

Міністерство охорони здоров'я України
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ВИННИЦЬКА ОЛЕНА АНДРІЇВНА

УДК: 616.155.392-02:[616.155.302:575.24]-036.11-053.2

ДИСЕРТАЦІЯ
ОСОБЛИВОСТІ МУТАЦІЙНОГО СТАТУСУ
ПРИ ГОСТРІЙ ЛІМФОБЛАСТНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ В ДІТЕЙ

228 – педіатрія

22 - охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ **О.А. Винницька**

**Науковий керівник: Дубей Леонід Ярославович, доктор медичних наук,
професор**

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Винницька О.А. Особливості мутаційного статусу при гострій лімфобластній лейкемії в дітей. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 228-Педіатрія (22 – Охорона здоров'я) – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. Львів, 2022.

Сучасна молекулярно-генетична діагностика гострої лімфобластної лейкемії (ГЛЛ) базується на визначенні специфічних генетичних порушень, які пов'язані зі злоякісною трансформацією клітин. Генодіагностика дозволяє не тільки аналізувати ступінь злоякісності процесу, але й проводити ранню ідентифікацію маркерів несприятливого прогнозу щодо перебігу хвороби, здійснювати ранню діагностику рецидивів, великою мірою вилучати фактор суб'єктивності в оцінці конкретного клінічного синдрому, що є вкрай важливим для вибору тактики лікування.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню імунофенотипування бластних клітин, спектра та експресії химерних генів, змін клініко-лабораторних показників у периферійній крові в порівнянні з показниками перебігу ГЛЛ у дітей. Проведена оцінка ролі маркерів молекулярно-генетичної діагностики ГЛЛ у дітей у перебігу захворювання та ефективності цитостатичної терапії ALLIC BFM-2009.

Встановлено, що в патогенезі ГЛЛ ключову роль відіграють генетичні порушення, які призводять до порушення процесів дозрівання і проліферації лімфоцитів, блокування нормальної регуляції функціонування генів. Показано, що визначальну роль у розвитку ГЛЛ відіграють хромосомні транслокації, які призводять до утворення химерних генів, серед яких чільне місце належить генам *AF4/MLL* t(4;11)(q23;p23), *BCR/ABL* t(9;22)(q34;q11), *E2A/PBX1* t(1;19)(q23;p13), *TEL/AML* t(12;21)(q13;q22). Продукти експресії цих генів володіють аберантною активністю. Хромосомні перебудови визначають

біологічні властивості лейкозних клітин, які обумовлюють імунологічні, морфологічні зміни бластів і клінічні особливості захворювання. У хворих ГЛЛ при цитогенетичному дослідженні клітин кісткового мозку клональні хромосомні перебудови простежували в 34,3 % випадків, тоді як у 65,7 % пацієнтів молекулярно-генетичних змін не було виявлено. У процесі дослідження встановлено, що найчастіше виявлялись химерні гени *AF4/MLL* (21 %) та *TEL/AML* (5,7 %), рідше *BCR/ABL* (2 %). Хоча транслокація *BCR/ABL* траплялась рідше, проте експресія цього гена була найвищою. Окрім того, при хромосомних транслокаціях *BCR/ABL* та *E2A/PBX1* рівень бластних клітин у кістковому мозку досягав показника вище 95 %.

У дисертаційному дослідженні показано прогностичне значення й терапевтичну стратегію хромосомних порушень під час та після проведення цитостатичної терапії ALLIC BFM-2009, а також при розвитку рецидивів.

У роботі доведено, що наявність морфологічної ремісії у хворих на ГЛЛ не завжди свідчила про повну редукцію пухлинного клону. Молекулярно-генетичні особливості бластних клітин служать основою для різних методів детекції малої кількості пухлинних клітин. До них належать метод стандартної цитогенетики й імунофлюоресцентна гібридизація (моніторинг різних хромосомних аберацій), проточна цитофлуорометрія (виявлення аберантного імунофенотипу), метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (визначення експресії химерних онкогенів). Одним із прогностичних критеріїв розвитку рецидивів при ГЛЛ є виявлення мінімальної резидуальної хвороби (MRD), яку можна контролювати на різних етапах терапії. Моніторинг пухлинних маркерів під час і після хіміотерапії істотно підвищить її ефективність і дозволить передбачити розвиток рецидивів або навіть запобігти їхній появі.

Застосування цитостатичної терапії ALLIC BFM 2009 у 88 % пацієнтів призводило до повної ремісії, а у 12 % дітей виявляли рецидив захворювання. В основі виникнення рецидивів лежить персистенція залишкових лейкемічних клітин. Визначення MRD як незалежного критерію оцінки відповіді організму дитини на терапію в пацієнтів із повною ремісією показало зниження показника

в динаміці проведення хіміотерапії з мінімальними значеннями після закінчення курсу. Водночас у пацієнтів із високим рівнем MRD виявлений рецидив захворювання. Окрім того, значення MRD безпосередньо корелювало з виживанням пацієнтів. Так, у пацієнтів із підвищеним рівнем MRD знижувалося безрецидивне та безподійне виживання.

Уперше проведено комплексне вивчення імунофенотипу бластних клітин залежно від розвитку рецидиву та повної ремісії. Дослідження антигенного складу бластних клітин після проведення ALLIC-BFM 2009 цитостатичної терапії в пацієнтів із рецидивами показало високий рівень імунофенотипу лінійно-незалежних лімфобластів – експресію CD34, HLA, Anti-TdT, CD10 та CD38. Наявність маркера CD38 не пов'язана з клінічною картиною, що спостерігається при ГЛЛ та не впливає на загальне виживання хворих. У пацієнтів із ГЛЛ виявлена експресія мієлоїдних маркерів CD33 та CD13, наявність яких пов'язується із виживанням пацієнтів. У роботі показано, що триваліше виживання хворих на ГЛЛ співвідносилось з експресією на бластних клітинах CD13, тоді як експресія CD33 на бластних клітинах свідчила про низьке безрецидивне та безподійне виживання хворих на ГЛЛ.

У роботі підтверджено відому думку про залежність перебігу захворювання від наявності хромосомних транслокацій. Лікування в пацієнтів із транслокаціями та без них не показало змін середнього значення кількості лейкоцитів (становило 3 Г/л), тоді як максимальне значення кількості лейкоцитів у пацієнтів із транслокаціями перебувало на рівні 38 Г/л, а в пацієнтів за умови відсутності транслокацій – на рівні 102 Г/л. Відхилення кількості лейкоцитів від середнього арифметичного пов'язані з видом хромосомної аберації, бо найвище коливання кількості лейкоцитів у крові спостерігалось у пацієнтів із *BCR/ABL* химерним геном.

Аналіз молекулярно-генетичних показників, одержаних під час виконання дисертаційної роботи, підтверджував залежність розвитку рецидивів від наявності тієї чи іншої хромосомної аберації. З отриманих даних видно, що визначальну роль у розвитку рецидивів ГЛЛ мали досліджувані три хромосомні

транслокації відповідних локусів хромосом – *AF4/MLL* t(4;11)(q23;p23), *BCR/ABL* t(9;22)(q34;q11), *E2A/PBX1* t(1;19)(q23;p13), рівень яких становив 9 %. Ген *TEL/AML* t(12;21)(q13;q22) у пацієнтів із рецидивами не був ідентифікований.

Клітини лейкемічного клону можуть мати нестабільний геном, у результаті чого в химерних генах *AF4/MLL*, *BCR/ABL* та *E2A/PBX1* відбуватимуться мутації, які призведуть до зміни конформації онкогенних білків, то в цьому випадку цитостатики втрачають здатність блокувати онкогени та посилену проліферацію клітин, які, у свою чергу, набувають резистентності до хіміопрепаратів.

Молекулярно-генетичне дослідження кісткового мозку пацієнтів із ГЛЛ за допомогою ПЛР у реальному часі показало, що найвища експресія спостерігається в онкогена *BCR/ABL*, бо виявлено $4,2 \pm 0,65 \times 10^{-3}$ копій мРНК відносно контрольного гена *ABL1*. Встановлений факт вказував, що ген *BCR/ABL* є ключовим патогенетичним фактором розвитку переважної кількості випадків ГЛЛ у дітей. Після цитостатичної терапії в пацієнтів із виявленими рецидивами захворювання його рівень знижувався незначно – у 2,3 рази, тоді як у пацієнтів із повною ремісією знижувався у 20 разів. Тенденція таких змін впливає на виживання пацієнтів, бо виявлена залежність безрецидивного виживання від наявності певної хромосомної аберації. У роботі показано, що найнижче безрецидивне виживання (найвища летальність) спостерігалось у пацієнтів, у яких виявили транслокацію *BCR/ABL*, бо через 2 роки після хіміотерапії зафіксована смертність хворих. На другому місці за найнижчим виживанням були пацієнти із виявленим химерним геном *AF4/MLL*, у яких смертність зафіксована на 4-му році життя. Найвищий показник безрецидивного виживання спостерігався в пацієнтів із наявною в геномі транслокацією *TEL/AML* (100 % виживання) та в пацієнтів із виявленим химерним геном *E2A/PBX1* (безрецидивне виживання перебувало на рівні 80 %). Однак є низка хромосомних аберацій, прогностичне значення яких ще не встановлено.

Отже, у дисертаційній роботі підкреслено важливість цитогенетичного дослідження, бо розуміння молекулярних і генетичних механізмів розвитку ГЛЛ призводить до створення нових диференційованих підходів до лікування конкретного біологічного варіанта ГЛЛ. Крім того, прогрес у терапії ГЛЛ досягається за допомогою впровадження нових препаратів, які безпосередньо діють на гени мішені.

У роботі на основі отриманих даних розширено спектр генетичних критеріїв прогнозування перебігу захворювання ГЛЛ і розвитку рецидивів. Удосконалено оптимальну схему досліджень генетичних порушень у дітей із ГЛЛ.

Ключові слова: гостра лімфобластна лейкемія в дітей, химерні гени *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1*, *TEL/AML*, молекулярно-генетичні зміни, бластні клітини, лейкоцити, транслокація.

ABSTRACT

Vynnytska O. A. Features of mutational status in childhood acute lymphoblastic leukemia. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 228 - pediatrics (22 – Healthcare). – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2022.

Modern molecular genetic diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) is based on the identification of specific genetic disorders that are associated with malignant cell transformation. Genodiagnostics allows not only to analyze the degree of malignancy of the process, but also to conduct early identification of markers of unfavourable prognosis for the course of the disease, to conduct early diagnosis of relapses, largely remove the subjectivity factor in assessing a particular clinical syndrome, which is crucial for treatment tactics.

The dissertation is devoted to the study of blast cell immunophenotyping, spectrum and expression of chimeric genes, changes in clinical and laboratory parameters in peripheral blood in comparison with the indicators of the course of

childhood ALL. The role of markers of molecular genetic diagnosis of childhood ALL caused by disease and the effectiveness of cytostatic therapy ALLIC BFM-2009 was evaluated.

It is established that genetic disorders play a key role in the pathogenesis of ALL, which leads to disruption of the processes of maturation and proliferation of lymphocytes, blocking the normal regulation of gene function. It is shown that chromosomal translocations play a key role in the development of ALL, which lead to the formation of chimeric genes, among which the prominent place belongs to the genes *AF4/MLL* t (4; 11) (q23; p23), *BCR/ABL* t (9; 22) q34; q11), *E2A/PBX1* t (1; 19) (q23; p13), *TEL/AML* t (12; 21) (q13; q22). The expression products of these genes have aberrant activity. Chromosomal rearrangements determine the biological properties of leukemic cells, which determine the immunological, morphological and clinical features of the disease. In patients with ALL cytogenetic examination of bone marrow cells clonal chromosomal rearrangements are detected in 34,3 % of cases, while in 65,7 % of patients no molecular genetic changes were detected. The study found that the most common are chimeric genes *AF4/MLL* (21 %) and *TEL/AML* (5,7 %), less *BCR/ABL* (2 %). Despite the fact that *BCR/ABL* translocation is less common, expression of this gene is highest. In addition, in the case of chromosomal translocations *BCR/ABL* and *E2A/PBX1*, the level of blast cells in the bone marrow reaches above 95 %.

The dissertation research shows the prognostic value and therapeutic strategy of chromosomal disorders during and after cytostatic therapy ALLIC BFM-2009, as well as in the case of relapse.

Study shows that the presence of morphological remission in patients with ALL does not always indicate a complete reduction of the tumor clone. Molecular genetic features of blast cells underlie various methods of detecting a small number of tumor cells. These include the method of standard cytogenetics and immunofluorescence hybridization (monitoring of various chromosomal aberrations), flow cytometry (detection of aberrant immunophenotype), the method of polymerase chain reaction (PCR) (determination of the expression of chimeric

oncogenes). Detection of minimal residual disease (MRD) at different stages of therapy is a favorable prognostic factor for recurrence. Therefore, the use of tumor markers for monitoring significantly increases its reliability and prevents false negative results.

