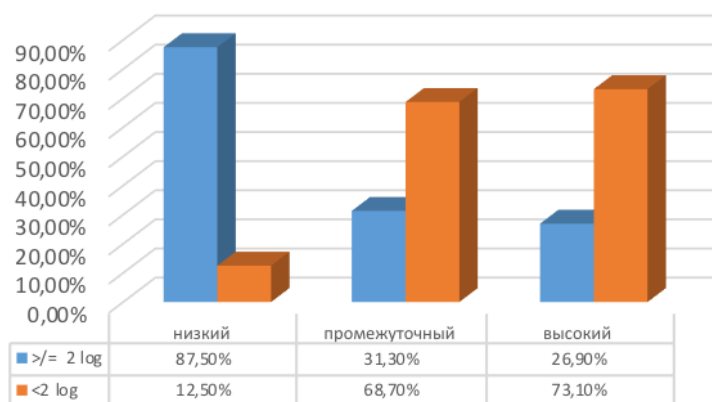


Рисунок 2 – Редукция экспрессии *WT1* в день 28±7 индукционного курса в группах риска.

Число степеней свободы- 2. Значение  $\chi^2$  - 9.21. Значение  $\chi^2$  при  $p=0,01$  - 10.608.  $p=0,005$

У 64,7 % (33/51) констатировано достижение ПР после курса индукции. В данной группе медиана экспрессии гена *WT1*, составила 66 копий /10<sup>4</sup> *ABL* (0,66-5622 копий /10<sup>4</sup> *ABL*). Суммарно после двух и более курсов ПР была достигнута у 86,3% (44/51).

У 69,7% (23/33) пациентов при достижении морфологической ремиссии отмечалось снижение уровня *WT1*  $\geq 2 \log$  от уровня определенного в дебюте. У 78,8% (26/33) уровень экспрессии *WT1* был в пределах нормальных значений.

При снижении экспрессии  $WT1 < 2 \log$ , у 92,9% (13/14) отмечалось развитие раннего рецидива заболевания в течение 6 месяцев. При снижении уровня  $WT1 \geq 2 \log$  развитие рецидива в течение первых 6 месяцев наблюдалось лишь у 27,3% (3/11) пациентов ( $p = 0,01$ ). Достижение редукции экспрессии  $WT1 \geq 2 \log$  после 1 курса терапии было ассоциировано с меньшей КЧР (31,6% против 43,5% ( $p=0,039$ ), большей продолжительностью БРВ и ОВ: 10,4 месяцев против 6,1 месяца ( $p=0,0001$ ) и недостижение медианы против 10,4 месяцев ( $p=0,006$ ) (рисунок 3).

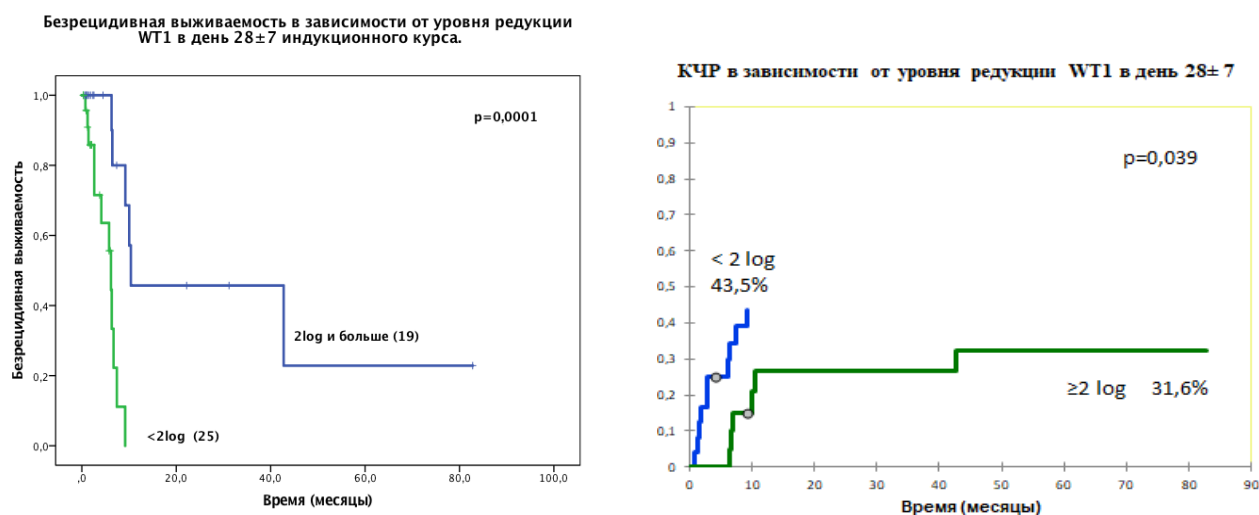


Рисунок 3 – БРВ и КЧР в зависимости от уровня редукции WT1 в день 28 ± 7

### Оценка степени редукции опухолевого объема на раннем этапе индукции

#### Влияние уровня редукции бластов в день 14 ± 3 дня на вероятность достижения ремиссии, безрецидивную и общую выживаемость

В анализируемую группу было включено 95 пациентов, которым была проведена оценка уровня бластов в день 14 ± 3. При морфологическом исследовании аспирата костного мозга средний уровень бластов составил 16%, медиана – 7% (0 – 96%).