The use of cytostatic therapy ALLIC BFM 2009 in 88 % of patients leads to complete remission, and 12 % of children have a recurrence of the disease. The basis of recurrence is the persistence of residual leukemic cells. The definition of MRD as an independent criterion for assessing the child's response to therapy in patients with complete remission showed a decrease in the dynamics of chemotherapy with minimal values after the end of chemotherapy. At the same time, in patients who subsequently recurred, MRD remained high, indicating a risk of tumor clone growth. The value of MRD is directly related to patient survival, as increasing MRD reduces the recurrence and eventless survival of patients. A similar pattern is observed with the level of blast cells: in patients in whom the level of blast cells was high during cytostatic therapy, subsequently relapse-free and eventless survival decreased.

For the first time, a comprehensive study of the immunophenotype of blast cells depending on the development of relapses and complete remission was conducted. Study of blast cell antigenic composition after ALLIC-BFM 2009 cytostatic therapy in patients with relapses showed a high level of immunophenotype of linearly independent lymphoblasts – expression of CD34, HLA, Anti-TdT, CD10 and CD38. The presence of the CD38 marker is not related to the clinical picture observed in ALL and does not affect the overall survival of patients. Expression of the myeloid markers CD33 and CD13 has been reported in patients with ALL, which has been linked to patient survival. The longer survival of patients with ALL was shown to correlate with the expression on CD13 blast cells, while the expression of CD33 on blast cells indicates low recurrence-free and eventless survival of patients with ALL.

The study confirms the existing opinion about the dependence of the disease on the presence of chromosomal translocations. Treatment in patients with and without translocations did not show changes in the mean leukocyte count (3g/L), whereas the

maximum leukocyte count in patients with translocations was 38 g/L, and in patients without translocations – at levels of 102 g/L. Deviations in the number of leukocytes from the arithmetic mean are associated with the type of chromosomal aberration, as the highest fluctuations in the number of leukocytes in the blood are observed in patients with the BCR / ABL chimeric gene.

Analysis of molecular genetic parameters obtained during the dissertation confirms the dependence of recurrence on the presence of a chromosomal aberration. The obtained data show that the key role in the development of ALL recurrences is played by the three chromosomal translocations of the corresponding chromosome loci studied by us – *AF4/MLL* t (4; 11) (q23; p23), *BCR/ABL* t (9; 22) (q34; q11), *E2A/PBX1* t (1; 19) (q23; p13), the level of which is 9 %. The *TEL/AML* t (12; 21) gene (q13; q22) has not been identified in recurred patients.

Because leukemic clone cells may have an unstable genome, resulting in mutations in the chimeric *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, and *E2A/PBX1* genes that alter the conformation of oncogenic proteins, cytostatic loses the ability to block oncogenes and enhance proliferation, which, in turn, become resistant to chemotherapeutics. Molecular genetic study of the bone marrow of patients with ALL by real-time PCR showed that the highest expression is observed in the oncogene *BCR/ABL*, as found $4.2 \pm 0.65 \times 10^{-3}$ copies of mRNA relative to the control gene *ABL1*. The established fact indicates that the *BCR/ABL* gene is a key pathogenetic factor in the development of the vast majority of cases of childhood ALL. About what after cytostatic therapy at patients with the revealed recurrences of a disease its level decreases insignificantly – in 2,3 times whereas at patients with complete remission decreases in 20 times. The trend of such changes affects the survival of patients, as the dependence of relapse-free survival on the presence of a certain chromosomal aberration. The paper showed that the lowest recurrence-free survival (highest mortality) was observed in patients with BCR/ABL translocation, because 2 years after chemotherapy, mortality was recorded. In second place for the lowest survival were patients with the detected chimeric *AF4/MLL* gene, in which mortality was recorded in the 4th year of life. The highest rate of recurrence-free survival was observed in patients with genome

TEL/AML translocation (100 % survival) and in patients with the detected chimeric *E2A/PBX1* gene (recurrence-free survival was 80 %). However, there are a number of chromosomal aberrations, the prognostic value of which is not fully established.

Thus, the dissertation thesis emphasizes the importance of cytogenetic research, as understanding the molecular and genetic mechanisms of ALL development leads to the creation of new differentiated approaches to the treatment of a specific biological variant of ALL. In addition, progress in the treatment of ALL is being achieved through the introduction of new drugs that act directly on the target genes. Based on the obtained data, the range of genetic criteria for predicting the course of ALL disease and predicting the development of recurrence cases is expanded. The optimal scheme of research of genetic disorders among children with ALL has been developed.

Key words: childhood acute lymphoblastic leukemia, chimeric genes *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1*, *TEL/AML*, molecular genetic changes, blast cells, leukocytes, translocation.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

Праці, які відображають основні наукові результати дисертації:

1. Винницька О. А., Дубей Н. В., Дорош О. І., Дубей Л. Я. Перспективи розвитку дослідження мутаційного статусу в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями. *Український медичний часопис*. 2018; Т. 2 – IX/X. 5(127):24-27. <https://www.umj.com.ua/article/131015/perspektivi-rozvitku-doslidzhennya-mutatsijnogo-statusu-v-ditej-iz-gostrimi-limfoblastnimi-lejkemiyami>. (Здобувачу

належить проведення аналізу науково-фахової літератури, опрацювання та узагальнення отриманих даних, формулювання основних висновків роботи та написання статті. Співавтори надавали консультативну допомогу).

2. Vynnytska O.A. ,Dubey L. Ya. Expression of chimeric genes in bone marrow cells of children with acute lymphoblastic leukemia upon cytostatic therapy. *Biopolymers and Cell*.2022;Vol;38(1):17-25. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A70>

(Здобувач проводив збір матеріалу, брав участь у клінічних дослідженнях, статистичному аналізі, опрацюванні та узагальненні отриманих даних, сформулював висновки роботи та підготував статтю до друку. Співавтор надавав консультативну допомогу).

3. Винницька О. А., Дубей Н. В., Дорош О. І., Дубей Л. Я. Імунофенотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої лімфобластної лейкемії у дітей. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021;6(1):56-64. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.01.056> (Здобувач проводив збір матеріалу, брав участь у клінічних дослідженнях, статистичному аналізі, опрацюванні та узагальненні отриманих даних, сформулював висновки роботи та підготував статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).

4. Винницька О. А. Молекулярно-генетичні механізми розвитку гострої лімфобластної лейкемії у дітей та їх корекція ALLIC BFM 2009 цитостатичною терапією. *World Science*. 2021;1(62):10-18. DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws (Здобувач проводив збір матеріалу, його аналіз, підготував статтю до друку).

5. Винницька О. А., Дубей Л. Я., Дубей Н. В., Дорош О. І. Роль молекулярно-генетичних транслокацій у первинній відповіді на лікування дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію, за програмою ALLIC BFM

2009. *Вісник проблем біології і медицини. Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021;Т.6 (3): 162-169. DOI: 10.26693/jmbs06.03.162. (Здобувач проводив збір матеріалу, його аналіз, підготував статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).

6. Винницька О. А., Дубей Л. Я., Дубей Н. В., Дорош О. І. Взаємозв'язок генетичних відхилень з лабораторними показниками периферичної крові та кісткового мозку в дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію. *Буковинський медичний вісник. Український науково-практичний журнал*. 2021; Т. 25; 1(97):11-18. (Здобувач проводив збір матеріалу, брав участь у клінічних дослідженнях, статистичному аналізі, опрацюванні та узагальненні отриманих даних, сформулював висновки роботи та підготував статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).

7. Vynnytska O. A. Forecast value of separate clinical and laboratory indicators acute lymphoblastic leukemia in children received cytostatic therapy ALLIC BFM 2009 *Клінічна Онкологія*.2021; Т.11№1-2:33-40. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.41-1.28120 (Здобувачу належить проведення аналізу науково-фахової літератури, опрацювання та узагальнення отриманих даних, формулювання основних висновків роботи та написання статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. Винницька О. А. Сучасний стан проблеми та особливості прогностичних критеріїв гострих лейкемій у дітей. *Науково-практична конференція «Інноваційні пріоритети розвитку наукових знань»*. Київ, 29–30 березня 2019 року. С. 84–87. (abstract).

9. Дорош О. І., Винницька О. А., Дубей Л. Я, Іваненко А. Л., Вовк З. В., Гнатюк М., Дубей Н. В. Молекулярно-генетичні особливості гострої лімфобластної лейкемії у дітей та їхнє прогностичне значення. *XVIII Конгрес СФУЛТ*. Львів, 1–3 жовтня 2020 року. С. 136. (abstract).

10. Винницька О. А. Перспективи дослідження мутаційного статусу в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями. *XXIII Міжнародний медичний*

конгрес студентів і молодих вчених. Тернопіль, 15–17 квітня 2019 року. С. 164–165. (abstract).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	Error! Bookmark not defined.
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ОСОБЛИВОСТІ ПРОГНОСТИЧНИХ КРИТЕРІЇВ ГОСТРИХ ЛЕЙКЕМІЙ У ДІТЕЙ.....	24
1.1. Розповсюдженість гострих лімфобластних лейкемій у дітей.....	24
1.2. Клініко-епідеміологічна характеристика та клінічний поліморфізм лімфобластних лейкемій.....	29
1.3. Генні трансформації в дітей із гострими лімфобластними лейкеміями.....	40
1.4. Імунофенотипова діагностика та молекулярно-генетичний аналіз гострих лейкемій.....	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	56
2.1. Характеристика хворих.....	56
2.2. Методи дослідження.....	61
РОЗДІЛ 3. ЗАГАЛЬНА ІМУНОФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА БЛАСТНИХ КЛІТИН.....	68
3.1. Клініко-лабораторні особливості прогнозу перебігу ГЛЛ у дітей.....	68
3.2. Характеристика бластних клітин при рецидиві.....	77
3.3. Імунофенотипова класифікація ГЛЛ у дітей.....	89
РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БЛАСТНИХ КЛІТИН І ПЕРЕБІГ ХВОРОБИ.....	98
4.1. Клініко-лабораторні особливості ГЛЛ у дітей залежно від виявлених молекулярно-генетичних транслокацій.....	98
4.2. Окремі молекулярно-генетичні транслокації у дітей з ГЛЛ.....	105
УЗАГАЛЬНЕННЯ Й ОБГОВОРЕННЯ.....	119
ВИСНОВКИ.....	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	135
ДОДАТКИ.....	Error! Bookmark not defined.1

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ГЛЛ – гостра лімфобластна лейкемія
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- ІФА – імунофементний аналіз
- ВООЗ – Всесвітня Організація Охорони Здоров'я
- УЗД – ультразвукове дослідження
- ОГК – органи грудної клітки
- ЦНС – центральна нервова система
- ГРВІ – гостра респіраторна вірусна інфекція
- ТКМ – трансплантація кісткового мозку
- ЗТ-ПЛР – зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція
- КТ – комп'ютерна томографія
- МРТ – магнітно-резонансна томографія
- НК – natural killer cells
- CD – кластер диференціації лімфоцитів
- В – В лімфоцити
- Т - Т лімфоцити
- IgM – імуноглобулін класу М
- мРНК – мікро РНК
- MRD- minimal residual disease, мінімальної залишкова хвороба
- BFM-SG - Berlin-Frankfurt-Munster Study Group, дослідницька група Берлін-Франкфурт-Мюнстер
- COALL -Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, гостра лімфобластна лейкемія у дітей
- EGIL - European Group of Immunological Markers for Leukemias
- AIEOP - Italian Pediatric Hematology Oncology Association, Італійська дитяча гематологічна онкологічна асоціація;

ГВР - групи високого ризику

PRED - преднізолонова префаза

АКБ - абсолютна кількість бластів

ПК - периферійна кров

ГПР - група проміжного ризику

ГСР - група стандартного ризику

ГВР - група високого ризику

ПВП - погана відповідь на преднізолон

МТХ - доза метотрексату

КМ - кістковий мозок

NR - «non responder», без відповіді на лікування

МКАТ - моноклональні антитіла

ССР - повна комплексна (клініко-гематологічна) ремісія

ВСТУП

Гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) - найбільш поширене онкологічне захворювання дитячого віку. Серед злоякісних новоутворень кровотворної й лімфоїдної тканин, що займають половину усіх злоякісних пухлин, на лейкемію в дитячому віці припадає 38 % [24], що складає більш ніж 1/3 нових випадків пухлинних захворювань, які виникають щорічно в дітей. За даними ВООЗ у 2020 році захворюваність складала близько 4-5 випадків на 100000 дитячого населення, а пік захворюваності ГЛЛ у дітей відповідає дошкільному віку (2-5 років при медіані 4,7 років) [1].

Із введенням сучасних діагностичних, прогностичних і терапевтичних підходів результати терапії дитячої ГЛЛ значно покращилися – ефективність лікування сягає 90 %. Усе ж у частини дітей – 10-20 %, реєструють рецидиви. Такі випадки потребують вирішення питання модифікації терапії з індивідуальним підходом до пацієнта та застосування адекватної цитостатичної поліхіміотерапії, однією з яких є BFM – ALLIC-BFM 2009. Застосування протоколу лікування дітей із ГЛЛ міжнародної групи BFM – ALLIC-BFM 2009 ґрунтується на імуноцитологічному визначенні мінімальної залишкової хвороби (minimal residual disease (MRD)), що дозволяє віднести пацієнтів до тієї чи іншої групи ризику. Впровадження такого моніторингу дало б змогу індивідуалізувати терапію кожного окремого пацієнта з поліпшенням загального результату його лікування [2].

Походження лейкемічного клону при ГЛЛ відбувається з лімфоїдних клітин-попередників В- чи Т-лімфоцитів, тому в основі діагностики й класифікації гострих лейкозів можуть лежати цитологічні та цитохімічні ознаки бластних клітин [3]. У моніторингу наявності лейкозних лімфобластів важливу роль відіграє імунофенотипування кісткового мозку, яке не тільки дасть можливість з'ясувати походження неопластичного процесу, але й дозволить проаналізувати ефективність застосованої цитостатичної хіміотерапії [4, 5].

З іншого боку, причиною формування злоякісного клону можуть бути генні мутації, хромосомні аберації, блокування регуляції функціонування генів [7, 8]. Серед найпоширеніших генних мутацій, що виявляються при ГЛЛ, є хромосомні транслокації, серед яких найчастіше трапляються *AF4/MLL* $t(4;11)(q23;p23)$, *BCR/ABL* $t(9;22)(q34;q11)$, *E2A/PBX1* $t(1;19)(q23;p13)$, *TEL/AML* $t(12;21)(q13;q22)$ [3]. Відкритими залишаються питання діагностичного й прогностичного значення химерних генів *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML* у перебігу гострих лейкемій у дітей. Тому проведення молекулярно-генетичної діагностики ГЛЛ у дітей є досить актуальним, бо дає змогу провести моніторинг лікувальної хіміотерапії та на ранньому етапі прогнозувати рецидиви захворювання. Окрім того, залишаються незрозумілими механізми участі химерних протеїнів, що кодуються гібридними генами *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML*, у розвитку ГЛЛ в дитячому віці. Розуміння молекулярно-генетичних механізмів розвитку ГЛЛ дозволить встановити ступінь злоякісності процесу та виявити групу ризику щодо рецидивів, що дасть можливість вибрати відповідну схему хіміотерапії.

Дисертаційна робота є фрагментом наукових досліджень Львівського національного медичного університету (ЛНМУ) імені Данила Галицького та складовою частиною науково-дослідних тем кафедри педіатрії і неонатології факультету післядипломної освіти «Характеристика перинатальної патології, імунopatологічних станів та впливу екзогенних чинників на стан здоров'я і якість життя дітей з різних груп» (№ держреєстрації 0114U000108) «Вивчення впливу екологосоціальних та мікросоціальних чинників на розвиток патологічного стану у дітей шляхом удосконалення методів ранньої діагностики лікування та профілактики.» (№ держреєстрації 0119U100141) Тема дисертаційної роботи затверджена кафедрою педіатрії і неонатології ФПДО ЛНМУ імені Данила Галицького (протокол № 1 від 03 жовтня 2017 р.); Вченою радою ФПДО ЛНМУ ім. Д. Галицького, (протокол №03/11-17 від 22 листопада 2017 року).

До теми внесені певні уточнення, за погодженням з науковим керівником, які також уже затверджені Вченою радою ФПДО (протокол № 05/11 від 18 листопада 2020 року). Отже, затверджена тема дисертаційної роботи: «Особливості мутаційного статусу при гострій лімфобластній лейкемії у дітей».

Мета дослідження. Удосконалити моніторинг перебігу гострої лімфобластної лейкемії у дітей на підставі вивчення імунофенотипових та молекулярно-генетичних змін у клітинах крові, пов'язаних з хворобою.

Завдання дослідження.

1. Визначити клініко-лабораторні показники в периферійній крові дітей з ГЛЛ, які отримали цитостатичну терапію ALLIC BFM-2009, та проаналізувати їхнє прогностичне значення в розвитку рецидивів.

2. Надати імунофенотипову характеристику бластних клітин у дітей з ГЛЛ на етапі встановлення діагнозу хвороби та при розвитку рецидивів після проведення цитостатичної терапії ALLIC BFM-2009.

3. Проаналізувати показник MRD у дітей з ГЛЛ і встановити його прогностичність у розвитку рецидиву, а також з'ясувати його зв'язок з імунофенотиповим профілем ГЛЛ.

3. Дослідити спектр та експресію химерних генів як маркерів молекулярно-генетичної діагностики ГЛЛ у дітей.

4. З'ясувати прогностичне значення молекулярно-генетичних змін у клітинах лейкемічного клону щодо перебігу захворювання та ефективності цитостатичної терапії.

Об'єкт дослідження – гостра лімфобластна лейкемія в дітей.

Предмет дослідження – імунофенотипові та молекулярно-генетичні зміни у клітинах крові при ГЛЛ у дітей.

Методи дослідження: загальноклінічні (оцінка стану здоров'я дітей, клінічних та анамнеситичних даних, аналіз програм лікування), гематологічний (дослідження периферійної крові), морфологічний (морфологічна оцінка бластних клітин за FAB-класифікацією), цитохімічний (дослідження цитоплазматичних маркерів мієлоїдного та лімфоїдного паростків гемо- та

лімфопоезу), імунофенотиповий (дослідження мембранних антигенів клітин кісткового мозку, що визначають їх лінійну та диференційну приналежність), молекулярно-генетичний (визначення генних гібридів за допомогою FISH-дослідження, визначення рівня експресії генів полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР), статистичний (математична обробка отриманих результатів, визначення кривих виживання).

Наукова новизна отриманих результатів.

Доповнено наукові дані щодо лікування дітей з ГЛЛ за протоколом ALLIC BFM-2009 в умовах України, і проаналізовано прогностичні критерії перебігу хвороби з використанням показника MRD, а також молекулярно-генетичних досліджень, що буде корисним для науковців при виборі інструментів у проведенні подібних досліджень.

Вперше у вітчизняній медицині встановлено, що розвиток рецидиву вищий у тих дітей з ГЛЛ, у яких після завершення цитостатичної терапії рівень MRD на 15 день захворювання складав 1 % і більше, порівняно з пацієнтами, чий рівень MRD був менше 1 % – у цієї групи пацієнтів спостерігалася повна ремісія.

Доведено, що у дітей рецидивом ГЛЛ наявні імунофенотипові аберації, не властиві нормальним гемопоетичним клітинам. Асинхронна експресія маркерів диференціювання спостерігається в більшості випадків дітей з рецидивом ГЛЛ, що необхідно враховувати при моніторингу хворих під час і після проведення цитостатичної хіміотерапії.

Аналіз результатів досліджень показав, що до лікування ГЛЛ на високому рівні виявлена експресія онкогена TEL/AML. Після проведення ALLIC BFM-2009 хіміотерапії у пацієнтів з рецидивом хвороби цей онкоген не ідентифікується, але він виявлений у 24 % пацієнтів із повною ремісією і його можна вважати цінним маркером для діагностики безпідійного виживання при ГЛЛ.

Простежено значне зниження експресії онкогена BCR/ABL під час повної ремісії захворювання, що свідчить про ефективність вибраної терапії для

досліджуваної групи хворих, що необхідно враховувати при розробці методів моніторингу індивідуальної відповіді пацієнта на застосовану терапію. Високий рівень експресії онкогена BCR/ABL у дітей з рецидивом хвороби є наслідком мутацій у химерному гені, що свідчить про резистентність клітин пухлинного клону до дії цитостатиків.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано та обґрунтовано доцільність використання у практичному менеджменті та наукових дослідженнях генних гібридів за допомогою FISH-дослідження, а також рівня експресії генів за допомогою ПЛР. Це дає повноцінно надати молекулярно-генетичну характеристику бластних клітин при ГЛЛ у дітей. Обґрунтовано присутність генетичних транслокацій, які слугують як прогностичний критерій виникнення рецидиву ГЛЛ у дітей.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є особистою працею дисертанта. Автор самостійно провів аналіз літератури за темою дисертації, здійснив патентно-інформаційний пошук, узагальнив основні результати наукових досліджень, які виконали фахівці з цієї тематики, обґрунтував актуальність обраної теми, сформулював мету, визначив завдання, а також підібрав й обґрунтував вибір методів досліджень та їх обсяг для вирішення поставлених завдань, провів підбір дітей із ГЛЛ, їх загальноклінічне обстеження та динамічне спостереження, сформував клінічні групи. На основі завдань дослідження створено, заповнено та проаналізовано індивідуальні карти пацієнтів, базу даних результатів обстеження хворих. Автор самостійно виконав статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів, сформулював основні положення роботи та висновки, обґрунтував практичні рекомендації. Самостійно написано усі розділи дисертації та підготовлено наукові праці до друку. У матеріалах, написаних у співавторстві, чужих матеріалів та ідей не використано. Будь-які форми використання праць інших авторів супроводжують відповідні посилання.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були висвітлені й обговорені на засіданнях кафедри педіатрії і

неонатології ФПДО Львівського національного медичного університету ім. Д. Галицького (Львів, 2018-2021 рр.); XVIII конгресі Світової федерації українських лікарських товариств (Львів, 2020); науково-практичні конференції «Інноваційні пріоритети розвитку наукових знань» (Київ, 2019); міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених XXIII (Тернопіль, 2019); 24-та Вільнюській Міжнародній конференції – школа дитячої пульмонології та алергології (Вільнюс, 2019); науково-практичній конференції «Актуальні питання клінічної медицини в умовах реформування охорони здоров'я» (Київ, 2019); XII Національному конгресі з міжнародною участю «Людина та Ліки»-Україна (Київ, 2019); загальноукраїнському форумі «Безперервний професійний розвиток – ключ до професіоналізму лікарів» (Київ, 2019); міжнародній науково-практичній конференції «Міждисциплінарний підхід до діагностики і лікування в педіатрії та сімейній медицині» (Київ, 2020); міжнародній науково-практичній конференції «Європейські стандарти в практиці сучасного лікаря.»; міжнародній науково-практичній конференції «Міждисциплінарний підхід до діагностики і лікування в педіатрії та сімейній медицині» (Київ, 2020); міжнародній науково-практичній конференції «Європейські стандарти в практиці сучасного лікаря» (Київ, 2020); IV-й міжнародному педіатричному українсько-литовсько-польсько-грузинському конгресі «Здоров'я дитини» (Київ, 2020); міжнародній науково-практичній конференції «Людина та Ліки» (м. Одеса, 2020); міжнародній науково-практичній конференції «Міждисциплінарний підхід до діагностики та лікування в педіатрії та сімейній медицині. «Європейські стандарти у практиці сімейного лікаря» (Київ, 2020); міжнародній науково-практичній конференції «Людина та Ліки» (м. Дніпро, 2020); 27-ма Вільнюська міжнародна конференція (Вільнюс, 2020);

Впровадження результатів дослідження у практику проводили на галузевому та регіональному рівнях у таких соматичних відділеннях дитячих лікарень України: відділення гематології та інтенсивної хіміотерапії КНП ЛОР «Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр» (Львів);

онкогематологічне відділення КНП ООР «Одеська обласна дитяча клінічна лікарня»; відділення дитячої гематології КНП ХОР «Харківська обласна дитяча клінічна лікарня № 1»; онкологічний центр КП «РОДЛ» КП РОР «Рівненська обласна дитяча лікарня»; кардіогематологічного відділення КНП ЧОР «Чернівецька обласна клінічна дитяча лікарня».

Публікації. Результати дисертаційної роботи відображено в 10 наукових працях, із яких – 7 статей (6 статей у виданнях, рекомендованих МОН України, 1 – у закордонному виданні), 3 тез доповідей у матеріалах закордонних та українських конгресів, науково-практичних конференцій і симпозіумів (3 тези доповідей опубліковано).

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 149 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, двох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Список джерел літератури включає 148 праць, із них 137 – іноземною мовою. Робота проілюстрована 29 таблицями та 32 рисунками.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

ОСОБЛИВОСТІ ПРОГНОСТИЧНИХ КРИТЕРІЇВ ГОСТРИХ ЛЕЙКЕМІЙ У ДІТЕЙ

1.1 Розповсюдженість гострих лімфобластних лейкемій у дітей

Гостра лімфобластна лейкемія (МКХ-10-C91.0) – пухлинне захворювання системи крові, що виникає в результаті злякисної трансформації попередників В- і Т-лімфоцитів [2]. Експансія злякисних клітин відбувається з трансформованих гемопоетичних стовбурових клітин, які втратили здатність до диференціювання та дозрівання в зрілі лімфоїдні клітини. Клон злякисних клітин походить з однієї клітини, яка піддалася мутації. Це призводить до генетичних аномалій і природньої селекції домінантних субклонів мутантів [9, 10].