Наибольшее прогностическое влияние на достижение ПР имел уровень 9,7% ( $p = 2,2e-8$ ; ДИ 95% (0,76-0,92); чувствительность-72%; специфичность-85%; ППК= 0,84), а на развитие раннего рецидива – 10,25% ( $p = 0,002$ ; отношение шансов с ДИ 95% 1,07(1,01-1,13); чувствительность – 54,2%; специфичность – 88,9%; ППК= 0,65). Для практического применения ПУ был определен как 10%. У 36,8% (35/95) пациентов уровень бластов был ≥10%. Частота достижения ПР после 1 курса была достоверно выше в группе пациентов с уровнем бластов менее 10% в день 14 ± 3: 83,3% (50/60) в сравнении с 25,7% (9/35) ( $p=0,0005$ ). Влияние на достижение ремиссии сохранялось и при проведении второго индукционного курса (таблица 2)

Таблица 2 – Достижение ремиссии в зависимости от редукции бластоза в день 14±3 первого индукционного курса

Полная ремиссия (ПР)	% бластов в день 14±3 первого курса		p
	≥10%	<10%	
После 1 курса % (n)	25,7% (9/35)	83,3 % (50/60)	0,0005
После 2-х и более курсов % (n)	62,9% (22/35)	91,7% (55/60)	0,002
Ранний рецидив (6мес.) % (n)	80% (12/15)	33,3% (12/37)	0,006

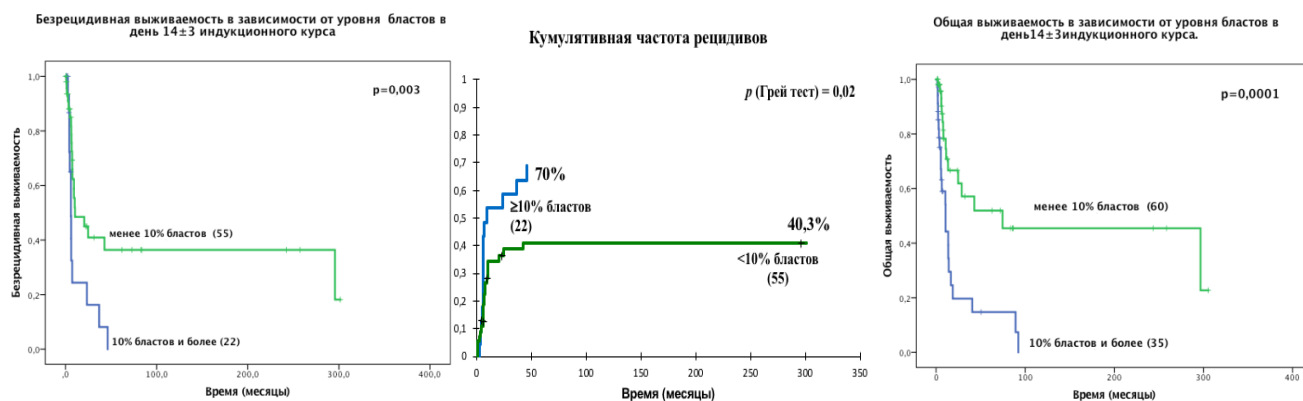


Рисунок 4 – Влияние на БРВ, КЧР и ОВ редукции уровня бластоза в день 14±3

Среди пациентов с бластозом выше ПУ и достигших ПР после 1 курса, после исключения пациентов, у которых в течение первых 6 месяцев была выполнена аллогенная ТГСК или наступил летальный исход, достоверно чаще развивались рецидивы в течение первых 6 месяцев: 80 % (12/15) в сравнении с 33,3% (12/37) при уровне бластов <10% (p=0,006). Сохранение уровня бластоза > ПУ в день 14±3 увеличивало КЧР (70,0% против 40,3%, p=0,002), ухудшало БРВ (медиана 5,9 месяцев против 10,4 месяцев, p=0,003) и ОВ (медиана 10,6 месяцев против 42,8 месяцев, p=0,0001) (рисунок 4). При сопоставлении полученных результатов с данными цитогенетического исследования была выявлена достоверная корреляция между сохранением уровня бластов в день 14±3 выше ПУ и выявлением прогностически неблагоприятных цитогенетических аномалий (рисунок 5).



Рисунок 5 – Редукция бластоза в день 14±3 в молекулярно-генетических группах риска. Число степеней свободы -2. Критическое значение  $\chi^2$  при p =0,01 - 9.21. Значение  $\chi^2$  – 11.685. (p=0,003)

В цитогенетических группах риска при уровне бластов в день  $14 \pm 3$  выше 10% также отмечался достоверно более низкий процент ПР (таблица 3). В группе высокого риска 10 из 22 пациентов следующим этапом после достижения ПР заболевания была выполнена аллогенная ТКМ. Учитывая небольшое количество пациентов, влияние уровня редукции бластоза на БРВ в высокой цитогенетической группе риска не оценивалось.

Таблица 3 – Достижение ПР в молекулярно-генетических группах риска в зависимости от уровня редукции бластоза в день  $14 \pm 3$  индукционного курса

Группа риска		ПР после 1 курса % (абс.)	p
Низкая группа риска	$\geq 10\%$	-	-
	$< 10\%$	100% (10/10)	
Промежуточная группа риска	$\geq 10\%$	37,5% (6/16)	$< 0.001$
	$< 10\%$	83,3% (30/36)	
Высокая группа риска	$\geq 10\%$	15,8% (3/19)	$0.005^1$
	$< 10\%$	71,4% (10/14)	

<sup>1</sup> Хи-квадрат с поправкой Йейтса.