ГЛЛ належить до групи клінічно гетерогенних клональних злякисних новоутворень, які походять із лімфоїдних попередників, що, як правило, мають відповідні генетичні та імунофенотипові характеристики [2, 11]. Новоутворення кровотворної та лімфоїдної тканин займають половину усіх злякисних пухлин. В Україні, за результатами аналізу захворюваності та смертності хворих на лейкемії за 2010–2020 рр, встановлено, що середнє значення захворюваності складає 6,01 випадків на 100 тис. нас., а смертність – 3,6 відповідно. Нозологічно, в Україні, за статистичними даними, гостра лімфобластна лейкемія спостерігалася в 78 % випадків від загальної кількості лейкемій. Решта випадків представлена гострою нелімфобластною лейкемією (17-21 % від загальної кількості випадків) і хронічною мієлоцитарною лейкемією (3 %) [4, 11]. Водночас існує невеликий відсоток біклональних лейкемій – лімфобластні з експресією мієлоїдних маркерів або мієлоїдні з експресією лімфобластних маркерів. Гостру недиференційовану лейкемію виділяють у тих

випадках, коли ідентифікація клітин сучасними методами дослідження є ускладненою.

У дитячому віці на лейкемії припадає 38-40 % хворих [1], що становить більш ніж 1/3 нових випадків пухлинних захворювань, які виникають щорічно в дітей. За даними ВООЗ, у 2019 році захворюваність складала близько 4-5 випадків на 100000 дитячого населення, причому пік захворюваності ГЛЛ у дітей відповідає дошкільному віку (2-5 років при медіані 4,7 років) і дещо частіше хворіють хлопчики – 1,4:1 [2].

У сучасних дослідженнях, які спрямовані на вивчення міжстатевих відмінностей ГЛЛ, доведено, що у випадку В-ГЛЛ розподіл за статтю є однаковим: хлопчики – 51 %, дівчатка – 49 %, тоді як Т-варіант виявлявся переважно у хлопчиків (90 %) [12]. Інші дослідження теж доводять, що серед дітей різних вікових груп найбільша захворюваність на гострі лейкемії припадає на дошкільний вік. Пік загальної захворюваності на гостру лейкемію наявний у дітей віком від 2 до 8 років із послідовним зменшенням числа хворих віком до 11 років. Друге підвищення захворюваності на лейкемію спостерігається в дітей після 14 років життя [110].

До лідерів за показником захворюваності на лейкемію в дитячому віці увійшли Вінницька та Хмельницька області, де частота захворювання сягала 10,16 та 10,10 на 100000 населення відповідно. За показниками смертності – Вінницька (5,88) та Рівненська (5,78) області. Найнижчі середні показники захворюваності та смертності спостерігалися в Одеській області [9, 10].

Лейкемії належать до поліетіологічних захворювань. У патогенезі важливе значення відводять хромосомній аберації [105]. Зовнішніми чинниками (факторами довкілля) є іонізуюче та електромагнітне випромінювання, хімічні мутагенні агенти (бензол, індол, пестициди, лікарські препарати), мікроорганізми (віруси, бактерії), набутий імунодефіцитний стан (у дітей, які отримують цитостатики, при тотальному опроміненні, введенні антилімфоцитарної сироватки) [21].

За сучасними даними виявлено, що в 11 % випадків серед дітей із цитогенетичними аномаліями діагностований Т-клітинний варіант ГЛЛ, тоді як у групі пацієнтів без цитогенетичних аномалій – тільки в 3 % випадків [20]. При хромосомних аномаліях у пацієнтів відмічено вищі показники лейкоцитозу – медіана склала $13,1 (5,60-20,57 [25 \% - 75 \%]) \times 10^9/\text{л}$ проти $8,4 (3,83 -13,80 [25 \% -75 \%]) \times 10^9/\text{л}$ у пацієнтів без хромосомних аномалій. Цитогенетичні аномалії хромосом у більшості дітей із ГЛЛ мали числовий характер – 85 %. Серед числових змін переважала гіпердиплоїдія – в 78 % випадків. Гіпердиплоїдія або ДНК-індекс $> 1,16$ відзначалася у 20 % дітей, старших за рік, незалежно від рівня лейкоцитозу та віку, разом із сприятливим прогнозом. ГЛЛ із гіпоплоїдією характеризуються common-імунофенотипом бластних клітин та несприятливим прогнозом. Гіпердиплоїдія в 27 % випадків проявлялася трисомією 21 пари хромосом, у 5,5 % випадків – тетрасомією (+21). Серед інших числових змін виявлені трисомії різних пар хромосом (20, 12, 5, 22, 17 та ін.). При гіподиплоїдному наборі хромосом у 40 % випадків наявна повна відсутність 18 хромосом, що належать до несприятливих прогностичних ознак. Серед структурних змін хромосом виявлені: транслокація $t(9;22)$, різні делеції: $del(5)(p12)$, $del(7)(p12)$, $del(9)(p12)$, $del(12)(p11)$. У всіх випадках структурні зміни асоціювалися з пре-B-клітинним варіантом. Показник виходу в ремісію в дітей, що страждають на ГЛЛ, із виявленими цитогенетичними аномаліями склав 92 %, тоді як у пацієнтів без патології з боку хромосом – 97 %, при цьому летальність була – 8 % та 3 % відповідно. Найбільш несприятливими в прогностичному плані серед цитогенетичних аномалій виявилися: відсутність 18 пари хромосом, асоційоване з Т-лінійним імунофенотипом бластних клітин, віком старших 10 років; $del(p11)$, що асоціюється з пре-B-клітинним варіантом і гіперлейкоцитозом. Рівень лейкоцитів у всіх пацієнтів був менше $10 \times 10^9 /\text{л}$. Період спостереження складав 10 років [21].

Смертність від лейкемії на сьогодні складає 1,6 на 100 000 дитячого населення, хоча за останнє десятиліття в її лікуванні досягнуто значних успіхів: у більшості українських клінік, які використовують сучасні протоколи

лікування, загальне 5-річне виживання сягає 80–86 %, а безрецидивне 5-річне виживання – 76-83 % [85, 114, 135].

У 70-і роки тривалі ремісії (більше 5 років) спостерігалися лише у 5 % дітей із гострою лейкемією. На сьогодні із залученням новітніх діагностичних засобів і використанням сучасних протоколів лікування загальне 5-річне виживання пацієнтів складає більше 75 %. При ГЛЛ тривалої ремісії вдається досягти у 70–75 % дітей, тоді як при гострій мієлобластній лейкемії – у 90 % [12, 19].

Основною проблемою, що впливає на безпідійне виживання при ГЛЛ, на сьогодні залишаються рецидиви захворювання. Результат рецидиву вкрай несприятливий як при проведенні поліхіміотерапії, так і при трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин [41, 56].

Більш сприятливий прогноз і кращий ефект від проведеної терапії спостерігаємо у дітей віком від 1 до 10 років, тоді як у пацієнтів, молодших 1 рік та старших 10 років ГЛЛ перебігає менш сприятливо та важко піддається лікуванню [28]. Безпідійне виживання пацієнтів, за даними Ranin Soliman та співавт. (2022 р.), за останні десятиліття зросла до 79-86 % [112, 118, 123]. Водночас ефективність терапії деяких варіантів ГЛЛ помітно нижча. До цієї категорії можна віднести ГЛЛ у дітей першого року життя. П'ятирічне безпідійне виживання цієї групи пацієнтів не перевищує 47-54 % [40, 77].

ГЛЛ у дітей першого року життя характеризується низкою біологічних особливостей: високим лейкоцитозом, великою екстремедулярною масою пухлини, переважанням pro-B-імунофенотипу (BI-ALL) із коекспресією мієлоїдних та нейральних маркерів (CD15, CD65, NG2), частою наявністю перебудови гену MLL [29, 36].

За результатом аналізу епідеміологічної ситуації, що склалась в Україні щодо лейкемій, встановлена наявність негативної тенденції до зростання захворюваності [4, 5]. Зокрема, за даними, стандартизованими ВООЗ, захворюваність населення зросла з 7,6 у 2006 р. до 8,2 випадків на 100 тис. нас. у 2019 р.; за даними «українського стандарту» – з 5,9 (2018 р.) до 6,4 (2020 р.)

випадків на 100 тис. нас. Протилежна за характером тенденція спостерігалася за показниками смертності населення від лейкемії, яка зменшилась із 3,6 випадків (стандартизовано за методикою ВООЗ) до 3,3 випадків на 100 тис. нас. у 2013 р. За даними, зведеними до статево-вікової структури населення України, смертність зменшилась із 5 випадків (2018 р.) до 3,2 вип. (2020 р.) на 100 тис. нас. [36].

Серед ускладнень лейкемії домінують важкі інфекційні ураження, які в 59,4-75,3 % випадків є основною причиною летальних наслідків, інфекційну етіологію, підтверджену бактеріологічними дослідженнями, зафіксовано в 59 % гранулоцитопенічних епізодів [14, 15, 16]. За даними різних дослідників, у структурі бактерійних ускладнень у таких хворих грампозитивна кокова флора (54 %) переважає над грамнегативною мікрофлорою (34 %) [45].

У структурі порушень соматичного здоров'я дітей, у періоді тривалої ремісії ГЛЛ переважають психічні розлади та порушення поведінки (64,8 %); хвороби шлунково-кишкового каналу (57,9 %), порушення гепатобіліарної системи органічного та функціонального генезу (38,1 %), патологія системи кровообігу функціонального й органічного генезу (52,2 %), захворювання нервової (29,6 %) та ендокринної (27,5 %) систем [16, 42]. У структурі соматичної патології органів дихання домінує хронічний тонзиліт – 11,5 % дітей, що обумовлює під час реабілітаційних заходів необхідність залучення оториноларинголога з метою санації носоглотки [43, 108]. У цілому, зі збільшенням хіміотерапевтичного та променевого навантаження зростає коефіцієнт поєднаної соматичної патології: у групі стандартного ризику він складає 3,63, у групі середнього ризику – 3,82, у групі високого ризику – 3,93 [14, 16, 46].

Таким чином, аналіз епідеміологічної ситуації на основі систематизації даних літератури показує збільшення показників розповсюдження лімфобластних лейкемій серед дитячого населення як у світі, так і в Україні. Спостерігаємо високу вірогідність виявлення вроджених аномалій у дітей із

гострими лейкеміями, наявність частої соматичної патології. У зв'язку з цим, рання діагностика лімфобластної лейкемії в дітей надзвичайно важлива.

1.2 Клініко-епідеміологічна характеристика та клінічний поліморфізм лімфобластних лейкемій

Клінічно ГЛЛ характеризується анемічним і геморагічним синдромом, лімфаденопатією, з наявністю пухлинних клітин у периферійній крові, інтоксикацією, лихоманкою, розвитком больового синдрому різної локалізації [10].

На сьогодні в клінічному перебігу ГЛЛ виділяють наступні періоди: передлейкемічний, гострий, ремісії, рецидиву та термінальний. Прояви залежать від природи лейкемічного клону, вчасного встановлення діагнозу й ефективності лікування. На початковому етапі захворювання (передлейкемічний період) можуть відзначатися неспецифічні симптоми: підвищення температури тіла, зниження апетиту, наростаюча слабкість, підвищена стомлюваність, млявість. При дослідженнях периферійної крові вже може бути виявлена анемія, гранулоцитопенія, тромбоцитопенія. Частіше зміни документують при дослідженні кісткового мозку [47].

Гострий період характеризується симптомами інтоксикації, зниженням апетиту, болями в кістках, наростанням анемії, появою геморагічного синдрому (від петехій і гематом до різних кровотеч: носових, шлунково-кишкових, ниркових). Одним із частих симптомів є збільшення периферійних лімфовузлів – підщелепних, шийних, пахвових, пахових. Вони неболючі, рухливі, не спаяні між собою та навколишніми тканинами [47]. Характерним є збільшення печінки й селезінки. Простежуємо виразково-некротичне ураження слизових оболонок у вигляді гінгівіту, стоматиту, ентеропатії в зв'язку з лейкемічною інфільтрацією, крововиливами з приєднанням інфекції [1].

На думку більшості дослідників, немає визначених клінічних симптомів, патогномонічних для стадії перед лейкемії. У цей період відбувається перебудова кровотворення без участі в цьому процесі внутрішніх органів. Іноді

відзначаються підйоми температури тіла, зниження апетиту, наростаюча слабкість, млявість. В аналізі периферійної крові вдається виявити патологічні зміни у вигляді анемії, гранулоцитопенії, тромбоцитопенії. Гострий період у більшості дітей має бурхливий початок і характеризується поліморфізмом клінічних симптомів [26, 49, 111].

Для термінального періоду захворювання характерне виражене пригнічення нормального кровотворення: наростає гранулоцитопенія з вторинними інфекційними ускладненнями, тромбоцитопенія з можливістю спонтанних кровотеч та одночасно зі зростаючою прогресією збільшується кількість бластних елементів кісткового мозку та периферійної крові [13, 84].

З огляду на неспецифічність клінічних проявів гострої лейкемії діагностика захворювання заснована на поетапному застосуванні комплексу лабораторно-інструментальних досліджень [22, 31].

У клінічному аналізі крові при ГЛЛ найхарактернішими змінами є зниження рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів, абсолютна нейтропенія, тромбоцитопенія і наявність бластних клітин незалежно від загальної кількості лейкоцитів, а також збільшена ШОЕ.

Таблиця 1.2.1

Алгоритм діагностики лейкемій

Скринінгові дослідження
<ul style="list-style-type: none"> • орієнтовні (загальний аналіз крові, рентгенографія органів грудної клітини, кісток, УЗД черевної порожнини) • діагностичні (стернальна пункція, трепанобіопсія)
Діагностичні визначальні дослідження
<ul style="list-style-type: none"> • цитохімічне дослідження • імунофенотипування бластів • цитогенетичне дослідження бластів • молекулярно-генетичне дослідження бластів
Комплексне клінічне обстеження
<ul style="list-style-type: none"> • виявлення ускладнень, супутніх захворювань
Оцінка факторів ризику та прогнозу перебігу лейкемій
Вибір тактики та стратегії лікування

У 25-30 % випадків спостерігаємо лейкоцитоз. У багатьох хворих наявне поєднання усіх вказаних ознак або деяких із них. Слід особливо підкреслити, що наявність невеликого відсотку бластних клітин у лейкограмі недостатньо для встановлення діагнозу ГЛЛ, а їх відсутність не виключає цього діагнозу. Алгоритм діагностики лейкемій подано в табл. 1.2.1.

Після комплексного клініко-лабораторного обстеження оцінюють фактори ризику та прогнозу перебігу лейкемій та обирають тактику та стратегію лікування.

Пунктат кісткового мозку в дітей із ГЛЛ є пунктатом клітинним, мономорфним. Бластні клітини складають близько 90 % в основному мезоформи з високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, округлими та складчастими ядрами, слабкою базофілією цитоплазми, у частині клітин – мереживний. Трапляються мітози – 2-3 на 100 клітин. Наявність у кістковомозковому мономорфному пунктаті 20-100 % бластів із «провалом» дозрівання гранулоцитів є діагностичним критерієм ГЛЛ. Ще одним критерієм є виявлення дифузної або великовогнищевої бластної інфільтрації при порушенні нормальних співвідношень паростків кровотворення, пригнічення нормального гемопоезу [1].

Пізня діагностика ГЛЛ і, відповідно, затримка лікування призводять до збільшення вірогідності появи додаткових мутацій і виникнення нового клону клітин, резистентного до хіміопрепаратів, що ускладнює ерадикацію лейкемічного клону [51].

Отже, правильна оцінка ранніх ознак гострої лейкемії допомагає усунути плутанину в діагнозах; діти з недіагностованою лейкемією отримують неадекватну терапію, що в подальшому збільшує ризик летального результату. Настороженість педіатрів і сімейних лікарів відносно ГЛЛ забезпечує розпізнавання його початкових проявів, дозволяє своєчасно почати лікування, сприяє тривалій ремісії. Основне завдання педіатра та сімейного лікаря полягає в ранньому виявленні клінічних і лабораторних даних із наступним

скеруванням на консультацію до гематолога. З іншого боку, знання генних трансформацій при ГЛЛ допоможе в ранньому періоді захворювання та під час розвитку рецидивів вибрати тактику хіміотерапії, що попередить розвиток ускладнень.

1.3 Прогнозування ефективності терапії після рецидиву ГЛЛ

За останні десятиріччя досягли покращання виживання в дітей після рецидиву ГЛЛ зі 45 % до 58 % завдяки новим схемам стратифікації ризику, що включають цитогенетичні показники, і безперервній модернізації терапевтичних протоколів [78]. Хоча розробляється все більше нових хіміо- та імунотерапевтичних препаратів, наразі немає чітких показів для призначення нових альтернативних ефективних медикаментів через відсутність детальнішої стратифікації пацієнтів на прогностичні групи. Не змогли досягти статистично значущих результатів терапії на великих когортах дітей, незважаючи на наявність даних про ефективність альтернативної терапії в окремих групах дітей [78, 79].

Стосовно застосування показника MRD у дітей після рецидиву, у дослідженні Oskarsson T et al. було показано, що, якщо в дитини з ГЛЛ на первинному етапі лікування не було виявлено MRD, однак стався рецидив, лікування за стандартною схемою є ефективним [91]. Ще однією групою, яку можна ефективно лікувати за протоколом, що застосовувався до рецидиву, незалежно від інших стратифікаційних схем, є група з пізнім рецидивом (>36 місяців після первинної діагностики) [80]. Пацієнти з поганим прогнозом краще реагують на терапію аlogenними гематопоетичними стовбуровими клітинами порівняно зі стандартною схемою [78]. Після рецидиву зі збереженням високої групи ризику неуспішності терапії трансплантація є пріоритетною тактикою [79]. З огляду на значні побічні явища такого лікування та його високу вартість, важливим завданням сучасної онкогематології є розробити найефективніші прогностичні моделі для верифікації серед групи дітей із високим ризиком підгрупи, яку можнавилікувати безпечнішою й дешевшою хіміотерапією.

З огляду на те, що первинні генні трансформації зберігаються після рецидиву ГЛЛ, а відповідь на терапію часто змінюється, головним предиктивним фактором у групі дітей після рецидиву хвороби можна вважати саме вторинні генні трансформації [67]. Важливо, що вторинні мутації після рецидиву змінюються й ті, що були визначені на етапі первинної діагностики, часто зникають і виникають нові. Так, визначення мутаційного статусу дозволяє найбільш точно стратифікувати дітей на нові прогностичні групи після рецидиву ГЛЛ [67, 74]. Х. Ма et al. зазначили, що мутації *NT5C2*, *CREBBP*, *WHSC1*, *TP53*, *USH2A*, *NRAS*, *IKZF1* найчастіше притаманні лейкемічному клону впродовж ремісії, що викликає рецидив [67]. J. A. E. Irving et al. вивчали мутаційний статус генів *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *EBF1*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1*, *PAR*, *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *FLT3*, інших у дітей із рецидивами ГЛЛ та визначили їх прогностичний вплив на подальшу терапію [74].

Делеція *IKZF1* (15–17 % усіх ГЛЛ) – найчастіша післярецидивна вторинна мутація, асоційована з гіршими результатами терапії і може застосовуватися для стратифікації дітей у групи високого ризику незалежно від інших систем, що було показано в дослідженнях [83, 92]. Окрім того, є дані в роботі Pan L та інших про позитивні результати терапії дітей із делецією *IKZF1* пульстерапією вінкристином у комплексі з глюкокортикоїдами (ГК) додатково до стандартного протоколу [92]. Результати інших досліджень демонструють, що після рецидиву незалежна негативна прогностична чинність *IKZF1* втрачається (наприклад, у дітей із первинною трансформацією *ETV6-RUNX1*) і значно залежить від інших вторинних мутацій [76]. Мутація *TP53* у всіх прогностичних групах була асоційована з поганим прогнозом успішності терапії після рецидиву. Хоча мутацію *TP53* рідко визначають у першому гострому періоді та її роль в прогнозуванні дорецидивного ризику чітко не встановлена, мутація *TP53* є частою причиною рецидивів та асоційована з низькою ефективністю післярецидивної терапії. Делеція *NR3C1/BTG1* асоційована з резистентністю до терапії ГК і корелює з гіршими результатами комбінованої терапії [68]. В іншому дослідженні мутацію *NT5C2* визнали

причиною резистентності до аналогів нуклеозидів, а мутація *CREBBP* – до ГК [67]. Мутації *NRAS/KRAS*у дітей із гіпердиплоїдією незалежно від клінічно визначеної прогностичної групи збільшують смертність у 3–5 разів [76]. Цікаво, що залежно від прогностичної групи, визначеної стандартним методом, вплив цієї мутації на загальну смертність був вищим у групі високого ризику порівняно з групою стандартного ризику. У цілому, результати дослідження підтверджують необхідність використання комбінованого підходу до стратифікації прогностичних груп дітей із ГЛЛ.

Отже, очна стратифікація дітей із ГЛЛ на прогностичні групи успішності терапії є пріоритетним напрямком сучасних досліджень онкогематології й педіатрії. Стандартні методи стратифікації дітей не можуть повністю задовольнити потреб сучасної науки. Детальне визначення окремих груп може покращити ефективність лікування дітей із проміжним і високим ризиком терапії, що часто погано реагують на прийняті протоколи терапії. Для поглибленої стратифікації дітей на прогностичні групи наразі потенційно найефективнішим методом є комбінація стандартної схеми й визначення мутаційного статусу бластиних клітин. Попри наявність досліджень, що розкривають можливості окремого застосування мутаційного статусу для стратифікації дітей поза іншими методами, доказів ефективності такого підходу на великих когортах гетерогенних пацієнтів не знайдено. Перш за все, це обумовлено недостатньою кількістю знань про вплив кожної окремої мутації та їх комбінації на прогноз. Вплив таких вторинних мутацій на прогноз терапії в дітей із ГЛЛ як *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *NRAS/KRAS*, *TP53*, *PAX5* на сьогодні є найбільш дослідженим. Розробка схем інтеграції цих та інших показників мутаційного статусу лімфобластних клітин у стандартні схеми стратифікації дітей на прогностичні групи може поглибити стратифікацію й покращити результати лікування дітей, хворих на ГЛЛ. Окрім того, передбачити ефективність лікування дозволяє імуно-фенотипова діагностика гострих лейкемій.

1.4 Імуно-фенотипова діагностика та молекулярно-генетичний аналіз гострих лейкемій

Раніше, у 80-і роки ХХ століття, гострі лейкемії розглядали як блокування диференціювання клітини на певній стадії розвитку, тому варіанти лейкозів отримали свою назву відповідно до стадій диференціювання, антигени яких виявлялися насамперед на бластах [73]. Відповідно до цих уявлень при постановці діагнозу врахована експресія кожного маркера окремо як самостійної ознаки. Такий підхід був обумовлений не лише теоретичними уявленнями про патогенез гострого лейкозу, але й можливостями імунофенотипування. Тепер зрозуміло, що клональне походження не означає незмінності фенотипових характеристик лейкозних бластів упродовж хвороби, проте нозологічне формулювання зберегло колишнє звучання. При підозрі на злоякісне гематологічне захворювання завжди виникає три питання: чи необхідним є лабораторне дослідження; яким воно повинно бути; як трактувати отримані дані для конкретного пацієнта.

Патогенез захворювання передбачає дослідження кісткового мозку як основного біологічного матеріалу при діагностиці ГЛЛ, а першим кроком діагностики є виявлення патологічних клітин і визначення їх кількості відносно інших ядерних клітин. Види біологічного матеріалу, скеровані на дослідження, досить різноманітні: периферійна кров, аспірат кісткового мозку, трепанобіоптат, ліквор, плевральна рідина та ін. Отримання матеріалу вимагає інвазивного втручання та є небезпечним для пацієнта, а якість часто страждає через наявність згустків, гемолізу та недостатнього обсягу клітин. Тому необхідно використовувати найменш травматичні протоколи для підготовки проб, а також виключати мертві клітини в аналізі реального часу [95].

Для ГЛЛ характерним є не тільки підвищений вміст бластних клітин, але їх анаплазія – наявність складчастості, фрагментація, вдавлень, вакуолізації ядра та ін. Крім виявлення пухлинних клітин лімфоїдної лінії, проводять й інші дослідження: цитохімічне, цитогенетичне, молекулярно-біологічне та імунофенотипування [9].

При цитохімічному дослідженні лейкемічні лімфобласти дають негативну реакцію на пероксидазу, хлорацетатестеразу та ліпіди. Для лімфобластів характерним є гранулярний розподіл матеріалу в ШИК-реакції у вигляді пурпурних гранул на периферії цитоплазми. Висока активність кислої фосфатази в лімфобластах у дітей із ГЛЛ наявна в 20–30 % випадків [96].

Основою сучасної класифікації ГЛЛ є FAB-класифікація (франко-американсько-британська) [47], яка включає морфологічні та цитохімічні характеристики бластів. Сьогодні для імунологічної класифікації ГЛЛ використовуються також система Європейської групи імунологічної характеристики лейкемій (European Group of Immunological Markers for Leukemias, EGIL) [96] з урахуванням пізніше внесених змін [97], а також класифікація ВООЗ [98] (табл. 1.5.1).