Наибольшее количество пациентов в анализируемой группе имели нормальный кариотип или цитогенетические аномалии, не относящиеся к низкому или высокому риску – 54,7% (52/95). Сохранение уровня бластов  $\geq 10\%$  достоверно оказывало негативное влияние на БРВ и ОВ в промежуточной группе риска (рисунок 6). Из 30,8% (16/52) пациентов с бластозом  $\geq 10\%$ , ПР после 1 курса достигли 37,5% (6/16) пациентов, а после двух курсов – 75% (12/16). В группе с уровнем бластов  $< 10\%$ , частота ПР была значимо выше: 83,3% (30/36) пациентов достигли ремиссии после 1 индукционного курса. Суммарно в данной группе ПР была констатирована у 91,6% (33/36) пациентов. БРВ при уровне бластов  $< 10\%$  составила 20,5 месяцев в сравнении с 6,2 месяцами у пациентов с уровнем бластов  $\geq 10\%$  ( $p=0,038$ ). ОВ при уровне бластов  $< 10\%$  – 42,9 месяцев в сравнении с 10,6 месяцев при уровне бластов  $\geq 10\%$  ( $p=0,04$ ).

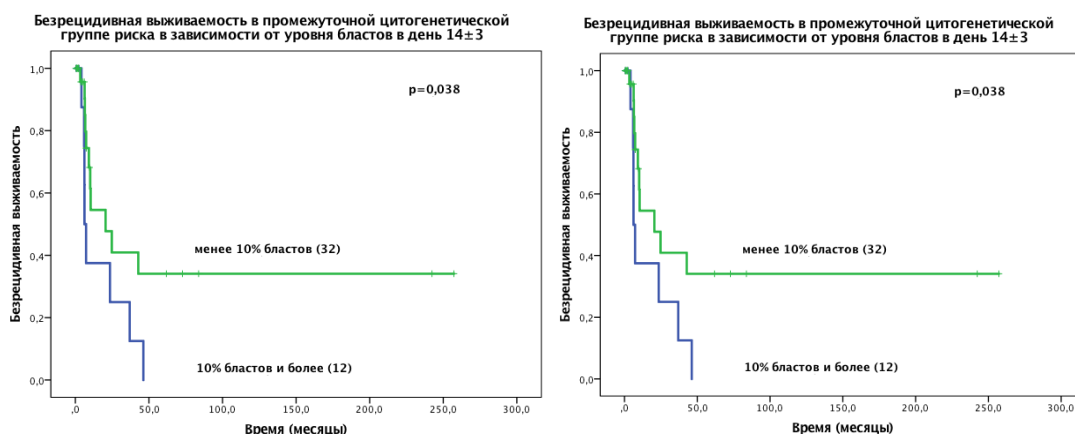


Рисунок 6 – Влияние уровня редукции бластов в день  $14 \pm 3$  на БРВ и ОВ в промежуточной группе риска

### Уровень экспрессии гена *WT1* в день 14 ±3 индукционного курса

Средний уровень *WT1* составлял 2327,7 копий /10<sup>4</sup> *ABL* (от 3,7 до 19257,7 копий /10<sup>4</sup> *ABL*), медиана – 846,25 копий/10<sup>4</sup>*ABL*. В группе пациентов, достигших ПР после 1 курса терапии наблюдалось статистически значимое отличие медиан экспрессии *WT1* на день 14±3 (513 против 3018 копий /10<sup>4</sup>*ABL*; Критерий Манна-Уитни  $p=0,025$ ).

Наибольшее прогностическое влияние на достижение ПР имел уровень 757,5 копий/10<sup>4</sup>*ABL* ( $p=0,003$ ; ДИ=95%(0,69-0,93); чувствительность-63,6%; специфичность-88,9%; ППУ= 0,81), однако, для прогнозирования БРВ и развития раннего рецидива достоверное прогностическое значение было определено для уровня 285,4 копий/10<sup>4</sup>*ABL* ( $p=0,000075$ ; ОШ=1,01(1-1,01); чувствительность-100% (80,6%-100%); специфичность-77,8% (45,3%-93,7%); ППК= 0,86). Для практического применения ПУ была выбрана верхняя граница нормальных значений – 250 копий/10<sup>4</sup>*ABL*. При проверке значимости выбранного ПУ значения чувствительности, специфичности и достоверности были аналогичными. Для оценки кинетики экспрессии *WT1*, степень редукции определялась как десятичный логарифм от отношения уровня выявленного в дебюте и в 14±3 день индукционного курса. Значимый ПУ был также определен методом ROC-анализа, а влияние на БРВ с помощью log-rank теста. Медиана составила 0.7lg (0,0-3,2). Прогностическую значимость имел уровень редукции 1,15lg с чувствительностью 93,8% и специфичностью 77,8% ( $p=0,0029$ , ОР=0,01).