Таблиця 1.5.1

Морфологічна класифікація (FAB) ГЛЛ, [96]

Цитологічні особливості	L1	L2	L3
<i>Розмір клітини</i>	переважають малі клітини	великі, варіабельні за розмірами	великі
<i>Ядерний хроматин</i>	гомогенний у всіх клітинах	варіабельний, гетерогенний	мереживний та гомогенний
<i>Форма ядра</i>	правильна; іноді ядро розщеплене або вдавнене	неправильна; здебільшого ядро розщеплене або вдавнене	овальна або правильна
<i>Нуклеолі</i>	не візуалізуються, малі або непостійні	часто великі, одна або більше	глибокі, пухирцеподібні, одна або більше
<i>Кількість цитоплазми</i>	незначна	варіабельна	помірно збільшене
<i>Базофілія цитоплазми</i>	слабка або помірна, рідко інтенсивна	варіабельна, густа в деяких випадках	виражена
<i>Вакуолізація цитоплазми</i>	варіабельна	варіабельна	часто виражена

Моноклональні антитіла, що використовують для діагностики гострих лейкемій у дітей [139], наведені в таблиці 1.5.2

Таблиця 1.5.2

Маркери для ідентифікації гострих лейкемій, [139]

<i>В-лінійні маркери</i>	iCD22, iCB79, iIgM, CD10 , CD19, CD20, CD22, Кappa, Lambda , IgM
<i>T-лінійні / NK-клітинні маркери</i>	iCD3, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD56, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$
<i>Мієлоїдні маркери</i>	iLysozyme, iMPO, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41a, CD61, CD64, CD65
<i>Маркери клітин-попередників</i>	CD117, CD34, CD123, CD133, CD99
<i>Лінійно необмежені маркери</i>	CD38, CD45, CD58, HLA-DR, NG2

Вибір клонів антитіл та флуорохромів зазвичай проводиться відповідно до досвіду лабораторій. Ключові антитіла, за якими відбувається первинне виділення клітин (CD45, CD19, CD7), повинні бути мічені флуорохромами з поділом на популяції.

У ході нормального гемопоезу для кожного етапу дозрівання лімфоцитів характерний певний спектр експресії антигенів. На ранній стадії (стадія Про-В лімфоцитів) В-попередники експресують CD34, спостерігається низька інтенсивність експресії CD10, при цьому відзначається повна відсутність антигену CD20. При дозріванні клітин відбувається поступова втрата CD34, стає більш вираженою експресія CD10 (стадія Пре-Пре-В-лімфоцитів). На наступній стадії поступово з'являється експресія CD20, внутрішньоклітинного IgM та відзначається слабкий прояв поверхневого IgM (стадія Пре-лімфоцитів). На цих стадіях клітини помірно експресують CD22, а також виявляється виражена експресія антигену CD38. При переході на стадію зрілих В-

лімфоцитів відбувається втрата експресії CD10, CD38, збільшується рівень експресії маркера CD22. На поверхні зрілих клітин експресується високий рівень IgM. Помірна експресія CD45 спостерігається на найбільш ранній стадії диференціювання та збільшується в процесі дозрівання клітин. Такі маркери, як CD19, CD79а та HLA-DR, позитивні протягом усіх етапів диференціювання В-лімфоцитів (табл. 1.5.3).

Імунофенотиповий діагноз ВП-ГЛЛ ставиться на підставі експресії лейкоциними клітинами двох і більше специфічних лінійних маркерів: CD19, та/або CD79а, та/або CD22, окрім того, в більшості випадків на лімфобластах присутня експресія антигенів гістосумісності II класу – HLA-DR, цитоплазматично виявляється фермент – термінальна дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) [94].

Таблиця 1.5.3

**Панелі моноклональних антитіл для імунофенотипової діагностики
ГЛЛ, [94]**

<i>Для діагностичного імунофенотипування FITC/PE/PC5</i>	<i>Для оцінки інтенсивності флуоресценції FITC/PE/ECD/PE-Cy5/PE-Cy7</i>
IgG1(mouse)/ IgG2a(mouse)/CD45	Syto16/CD20/CD45/CD10/CD19
CD45/ CD14/-	Syto16/CD58/CD45/CD10/CD19
CD4/CD8/CD45	Syto16/ CD34 / CD45/CD10/CD19
CD3/HLA-DR/CD45	Syto16/CD11a/CD45/CD10/CD19
CD20/CD5/CD45	Syto16/CD38/CD45/CD10/CD19
CD7/CD13/CD45	
CD10/CD117/CD45	
CD19/CD33/CD45	
CD34/CD22/CD45	
CD2/CD1a/ CD45	
CD15/CD11b/CD45	

<i>Для діагностичного імунофенотипування FITC/PE/PC5</i>	<i>Для оцінки інтенсивності флуоресценції FITC/PE/ECD/PE-Cy5/PE-Cy7</i>
sIgM/-/CD45	
CD65/CD56/CD45	
cyIgG1(mouse)/cyIgG2(mouse)/CD45	
cyIgM/-/CD45	
Tdt/cyCD79a/CD45	
cyMPO/-/CD45	
cyCD3/-/CD45	

Імунофенотиповою особливістю Про-В-ГЛЛ, окрім наявності основних лінійно-специфічних маркерів, є відсутність на поверхні пухлинних клітин експресії антигену CD10 і цитоплазматичного (cy)IgM. Для Common В-ГЛЛ діагностичним критерієм є обов'язкова присутність на лейкоцитарних клітинах маркера CD10 за умови відсутності експресії cyIgM, тоді як для Пре-В-ГЛЛ обов'язковим є виявлення cyIgM. Очевидно, що лейкоцитарні бласти при ВП-ГЛЛ мають чисельні імунофенотипові аберації порівняно з нормальними гемопоетичними аналогами. На пухлинних клітинах більш ніж у 50 % випадків трапляється асинхронна експресія диференційованих антигенів, в 42,6 % ВП-ГЛЛ спостерігається аберантна експресія мієлоїдних маркерів. Основної уваги заслуговують відмінності рівнів експресії таких маркерів, як CD19, CD10, CD20, CD38, CD45, CD34, CD58, на пухлинних клітинах порівняно з нормальними кістковомозковими аналогами, які в тому чи іншому ступені наявні в досліджуваних зразках кісткового мозку пацієнтів із ВП-ГЛ. Відповідно, використання комбінації цих маркерів дозволить із високою специфічністю ідентифікувати пухлинні клітини серед нормальних гемопоетичних попередників як на етапі діагностики, так і в процесі протипухлинної терапії, і тим самим ідентифікувати пацієнтів із високою ймовірністю розвитку рецидиву.

Для інтенсивності світіння моноклональні антитіла повинні бути кон'юговані з яскравими флюорохромами (фікоеритрином або алокофіціаніном). Виразність експресії в клітинах лейкозної популяції повинна бути такою ж сильною, як у присутніх у зразку нормальних Т-клітин. При вивченні експресії CD3 за допомогою імуногістохімічного методу в зрізах трепанобіоптату кісткового мозку слід враховувати можливість реакції із Z-ланцюгом Т-клітинного рецептора, представленого в цитоплазмі НК-клітин. При імуногістохімічному дослідженні використовуються тільки полівалентні Т-клітинні антитіла, тому ця реакція не є абсолютно специфічною для Т-клітин.

Таким чином, імунологічна класифікація ВП-ГЛЛ заснована на уявленні про експресію лінійно-специфічних та стадійно-специфічних антигенів на поверхні клітин під час нормальних етапів диференціювання В-лімфоцитів (гематогонів). Сьогодні встановлено, що лейкемічні бласти при ВП-ГЛЛ демонструють численні імунофенотипові аберації порівняно з їхніми нормальними гемопоетичними аналогами [101]. Такі особливості визначають лейкоз, асоційований імунофенотип пухлинних клітин, який, у свою чергу, відіграє важливу роль у діагностиці ГЛЛ і моніторингу терапії захворювання [102-104, 106].

Гострі В-лінійні лейкемії

Варіант В-I: бластні клітини мають імунологічний фенотип попередників В-лімфоцитів кісткового мозку. Вони експресують CD19+, CD22+, CD79a+, CD34+/- TdT+.

Варіант В-II (common) в дітей становить до 70 % всіх гострих лейкозів. Виявляються наступні фенотипи: CD19+, CD22^{cut}+, CD79a+, CD10+, CD34+/-, CD20+, TdT+.

Варіант В-III: визначальним в імунофенотипі бластних клітин цього варіанта ГЛЛ є наявність цитоплазматичного важкого ланцюга М при відсутності поверхневих імуноглобулінів.

Варіант В-IV: реєструється у 2–4 % випадків ГЛЛ у дітей і розглядається як еквівалент лімфоми Беркітта у фазі лейкемізації. Бластні клітини мають

морфологічні характеристики L-3 варіанта відповідно до FAB-класифікації, виявляється наступний імунофенотип: CD19+, CD22^{cyt}+, CD20+, CD34-IgM+, Карра / Lambda + на мембрані бластів.

Гострі T-лінійні лейкози. Для T-лінійних ГЛЛ специфічним маркером є експресія цитоплазматичного CD3. За ступенем диференціювання серед T-лінійних ГЛ також виділяємо 4 варіанти.

ТI – бластні клітини відповідають раннім тимоцитам та характеризуються експресією загального T-антигену CD7.

Варіант ТII гострого лімфобластного лейкозу визначається за експресією антигенів CD7+, CD2+ та/або CD5+. Діагноз виставляється в день доставки матеріалу (яким є кістковий мозок), що дозволяє лікареві-онкогематологу за встановленим імунофенотипом бластних клітин вибрати оптимальну програму поліхіміотерапії й розпочати її в ранні терміни. Також від імуноваріанта лейкозу залежать група ризику захворювання та його прогноз.

ТIII – бластні клітини мають фенотип кортикальних тимоцитів. Цей тип T-ГЛЛ встановлюється за експресією на поверхні бластних клітин CD1a+. Імунофенотип: CD3^{cyt}+, CD7+, CD2+, CD5+, CD1a+, CD4+ / CD8+/-.

Варіант ТIV гострого лімфобластного лейкозу (зрілий) характеризується мембранною експресією CD3 та відсутністю CD1a [107].

На підставі даних групи BFM-AIEOP чітко визначені три групи пацієнтів при ГЛЛ методом проточної цитофлуориметрії: група стандартного ризику – бластних клітин у кістковому мозку з відповідним імунофенотипом менше 0,1 %; група середнього ризику – бластних клітин 0,1–1,0 %; група високого ризику – бластних клітин більше 1,0 % [109, 111].

Незважаючи на те, що імунофенотипування методом проточної цитометрії – важливий метод діагностики ГЛЛ, невідповідність між різними чинними системами класифікації, стандартами технологій і клінічними потребами не завжди дозволяють застосовувати цей метод узгоджено в різних дослідницьких центрах. У зв'язку з тим, що дані імунофенотипування використовують для стратифікації пацієнтів у межах великих багаточентрових

досліджень, необхідний стандартний підхід, що включає вибір комбінації антитіл, методу підготовки проб, налаштування проточного цитометра й аналіз отриманих даних [113, 116, 119]. Хоча різні групи періодично публікують приклади застосування класифікацій EGIL та BOOZ [120], будь-яких загальних підходів до проведення цитометричної діагностики ГЛЛ досі не розроблено [121].

У частині випадків можлива експресія IgM при відсутності CD10, що не скасовує діагнозу ВП-ГЛЛ. Якщо експресія CD10 при ВП-ГЛЛ становить понад 20 %, але менше 50 %, то такі випадки слід позначати як VI / ВП-ГЛЛ [10, 101]. Якщо внутрішньоклітинна експресія IgM виявляється тільки в 1 субпопуляції бластів (10–50 %), висновок може бути сформульовано як ВП / III. Деякі випадки при частковій експресії IgM можуть бути класифіковані як VI / III. Рідкісні випадки ВП-ГЛЛ із поверхневою експресією легких ланцюгів імуноглобуліну (на поверхні або в цитоплазмі) не мають інших ознак лімфоми / лейкозу Беркітта (морфологія L3 за класифікацією FAB, перебудова гена *MYC*, висока швидкість проліферації). Такі випадки відносять до ВІV, але включають у загальноприйняте лікування ГЛЛ. Найчастіше в таких пацієнтів виявляється перебудова гена *KMT2A*.

Розмаїття імунофенотипових та молекулярних маркерів злоякісних гематологічних захворювань призвело до появи найрізноманітніших оцінок інформаційної значущості імунофенотипування лейкозних бластів. Деякі автори вважають, що імунофенотипові характеристики не можна використати як предиктори прогнозу захворювання.

Найвищі результати лікування ГЛЛ з гіперплоїдією в дітей отримані при виявленні додаткових хромосом 4, 10, 17 [131] і 4, 18 [132]. У дорослих хворих ГЛЛ із гіперплоїдією результати лікування менш вражаючі. Тільки окремі автори відзначають дещо кращий результат захворювання в таких хворих, тоді як інші не знаходять переваг гіперплоїдії порівняно з іншими цитогенетичними маркерами. При цьому не досягають результатів, які можна порівняти за ефективністю з лікуванням ГЛЛ із гіперплоїдією в дітей. Якщо на тлі

гіперплоїдії виявляються також характерні для ГЛЛ транслокації t (9; 22) (q34; q11), t (1; 19) (q23; p13), то їхній негативний вплив повністю нівелює сприятливе прогностичне значення гіперплоїдії [131].