Таблица 4 – Влияние ПУ *WT1* в день 14±3 на результаты терапии

Результат теста	>250копий <i>WT1</i> /10 <sup>4</sup> <i>ABL</i> % (абс.)	≤250 копий <i>WT1</i> /10 <sup>4</sup> <i>ABL</i> % (абс.)	<i>p</i>	>1,15lg % (абс.)	≤1,15lg % (абс.)	<i>p</i>
Ранний рецидив (6 мес.)	88,9% (16/18)	0% (0/7)	0,001 <sup>1</sup>	12,5%(1/8)	88,2%(15/17)	0,0021 <sup>1</sup>
Медиана БРВ	6,3 мес.	42,8 мес.	0,0003	42,3мес.	6,3мес.	0,0003
КЧР	60,7%	23,1%	0,01	46,7%	16,6%	0,016

<sup>1</sup> - Точный двусторонний критерий Фишера

После исключения пациентов, которым в течение первых 6 месяцев выполнялась аллоТКМ или наступил летальный исход, было выявлено достоверно большее количество ранних рецидивов при сохранении экспрессии *WT1* > 250 копий /10<sup>4</sup> *ABL* в день 14±3. Значения выше ПУ оказывали так же негативное влияние на КЧР, БРВ (таблица 4, рисунок 7).

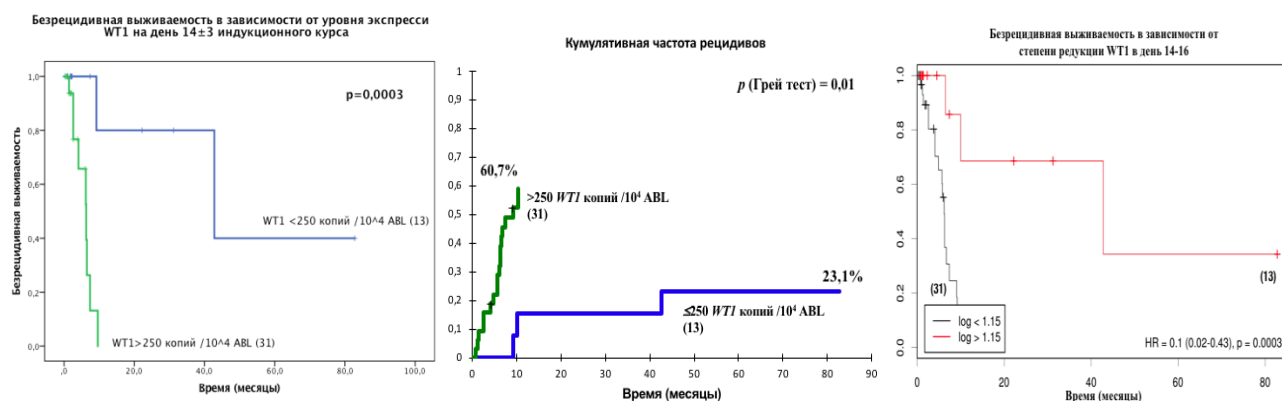




Рисунок 7 – БРВ, КЧР в зависимости от уровня редукции экспрессии WT1 в день 14±3

Медиана ОВ составила 10,4 месяцев против недостижения медианы в группе пациентов с  $WT1 < ПУ$  ( $p=0,009$ ). Т.о. складывается представление о сопоставимости двух анализируемых ПУ. При анализе уровня редукции в молекулярно-генетических группах риска, была выявлена корреляция частоты снижения уровня экспрессии  $WT1$  и группы риска (рисунок 8).

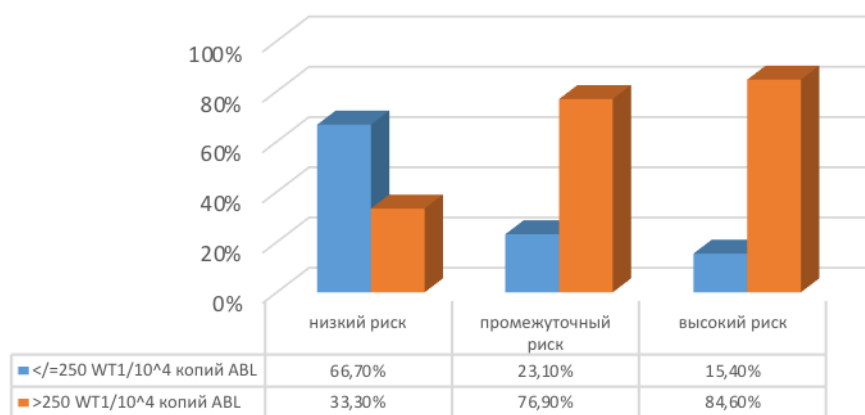


Рисунок 8 – Редукция экспрессии  $WT1$  в день 14±3 индукционного курса в группах риска. Критерий  $\chi^2$  Пирсона: Число степеней свободы – 2. Критическое значение  $\chi^2$  при  $p < 0,01$  - 9.21 Значение критерия  $\chi^2$  – 9.815 Уровень значимости  $p = 0,008$

При определении уровня экспрессии  $WT1$  в день 14±3 выявлена значимая гетерогенность групп промежуточного и низкого риска. ( $p=0,019$ ). Это позволило выделить среди групп низкого и промежуточного риска пациентов с наиболее неблагоприятным исходом. Несмотря на небольшое количество пациентов в группах, были выявлены статистически значимые отличия безрецидивной выживаемости: 9,2 месяца против 42,7 месяцев ( $p=0,01$  для уровня 250  $WT1$  копий / $10^4$  ABL) и 7,4 месяца против 42,8 месяцев ( $p=0,008$  для уровня редукции  $WT1 - 1,15\log$ ) в группе низкого риска. В группе промежуточного риска: 9,2 месяца и 6,2 месяцев ( $p=0,036$  для уровня 250  $WT1$  копий / $10^4$  ABL и  $p=0,032$  для редукции  $WT1 - 1,15\log$ ).