Половина всіх хворих на ГЛЛ із гіперплоїдією має додаткові хромосомні аберації, такі як дуплікації та нестача 1q, del (6q), проте їхній вплив вважають нейтральним. Тільки ізохромосома і (17) (q10), у результаті якої пухлинна клітина втрачає одну з двох копій гена *TP53*, вважається несприятливою прогностичною ознакою [133].

Важливо враховувати, що гіперплоїдні лейкозні клітини погано діляться при культивуванні. У зв'язку з цим рекомендовано культивувати один із паралельних зразків кісткового мозку короткочасно, а також використовувати для констатації гіперплоїдії методом FISH із застосуванням центромерних проб, проточної цитофлюориметрії з метою визначити ДНК-індексу, а також мікрочіпа для оцінки однонуклеотидних поліморфізмів (SNP; single nucleotide poly-morphism) [134, 136].

Ще одним сприятливим прогностичним фактором вважається транслокація t (12; 21) (p13; q22), у результаті якої формується химерний онкоген *ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)*. Ця транслокація виявляється у 25 % дітей із пре-B-ГЛ. У дорослих цей маркер спостерігаємо рідко. Для виявлення t (12; 21) використовується метод FISH, а для детекції експресії химерного онкогена *ETV6-RUNX1* – зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) [137, 138]. Прогноз у дітей з t (12; 21) (p13; q22) сприятливий. У 94 % носіїв цієї транслокації можливим є досягнення швидкої та ранньої відповіді на терапію. Одночасно з цією транслокацією в 75 % хворих виявлені додаткові генетичні аномалії, найчастіше делеція 12p, що спричиняє втрату незачепленою транслокацією t (12; 21) копії гена *ETV6* (55-70 % випадків), +21 (15-20 % випадків) і + der(21) t(12; 21) (10–15 % випадків). У хворих із del (12p) погіршуються показники виживання. Водночас результати лікування хворих з + der (21) t (12; 21) є гіршими, ніж із del (12p) та +21 [124].

При ГЛЛ дорослих найчастішою хромосомною аберацією є транслокація t (9; 22) (q34; q11.2) – Філадельфійська хромосома (Ph), яку виявляють у 11–29 % хворих [140]. Навпаки, при ГЛЛ у дітей Ph-хромосома є рідкісним маркером і функціонує в 1-3 % випадків [137]. Прогноз як у дорослих, так і у дітей із наявністю цього маркера вкрай несприятливий. Лише у 5 % дорослих із Ph+ ГЛЛ простежуємо протипухлинний ефект при використанні тільки стандартної хіміотерапії [141].

Наявність будь-яких перебудов гена *MLL* є несприятливим прогностичним фактором, їх пошук вкрай необхідний для правильного підбору терапії. Описано велику кількість варіантів генетичних порушень за участю регіону 11q23 [142]. У рутинній лабораторній практиці методом ЗТ-ПЛР найчастіше проводиться визначення тільки химерного гена *MLL-AF4*. При цьому серед усіх варіантів перебудов гена *MLL* на частку *MLL-AF4* припадає близько половини. Тому, на думку дослідників, при виявленні експресії пухлинними клітинами NG2 слід проводити поглиблений пошук перебудов гена *MLL* за допомогою мультиплексної зворотньо-транскриптазної-ПЦР, довгою інвертованою ПЛР та FISH, а не обмежуватися стандартним визначенням химерного гена *MLL-AF4*. Це особливо важливо саме в дитячому віці, де *MLL*-перебудови виявляються в більшості пацієнтів, а їхня наявність є найважливішим прогностичним фактором [142, 143].

Водночас при Ph-позитивному варіанті ГЛЛ на бластних клітинах зазвичай одночасно експресуються і мієлоїдні маркери – найчастіше CD13 і CD33. Деякі автори відзначають частіші рецидиви при експресії мієлоїдних антигенів у хворих на ГЛЛ. Італійська кооперативна група з вивчення ГЛЛ у дітей, на основі 908 спостережень, зазначила значно гірше безрецидивне та загальне виживання при експресії мієлоїдних маркерів на лімфобластах: 6-річне безрецидивне виживання в групі без експресії мієлоїдних маркерів склало 47 %, у групі з експресією – 0 % (p=0,01) [144].

У 2018 р. вчені з дитячого дослідницького госпіталю Святого Іуди вивчили варіант Т-ГЛЛ із ранніх Т-клітинних попередників (*ETP-ALL*; early T-

cell precursor ALL), при якому в бластних клітинах експресуються цитоплазматичний CD3, проте відсутні CD1 і CD8, а також слабо або зовсім не експресується CD5. Окрім того, у цих клітинах спостерігають аберрантну експресію маркерів стовбурових клітин та міелоїдного диференціювання [145, 146].

1.5 Генні трансформації в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями

При транслокаціях *IGH* виникають вторинні мутації *IKZF1* або *CDKN2A/B*, а при *t(9;22)/BCR-ABL1* можуть виникнути мутації *CDKN2A/B* і *PAX5* [63, 64]. Хоча первинні генні трансформації вважаються прогностично більш значущими порівняно з вторинними, усе більше досліджень націлені на розробку моделей прогнозування на основі комбінованої оцінки первинних і вторинних трансформацій, що може покращити точність стратифікації дітей, хворих на ГЛЛ [74-76].

Двома найголовнішими первинними хромосомними трансформаціями в дітей є транслокація *t(12;21)(p13;q22/ETV6-RUNX1* і гіпердиплоїдія (51-67 хромосом), що разом складають етіологію до 60 % ГЛЛ (25 % і 35 % відповідно) [69, 74, 75]. П'ятирічне виживання таких дітей складає 90 %, і наявність додаткових первинних або вторинних трансформацій мало впливає на прогностичні показники. Так, гіпердиплоїдія може виникати разом із *t(1;19)(q23;p13)*, що не впливає на прогноз [69, 75]. З іншого боку, делеція *IKZF1*, що є прогностично негативною майже при всіх первинних генних трансформаціях, є прогностично незначущою для більшості дітей із *t(12;21)(p13;q22/ETV6-RUNX1* [76].

З іншого боку, транслокації *KMT2A (MLL)*, *t(9;22)/BCR-ABL1*, *t(17;19)/TCF3-HLF*, *iAMP21*, близька гаплоїдія (24–30 хромосом) і низька гіподиплоїдія (31–39 хромосом) – це мутації, асоційовані з поганим прогнозом терапії [69]. Терапія пацієнтів із зазначеними генними трансформаціями проводиться згідно з інтенсифікованими протоколами [69, 78]. Однак така

терапія асоційована з високим ризиком смертельних і інвалідизуючих побічних наслідків [79]. Необхідно виділити з групи дітей, що підлягає інтенсифікації терапії згідно зі стандартною прогностичною класифікацією, пацієнтів, які можуть бути виліковані за стандартною або альтернативною схемою з метою зменшення побічних наслідків терапії. Також є необхідність ідентифікації пацієнтів із дуже поганим прогнозом, яким показана трансплантація кісткового мозку (ТКМ). Такої поглибленої стратифікації можна досягнути за допомогою визначення мутаційного статусу бластних клітин. Наприклад, було показано, що для близької гаплоїдії та низької гіподиплоїдії характерна схильність до таких вторинних трансформацій, як мутації гена *RAS* і *TP53* відповідно, що погіршують прогноз терапії. Разом із *KMT2A* мутацією, асоційованою з поганим прогнозом, можуть визначити $t(4;11)$ і $t(11;19)(q23;p13)$, які суттєво погіршують прогноз [75].

Аналіз мутаційного статусу вже сьогодні дозволив покращити результати терапії в окремих груп пацієнтів. Так, відомо, що пацієнти з транслокацією $t(9;22)/BCR-ABL1$ (4 % всіх ГЛЛ) добре реагують на терапію такими інгібіторами тирозинкіназ, як іматиніб і дасатиніб [82]. Окрім того, для вибору правильного препарату з групи інгібіторів протеїнкіназ необхідно досліджувати точкові мутації гена *ABL1* [81]. Багато інших нових імуно- і хіміотерапевтичних препаратів наразі проходять клінічні дослідження раціональності їх застосування для покращення результатів терапії. Так, автори дослідження С. Dafflon et al. розглянули можливі перспективи блокади шляху DOT1L для комплексного лікування дітей із транслокацією *KMT2A* [83].

Такі первинні трансформації, як: транслокація $t(1;19)TCF3/PBX$, транслокації гена *IGH* і група інших В-клітинних ГЛЛ, асоційовані з проміжним ризиком неуспішності терапії [69]. Вони наявні у 20–25 % усіх випадків ГЛЛ [70]. Подальша стратифікація ризику додатковими методами в цій групі дуже важлива. Так, в оглядовому дослідженні А. V. Moorman et al. показано, що група пацієнтів із хромосомними трансформаціями проміжного ризику дуже гетерогенна, і пацієнти по-різному реагують як на стандартні, так і

на інтенсифіковані протоколи терапії [69]. Стратифікацію дітей, хворих на ГЛЛ, усередині проміжної групи ризику на групи з кращим і гіршим прогнозом можна виконати за допомогою дослідження мутаційного статусу.

Найчастішими вторинними мутаціями є мутації генів *CDKN2A/2B*, *PAX5*, *ETV6*, і *IKZF1* [74]. Так, делеція *CDKN2A/B* у хворих на ГЛЛ дітей, за публікацією Mullighan CG et al., була незалежно асоційована з гіршим загальним виживанням і частішими ранніми рецидивами порівняно з контрольною групою дітей без мутації [82]. В іншому дослідженні O'Connor D. та ін. делеція *IKZF1* незалежно від інших генних трансформацій значно погіршувала прогноз [88]. Усе більше вчених підтверджує роль й інших мутацій для детальної стратифікації прогностичних груп [87, 89]. Як вище згадано, аналіз мутаційного статусу має найбільшу цінність для стратифікації групи проміжного й високого ризику. Так, наявність злиття генів *P2RY8-CRLF2* у дітей зі стандартним або проміжним ризиком, визначеним за стандартною схемою, значно погіршувала прогноз рецидиву, за дослідженням [90]. Окрім того, Meyer C et al. у дорослих визначили вплив на прогноз терапії таких варіацій числа копій генів: *IKZF1*, *CDKN2A/2B*, *PAX5*, *RB1*, *BTG1* [71]. У цьому аналізі пацієнти з більше ніж трьома зазначеними варіаціями копій генів мали значно нижчі прогностичні показники порівняно з іншими групами пацієнтів. Учені зазначають, що вплив кожної окремої варіації на прогноз був різним залежно від стандартно визначеної прогностичної групи й наявності додаткових мутацій. На думку науковців, такі дослідження необхідно проводити на більшій вибірці хворих, щоб визначити її справжню прогностичну цінність [73].

При вивченні мутаційного статусу дітей і дорослих із ГЛЛ було показано, що комплексну оцінку наявності мутацій можна використовувати навіть незалежно від цитогенетичної стратифікації ризику [71, 68]. На нашу думку, раціональніше досліджувати мутаційний статус у комплексі з іншими прогностичними характеристиками, що значно покращує точність прогнозу порівняно з кожним із методів, що застосовується окремо.

Надалі було показано, що частка варіанта *ETP-ALL* серед ГЛЛ у дітей і дорослих становить 10-15 %. Цей варіант пов'язаний із незадовільною відповіддю на лікування вже у фазі індукції та низькими показниками безпідійного виживання. При *ETP-ALL* відсутні звичайні для Т-ГЛЛ активні мутації гена *NOTCH1* [146] та делеції *CDKN2A/B*, а також звичайні хромосомні аномалії. За допомогою глибокого секвенування було виявлено, що при цій формі Т-ГЛЛ виникають генетичні дефекти, які зачіпають три відомих регуляторних шляхи: Ras та/або JAK-STAT, модифікацію гістонів та регуляцію дозрівання гемопоетичних клітин. У 58 % випадків *ETP-ALL* знайдені мутації, що призводять до втрати функцій, і домінантно-негативні мутації генів, робота яких порушується і при інших онкогематологічних захворюваннях (*RUNX1*, *IKZF1*, *ETV6*, *GATA3* і *EP300*). Мутації *RUNX1* відомі при мієлоїдних лейкозах, а *IKZF1* і *ETV6* описані при В-ГЛЛ. Окрім того, при *ETP-ALL* знайдені мутації генів *NRAS*, *KRAS*, *JAK1*, *NF1*, *JAK3*, *SH2B3*, *IL7R* і *EZH2*.

У 70 % дітей із діагнозом ГЛЛ виявляють транслокації, які залучають локус 11q23, із розривами гена *MLL*. Із віком частота цих транслокацій знижується, ймовірність їх виявлення в підлітків і дорослих становить 1-2 % та 4-9 % відповідно [93]. Серед цих транслокацій найчастішою є $t(4; 11)(q21; q23) / MLL-AFF1 (AF4)$, її виявляють у 50 % хворих.