При количественном сравнении результатов морфологического и молекулярно-генетического определения опухолевого объема на раннем этапе индукции выявлена статистически значимая корреляция между уровнем бластов и экспрессией  $WT1$ , однако сила корреляционной связи была умеренная ( $R = 0,47$ ;  $p=0,0005$ ; ДИ 0,14 – 0,73). При проведении корреляционного анализа уровня экспрессии  $WT1$  в день 14±3 и в день 28±7 также была выявлена достоверная корреляция, сила связи была умеренная ( $R = 0,5$ ;  $p=0,0001$ ; ДИ 0,33 – 0,78.) В группе пациентов с сохранением  $WT1 > ПУ$  на фоне значимой редукции бластоза на день 14±3 достоверно чаще развивались рецидивы в течение первых 6 месяцев 84,6% (11/13) в сравнении с пациентами с нормализацией уровня  $WT1$  - 0% (0/7) ( $p = 0,002$ ) (таблица 5).

Таблица 5 – Вероятность развития раннего рецидива в группе пациентов с уровнем бластов менее 10%

$<10\%$ бластов (день 14)	$\le 250$ копий/ $10^4$ ABL	$>250$ копий / $10^4$ ABL	Двусторонний критерий Фишера

Рецидив в течение 6 месяцев	0% (0/7)	84,6% (11/13)	$p = 0,002$
-----------------------------	----------	---------------	-------------

### Сравнительная характеристика прогностических факторов

При сопоставлении информативности исследуемых прогностических тестов оценка уровня *WT1* в день  $14 \pm 3$  показала высокую чувствительность, специфичность и точность в сравнении с оценкой на день 28 и в сравнении с использованием оценки уровня бластога в день  $14 \pm 3$  индукционного курса (таблица 4).

Таблица 4 – Оценка чувствительности, специфичности и точности оценки уровня экспрессии гена *WT1* в день  $14 \pm 3$ , день  $28 \pm 7$ , и редукции бластога в день  $14 \pm 3$  индукционного курса для прогнозирования развития раннего рецидива заболевания

тест	Частота раннего рецидива	p	Чувствительность	Специфичность	Точность
Нет ПР после 1 курса	72,2%	0,0017	46,4%	89,8%	74%
Бласты >10% в КМ (д $14 \pm 3$ )	80%	0,006	54,2%	88,9%	81%
<i>WT1</i> <2log (д $28 \pm 7$ )	92,9%	0,036	81,2%	66,7%	84%
<i>WT1</i> <1,15log (д $14 \pm 3$ )	88,2%	0,002	93,8%	77,8%	88%

Для оценки значимости влияния на исход заболевания исследуемых факторов был проведен многофакторный анализ (таблица 5). Значимое влияние на БРВ оказали: группа риска заболевания ( $p=0,029$ ), уровень редукции *WT1* на день  $14 \pm 3$  индукционного курса ( $p=0,01$ ), уровень редукции *WT1* на день  $28 \pm 7$  индукционного курса <2log ( $p=0,027$ ). При многофакторном анализе, включающем ПУ *WT1* в день  $14 \pm 3$  250 копий/ $10^4$  ABL, были получены аналогичные результаты: группа риска заболевания  $p=0,026$  (ОР=2,5; ДИ 95,0% 1,1–5,6); сохранение > 250 копий *WT1*/ $10^4$  ABL на день  $14 \pm 3$  индукционного курса  $p=0,008$  (ОР=9,5; ДИ 95,0% 1,7–50,4) и редукция *WT1* на день  $28 \pm 7$  <2log,  $p=0,026$  (ОР=5,4; ДИ 95,0% 1,2–24,1). На общую выживаемость статистически значимое влияние оказал уровень редукции *WT1* на день  $14 \pm 3$  индукционного курса с  $p=0,033$ .

Таблица 5 – Анализ факторов, влияющих на прогноз ответа на терапию ОМЛ

Факторы оказывающие влияние	Однофакторный анализ, $p$		Многофакторный анализ, $p$			
			БРВ		ОВ	
	БРВ	ОВ	p	ОР (ДИ95,0%)	p	ОР (ДИ95,0%)
Группа риска	<b>0,026</b>	<b>0,01</b>	<b>0,029</b>	2,44 (1,1-5,4)	0,59	2,6 (0,9-7,0)
ПР после 1 курса	<b>0,009</b>	<b>0,000027</b>	0,87	1,50 (0,5-4,8)	0,159	4,3 (0,6-32,7)
>10% бластов (д14)	<b>0,003</b>	<b>0,0001</b>	0,078	3,49(0,9-13,4)	0,078	14,9 (0,7-31,6)
<i>WT1</i> день $28 \pm 7$	<b>0,0001</b>	<b>0,006</b>	<b>0,027</b>	5,35(1,2-23,7)	0,224	0,3 (0,04-2,2)
<i>WT1</i> день $14 \pm 3$	<b>0,0003</b>	<b>0,009</b>	<b>0,01</b>	9,19 (1,7-49,7)	<b>0,033</b>	7,8 (1,1-52,1)

Выявление одного или более прогностически значимых факторов (высокая молекулярно-генетическая группа риска, сохранение гиперэкспрессии гена *WT1* на  $14 \pm 3$  и  $28 \pm 7$  индукционного курса) определяло высокую частоту раннего рецидива, КЧР и короткую БРВ (рисунок 9).

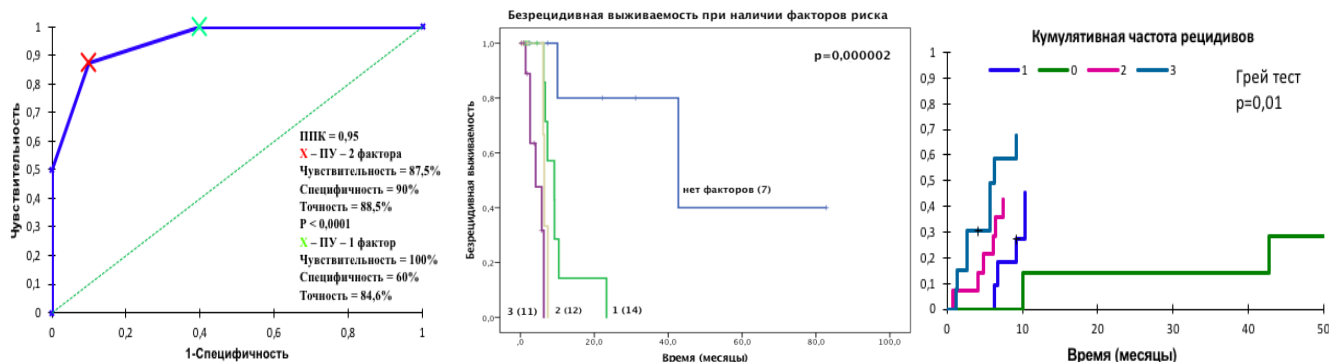


Рисунок 9 – Влияние факторов (высокая молекулярно-генетическая группа риска, сохранение гиперэкспрессии гена WT1 на 14±3 и 28±7 индукционного курса) на БРВ и вероятность развития раннего рецидива

Таблица 6 – Влияние количества факторов на вероятность развития раннего рецидива.

Количество факторов	Медиана БРВ (месяцы)	р	Частота ранних рецидивов	Значение $\chi^2$ – 17.309 Критическое значение $\chi^2$ – 11,345. Число степеней свободы 3. <b><math>p &lt; 0,001</math></b>
0	42,7	0,000002	0% (0/6)	
1	9,18		40% (2/5)	
2	6,46		85,7% (6/7)	
3	4,1		100% (8/8)	

Частота развития раннего рецидива достоверно отличалась в группах с разным количеством неблагоприятных факторов (таблица 6). Отличия БРВ в группах с 1 или 2 факторами не имели статистической достоверности ( $p=0,84$ ). Наиболее благоприятный прогноз с медианой БРВ 42,7 месяцев определен для группы пациентов низкого и промежуточного риска, с уровнем *WT1* на 14 и 28 день индукционного курса ниже определенных ПУ ( $p=0,005$ ).

## ВЫВОДЫ

1. Сохранение уровня бластов более 10% в раннем индукционном периоде является неблагоприятным фактором прогноза, влияющим на частоту достижения ПР (23,5% против 83%,  $p=0,0005$ ), развитие раннего рецидива (80% против 33,3%,  $p=0,006$ ), кумулятивную частоту рецидивов (40,3% против 70%,  $p=0,02$ ), БРВ и ОВ (медиана 5,9 месяцев против 10,4 месяцев,  $p=0,003$  и 10,6 месяцев против 42,8 месяцев,  $p = 0,0001$  соответственно). Определена достоверная корреляция между уровнем бластов в день 14±3 >10% и молекулярно-генетической группой риска заболевания ( $p=0,003$ ).

2. Выявление более 10% бластов в раннем индукционном периоде у пациентов ОМЛ промежуточного риска позволяет статистически достоверно выделить группу неблагоприятного прогноза с более короткой медианой БРВ и ОВ (6,2 месяцев против 20,5 месяцев ( $p=0,038$ ), и 10,6 месяцев против 42,9 месяцев соответственно ( $p=0,04$ ).

Оценка редукции бластога в раннем индукционном периоде является более чувствительным методом прогнозирования раннего рецидива в сравнении с фактором достижения ремиссии после первого индукционного курса ( $p=0,001$ ).

3. Сохранение высокого уровня *WT1* (отсутствие редукции на 2 и более  $\log$ ) на момент достижения морфологической ремиссии является фактором риска развития рецидива в течение 6 месяцев (92,9%, против 27,3%  $p=0,01$ ), высокой КЧР (60,7% против 23,1%,  $p=0,01$ ) и короткой БРВ (медиана 6,1 месяцев против 10,4 месяцев,  $p=0,0001$ ) и ОВ (медиана 10,4 месяцев против недостижения медианы,  $p=0,006$ ).

4. Отсутствие редукции уровня экспрессии гена *WT1* на 1,15 и более  $\log$  является высокочувствительным, специфичным фактором прогноза раннего рецидива (88,2% против 12,5%,  $p=0,002$ ) и позволяет идентифицировать пациентов с неблагоприятным прогнозом не только в общей группе (КЧР 46,7% против 16,6%,  $p=0,016$ ; медиана БРВ 6,3 месяцев против 42,8 месяцев,  $p=0,001$ , медиана ОВ 10,4 месяца против недостижения медианы,  $p=0,009$ ), но и среди пациентов промежуточной (медиана БРВ 6,2 месяцев против 9,2 месяцев,  $p=0,036$ ), низкой групп риска (медиана БРВ 9,2 месяцев против 42,7 месяцев,  $p=0,001$ ), и в группе с уровнем бластов менее 10% (частота раннего рецидива 84,6% против 0%,  $p=0,002$ ).

5. При многофакторном анализе, независимыми факторами риска, оказывающими влияние на БРВ, являлись молекулярно-генетическая группа риска ( $p=0,029$ ), уровень *WT1* на день  $14\pm 3$  ( $p=0,01$ ) и день  $28\pm 7$  индукционного курса ( $p=0,0267$ ). Наибольшее значение отношения рисков имел уровень редукции *WT1* на раннем этапе индукции ( $OR = 9,19$ ).

6. Использование молекулярно-генетического метода оценки редукции опухолевого объема на раннем этапе индукции и на этапе восстановления гемопоэза позволяет выделить среди пациентов низкого и промежуточного риска группу высокого риска развития раннего рецидива и короткой безрецидивной выживаемости.

7. Неадекватное цитостатическое воздействие на этапе индукции ремиссии приводит к значительному снижению частоты достижения ремиссии после 1 курса терапии (35,1% против 62,3%,  $p=0,006$ ) и ухудшению безрецидивной (медиана 12,2 месяцев против 8,5 месяцев,  $p=0,02$ ) и общей выживаемости (медиана 40,6 месяцев против 13,5 месяцев,  $p=0,022$ ).

Улучшение результатов терапии в данной группе удается достичь при использовании в качестве второго индукционного курса химиотерапии режимов с высокими дозами цитозара («FLAG») (достижение полной ремиссии 92,3% против 45,5%  $p=0,0039$ ).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

На этапе диагностики ОМЛ целесообразно включение в скрининговый поиск молекулярно-генетических аномалий, количественной оценки экспрессии гена *WT1* для последующего определения минимальной остаточной болезни и выявления группы неблагоприятного прогноза.

Проведение морфологического и молекулярно-генетического исследования костного мозга на раннем этапе индукции позволяет прогнозировать достижение ремиссии, а также развитие раннего рецидива у пациентов, достигших ремиссии после первого индукционного

курса.

При достижении редукции бластога (0-10%) рекомендуется оценка опухолевого объема молекулярно-генетическим методом. Выявление сохраняющейся повышенной экспрессии гена *WT1* позволяет стратифицировать пациентов в группу неблагоприятного прогноза.

Использование динамической оценки ответа на этапе индукции ремиссии с использованием мониторинга уровня экспрессии *WT1* позволяет выделить в группе низкого и промежуточного риска пациентов наиболее неблагоприятного прогноза, с риском развития рецидива заболевания в течение первых 6 месяцев.

Проведение в качестве второго индукционного курса режимов с высокодозным цитозаром («FLAG») рекомендовано в случае выявления использования на первом этапе терапии режимов отличающихся от стандартных. Это позволит увеличить вероятность достижения ремиссии.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Аникина, Н.А. Сопоставление эффективности различных режимов химиотерапии у больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ): роль интенсивности доз и экспрессии гена *MDR-1* / Н.А.Аникина, Н.В. Медведева, О.В. Маринец, Ю.В. Огородникова, Т.В. Быкова, О.И. Фролова, Л.Л. Пескина, Л.С. Зубаровская, Е.В. Кучинская, А.Ю. Зарицкий, Б.В. Афанасьев // Сборник научных трудов, посвященный 100-летию кафедры факультетской терапии имени академика Г.Ф. Ланга Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. Издательство: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова (Санкт-Петербург). – 2000, С.277-281

2. Гиршова, Л.Л. Прогностическая значимость редукции опухолевой массы на ранних сроках индукционного этапа терапии больных миелобластным лейкозом / Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Д.В. Моторин, Р.Ш. Бадаев, Д.Б. Заммиева, Ю.В. Миролюбова, К.В. Богданов, О.С. Писоцкая, Т.С. Никулина, Е.Н. Горюнова, А.В. Петров, Р.И. Вабищевич, О.В. Кулемина, Ю.А. Алексеева, А.Ю. Зарицкий // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т 63. – №1. – С.52.

3. Гиршова, Л.Л. Прогностическое значение и корреляция динамики гиперэкспрессии гена *WT1* и мутации гена *NPM1* у пациентов с острым миелобластным лейкозом / Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Е.Г. Овсянникова, С.О. Кузин, Д.В. Моторин, Р.Ш. Бадаев, Д.Б. Заммиева, В.В. Иванов, К.В. Богданов, О.С. Писоцкая, Ю.В. Миролюбова, Т.С. Никулина, Ю.А. Алексеева, А.Ю. Зарицкий // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т.10. – № 4. – С.485–493

4. Гиршова, Л.Л. Современные подходы к определению прогноза и персонализационной направленности терапии рецидивов острого миелобластного лейкоза / Л.Л. Гиршова, Е.Г. Романова, Е.Н. Горюнова, Р.И. Вабищевич, А.В. Петров, Д.В. Моторин, В.В. Иванов, И.В. Холопова, Т.С. Никулина, Ю.В. Миролюбова, Ю.А. Алексеева, А.Ю. Зарицкий // Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. – 2012. – Т. 6. – С.91–104.

5. Гиршова, Л.Л. Уровень минимальной остаточной болезни в постиндукционном периоде как предиктор БРВ больных ОМЛ с мутацией *NPM1* и экспрессией химерного гена *RUNX1-RUNX1T* / Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Д.В. Моторин, Р.Ш. Бадаев, Д.Б. Заммиева, Ю.В. Миролюбова, К.В. Богданов, О.С. Писоцкая, Т.С. Никулина, Е.Н. Горюнова, А.В. Петров, Р.И. Вабищевич, О.В. Кулемина, Ю.А. Алексеева, А.Ю. Зарицкий // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т 63. – №1. – С.19.

6. Гиршова, Л.Л. Эффективность применения терапии "FLAG" у больных рецидивным и рефрактерным ОМЛ / Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Д.В. Моторин, Р.Ш. Бадаев, Д.Б. Заммиева, Ю.В. Миролюбова, К.В. Богданов, О.С. Писоцкая, Т.С. Никулина, А.Ю. Зарицкий // Гематология и трансфузиология, 2018. – Т 63. – №1. – С.125.

7. Гиршова, Л.Л. Молекулярный мониторинг уровня транскрипта RUNX1-RUNX1T1 при острых миелобластных лейкозах на фоне терапии / Л.Л. Гиршова, Е.Г. Овсянникова, С.О. Кузин, Е.Н. Горюнова, Р.И. Вабищевич, А.В. Петров, Д.В. Моторин, Д.В. Бабенецкая, В.В. Иванов, К.В. Богданов, И.В. Холопова, Т.С. Никулина, Ю.В. Миролюбова, Ю.А. Алексеева, А.Ю. Зарицкий //Клиническая онкогематология. – 2016. – Т.9. – №4. – С.456–64.
8. Сиordia, Н.Т. Частота встречаемости гиперэкспрессии гена Wt1 у пациентов с миелоидными неоплазиями / Н.Т. Сиordia, Е.Н. Булычева, И.В. Холопова, Л.Л. Гиршова, Ю.А. Алексеева, Е.Г. Ломаиа, А.Ю. Зарицкий // Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. – 2012. –Т. 6. – С. 116–121.
9. Anikina, N. 6-year results of TAD redgimen in adult AML patient / N. Anikina, N. Medvedeva, A. Zaritskey, O. Marinets, **L. Peskina**, B. Afanasiev // Gene technology in analysis and treatment of malignant and inherited human diseases /Volga- Wielsede meeting. - 1998. – P.18
10. Girshova, L. MRD Level in NPM1 Mutated and RUNX1-RUNX1T1 Positive AML Predicts RFS and Defines Indications for ASCT / L. Girshova, I. Budaeva, S. Kuzin, E. Ovsiannikova, K. Bogdanov, T. Nikulina, J. Mirolubova, D. Motorin, A. Zaritskey // Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. – 2017. – September. – P.291–292
11. Girshova, L. High WT1 Expression in 2nd CR of AML Is Predictive for Early Relapse (prospective study). / L. Girshova, E. Romanova, I. Kholopova, T. Nikulina, J. Mirolubova, E. Gorunova, D. Motorin, A. Zaritskey // Blood. – 2012. – Vol.120. – P.4812
12. Girshova, L. Relevance of Molecular Monitoring of Transcript Level in RUNX1-RUNX1T1 AML / L. Girshova, E. Ovsiannikova, K. Bogdanov, S. Kuzin, A. Zaritskey // Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia September. – 2016. – С.30-31 DOI: 10.1016/j.clml.2016.07.044
13. Girshova L. WT1 on days 14 and 28 Predicts DFS in AML Patients with Both the Isolated NPM1 Mutation and NPM1 Mutation with Additional Molecular Markers / L. Girshova, I. Budaeva, S. Kuzin, E. Ovsiannikova, K. Bogdanov, T. Nikulina, J. Mirolubova, D. Motorin, A. Zaritskey // Ann Hematol. – 2017. – Vol. 96. – Suppl 1. – S.1–S89 DOI 10.1007/s00277-017-2921-1
14. Zaritskey, A. Comparison of the Efficacy of TAD-TAD and “7+3” Regimens in Adult AML, the Role of Dose Intensity and Mdr-1 Gene Expression / A. Zaritskey, N. Anikina, N. Medvedeva, O. Marinets, Yu. Ogorodnikova, T. Bykova, O. Frolova, **L. Peskina**, A. Klimovitch, T. Zabelina, L. Zoubarovskaya., E. Kuchinskaya, B. Afanasiev / Acute Leukemias VIII . – P. 464–469 DOI: 10.1007/978-3-642-18156-6\_75
15. Zaritskey, A. TAD-regimen in AML: 6-year experience / A. Zaritskey, N. Anikina, N. Medvedeva, L. Zoubarovskaya, O. Marinets, **L. Peskina**, T. Bykova, E. Kuchinskaya, B. Afanasiev // Annals of Haematology. – 1999. – Vol.78 (Suppl. II). – № 165.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БРВ – безрецидивная выживаемость

КЧР – кумулятивная частота рецидивов

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОВ – общая выживаемость

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПР – полная ремиссия  
ПУ – пороговый уровень  
ПЦР - полимеразная цепная реакция  
ТКМ - трансплантации костного мозга  
ХМЛ – хронический миелолейкоз  
ХТ - химиотерапия  
ЦГ – цитогенетика  
ELN - European LeukemiaNet (Европейская сеть по изучению лейкозов)  
FISH – флуоресцентная in situ гибридизация  
ЛАИФ - ассоциированный с лейкозом иммунофенотип  
NCCN - Национальная сеть многопрофильных онкологических учреждений США  
WT1 - ген супрессор опухоли Вильмса