Рідше трапляється $t(11; 19)(q23; p13.3) / MLL-MLLT1 (ENL)$, ще рідше – $t(9; 11)(p22; q23) / MLL-MLLT3 (AF9)$, $t(10; 11)(p13-15; q14-21) / MLL-MLLT10 (AF10)$ та ін. [134]. Транслокації $t(4; 11)$ і $t(11; 19)$ визначають поганий прогноз при ГЛЛ у дітей та дорослих [136]. А. V. Moorman зі співавт [75] показав, що в підлітків із Т-ГЛЛ із $t(11; 19)$ прогноз сприятливіший, ніж при В-ГЛЛ у носіїв аналогічного цитогенетичного маркера. Одночасно з транслокаціями, що зачіпають локус 11q23, у ядрах пухлинних клітин хворих при ГЛЛ можуть спостерігатися додаткові хромосомні аномалії. У 30 % хворих із $t(4; 11)$ виявляються +X, +8, і (7)(q10), аномалії 7p і 9p.

До числа вторинних хромосомних аномалій, синхронно з $t(11; 19)$, належать $+X$, $+8$ і $del(6q)$. У цей час вважають, що ці додаткові аномалії ніяк не змінюють прогнозу у хворих із $t(4; 11)$ і $t(11; 19)$ [136, 137].

Дані відносно прогностичного значення транслокації $t(1; 19)(q23; p13.3)/TCF3-PBX1$ є суперечливими. Вона виявляється в 1-3 % дорослих хворих на ГЛЛ та в 1-6 % дітей. Ця транслокація може бути збалансованою або незбалансованою, тобто $der(19)(1; 19)$ та одна нормальна хромосома 1 або $der(19)(1; 19)$ та дві нормальні хромосоми 1. Більшість хворих на ГЛЛ із $t(1; 19)$ мають псевдодиплоїдний каріотип та належать до пре-B-клітинного підваріанта. Низка авторів вважає, що в дорослих із ГЛЛ на фоні цієї транслокації результати лікування незадовільні. Інші, навпаки, вважають, що цих пацієнтів слід віднести до групи сприятливого прогнозу. Мабуть, це пов'язано із застосуванням різних режимів хіміотерапії. Наприклад, використання режиму гіпер-CVAD для лікування ГЛЛ із $t(1; 19)$ істотно покращує прогноз. При ГЛЛ у дітей цей цитогенетичний маркер служить незалежним чинником високого ризику рецидивів з ураженням ЦНС [138].

Результати лікування визнають як незадовільні у хворих В-ГЛЛ із внутрішньохромосомною ампліфікацією хромосоми 21 ($iAMP21$), яка виявляється у 2 % дітей та 0,5 % дорослих. Ампліфіковану ділянку містить ген *RUNX1*, у результаті чого збільшується кількість копій цього гена. У хворих ГЛЛ із цим маркером у 3 рази підвищується ризик рецидивів та у 2 рази – ризик летального прогнозу [139].

Критерієм несприятливого прогнозу ГЛЛ є наявність комплексного каріотипу, який визначається як присутність у пухлинних клітинах більше 3-5 хромосомних порушень [140]. Серед усіх ГЛЛ 16-25 % припадають на частку Т-ГЛЛ у дорослих [139] та 8–15 % – у дітей. У половини первинних хворих Т-ГЛЛ виявляється нормальний каріотип, у 30-40 % – транслокації за участю Т-клітинних рецепторів (TCR) локусів 14q11 (TCRA / TCRD) або 7q34 (TCRB). У дорослих найчастішою транслокацією цього типу є $t(10; 14)(q24; q11.1)$, яка призводить до гіперекспресії гена *TLX1 (HOX11)* та пов'язана зі сприятливим

прогнозом [141]. При Т-ГЛЛ у дітей у 3-6 % випадків виявлений $t(1; 14)(p32; q11.2)$, що викликає гіперекспресію гена *TAL1 (SCL)* з хромосоми 1 у зв'язку з близьким сусідством із *TCRD* із хромосоми 14. Іншою причиною гіперекспресії *TAL1* є кріптична делеція хромосоми 1, у результаті якої утворюється химерний злитий білок *TAL1STIL*. Ця делеція охоплює 16-26 % випадків Т-ГЛЛ у дітей.

У 20-30 % випадків Т-ГЛЛ у дітей виявляють транслокацію $t(5; 14)(q35; q32)$, що зближує гени *TLX3*, *BCL11B* та викликає гіперекспресію останнього. Отже, $del(1)$, $t(5; 14)$ і $t(10; 14)$ – найчастіші маркери Т-ГЛЛ у дітей. У дорослих вони трапляються рідко. Кріптична ампліфікація сегмента хромосоми 9 призводить до злиття генів *NUP214 (nucleoporin)* і *ABL1*. Послідовності ампліфікованого гена *NUP214-ABL1* локалізуються в субмікроскопічних кільцевих екстрахромосомних ДНК (Епісоми) [142].

Продукт цього химерного онкогена, білок *NUP214ABL1*, є тирозинкіназою, що за своїми властивостями нагадує *BCR-ABL1*. Він може бути інгібований нілотинібом або дазатинібом [143]. За допомогою FISH та мікрочіпів SNP можна виявити перебудови гена *CRLF2* в 7 % випадків ГЛЛ у дітей та 50 % ГЛЛ, пов'язаних зі синдромом Дауна (DS-ALL). Ген *CRLF2* розташований у псевдоаутосомному регіоні (PAR1) в локусах Xp22.3 / Yp11.3 і кодує подібний цитокиновим рецепторам фактор 2 (*CRLF2*; cytokine receptor-like factor 2). Спільно з рецептором інтерлейкіну-7 (IL7R) *CRLF2* формує гетеродімерний рецептор тимічного стромального лімфопоетину. У результаті хромосомної перебудови ген *CRLF2* переноситься в локус генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGH-CRLF2*) або внаслідок фокальної делеції формує химерний ген *P2RY8-CRLF2*. Обидва види хромосомних перебудов призводять до гіперекспресії білка *CRLF2* на поверхні лімфобластів [144].

Велике значення в патогенезі ГЛЛ мають субмікроскопічні дефекти генів [135, 136]: мікроделеції, мікроінсерції та точкові мутації. Багато з порушених цими мутаціями генів відіграють ключову роль у лімфоїдному диференціюванні (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* і *LMO2*), регулюють клітинний цикл (*CDKN2A / CDKN2B*, *PTEN* і *RBI*), відповідають за внутрішньоклітинний

сигналінг (*BTLA*, *CD200*, *TOX* і глюкокортикоїдний рецептор *NR3C1*), є регуляторами транскрипції і коактиваторами (*TBL1XR1*, *ETV6* і *ERG*). Види та частота субмікроскопічних генетичних дефектів істотно розрізняються при різних підтипах ГЛЛ. Наприклад, при ГЛЛ із перебудовами гена *MLL*, що виникають у результаті транслокацій t (4; 11), t (11; 19), субмікроскопічні мутації вкрай рідкісні. Навпаки, у хворих ГЛЛ з t (9; 22) / *BCR-ABL1* і t (12; 21) / *ETV6-RUNX1* такі мутації трапляються дуже часто [145].

Мутації гена *ERG* (ETS-related gene) наявні винятково в тих хворих із В-ГЛЛ, у яких відсутні хромосомні перебудови [126]. У зв'язку з цим В-ГЛЛ із нормальним каріотипом та мутаціями гена *ERG* сьогодні виділяють як окрему форму лейкозу, що відрізняється сприятливим клінічним перебігом. У гені *ERG* у таких хворих відсутні екзони в середній його частині, у результаті чого в мутантному білку втрачаються центральний інгібіторний та направляючий домени. Мутантний білок *ERG* служить конкурентним інгібітором нормального білка *ERG* [146]. Зміни транскрипційної регуляції лімфоїдного диференціювання виникають у результаті мутацій генів *PAX5*, *IKZF1* і *EBF1* в 70 % випадків В-ГЛЛ [147].

Мутації гена *PAX5* виявляються у 30 % хворих на В-ГЛЛ, при цьому жодного зв'язку цих мутацій із клінічними особливостями перебігу лейкозу не виявлено. Серед інших мутацій особливого значення при В-ГЛЛ мають дефекти гена *IKZF1*, тому що вони пов'язані з несприятливим прогнозом [142]. Делеції та точкові мутації *IKZF1* виявляються в 15 % випадків ГЛЛ у дітей. Це характерна ознака групи 2-го типу з несприятливим прогнозом. Ген *IKZF1* кодує білок *IKAROS*, необхідний для диференціювання лімфоцитів транскрипційним фактором, що містить домен «цинкових пальців» [147].

Мутації гена *IKZF1*, властиві хворим на ГЛЛ, можуть бути у вигляді протяжних делецій, у результаті яких цей ген та відповідна функція втрачаються, або коротких внутрішньогенних делецій 4-7 екзонів, що призводять до втрати N-кінцевого ДНК-зв'язуючого домену «цинкових пальців» та до експресії укороченої домінантно-негативної ізоформи *IK6* [147].

Мутації цього гена охоплюють до 70 % *BCR-ABL1*-позитивних хворих з ГЛЛ, включно з випадками розвитку захворювання *de novo* та епізодами прогресування хронічного мієлолейкозу в лімфоїдний варіант бластного кризу. Ці мутації пов'язані з несприятливим прогнозом у *BCR-ABL1*-позитивних хворих на ГЛЛ [148].

Із використанням моделей трансгенних тварин показано, що делеції генів *PAX5* і *IKZF1* підвищують ймовірність розвитку ГЛЛ на тлі експресії химерного онкогена *BCR-ABL1*. У хворих на ГЛЛ виникають хромосомні перебудови, що призводять до гіперекспресії гена *CRLF2*. Гіперекспресію цього гена викликає також мутація p.Phe232Cys *CRLF2* [145]. Встановлено, що мутації гена *CRLF2* пов'язані з мутаціями генів сімейства Янус-кіназ (*JAK1* і *JAK2*), які не властиві ГЛЛ, за винятком Т-лінійних форм. Найчастіше при цьому виявляють мутацію в положенні R683 псевдокіназного домену *JAK2*, тобто в стороні від відомої мутації *JAK2V617F*, характерної для хронічних мієлопроліферативних захворювань. Переважна більшість випадків В-ГЛЛ із мутаціями в *JAK1 / 2* має зміни гена *CRLF2* і, навпаки, до 50 % хворих на ГЛЛ із мутаціями *CRLF2* мають також мутації в *JAK1 / 2*. Окрім того, мутації *CRLF2* та *JAK1 / 2* поєднуються також із мутаціями / делеціями *IKZF1*. Загальний профіль експресії генів у лейкозних клітинах таких хворих збігається з профілем експресії в пухлинних клітинах при *BCR-ABL1* + ГЛЛ. Поєднання цих мутацій пов'язано з несприятливим прогнозом ГЛЛ.

Дослідження С. G. Mullighan зі співавт. [81, 82] показали, що у хворих на ГЛЛ частіше, ніж точкові мутації, відбувається зміна числа копій генів, відповідальних за лімфоїдне диференціювання або тих, що беруть участь у процесі канцерогенезу (наприклад, *PAX5*, *BCL11B*, *FBXW7*, *IKZF1*, *LEF1*, *WT1*, *PTEN1* і *NF1*). При цьому, навпаки, делеції / мутації *IKZF1*, якщо вони були в дебюті, то зберігалися і при рецидивах або ж виникали при рецидивах *de novo*. При рецидивах ГЛЛ у 20 % хворих виявлені також мутації або делеції гена *CREBBP*, який кодує транскрипційний коактиватор – зв'язує ацетилтрансферазою білок *CREB* [147].

У таблиці 1.6.1 продемонстровані основні молекулярні маркери експресії ГЛЛ [59].

Мутації цього гена характерні для гіпердиплоїдного варіанта ГЛЛ, прогноз якого сприятливий. Аналіз мутацій CREBBP показав, що вони зачіпають домен, який відповідає за гістонацетилтрансферазну активність [148]. Мутантний білок CREBBP викликає резистентність до глюкокортикоїдів, наслідком чого буває невдала терапія [140]. Для подолання цієї резистентності необхідно використовувати речовини, які модулюють рівень ацетилювання гістонів, наприклад, інгібітори гістондеацетилазу. Нещодавно було доведено, що мутації гена TP53, які рідко бувають у дебюті ГЛЛ, виявляються при рецидивах та пов'язані з несприятливим прогнозом [131].

Таблиця 1.6.1

Молекулярні маркери експресії ГЛЛ, [59]

Визначення рівня експресії	<p>Ген PRAME</p> <p>Ген WT1</p> <p>Ген BCR-ABL <i>t(9;22)(q34;q11)</i></p> <p>Ген MLL-AF4 <i>t(4:11)(q21;q23)</i></p> <p>Ген ETV6-RUNX1 <i>t(12;21)(p13;q22)</i></p> <p>Ген E2A-PBX1 <i>t(1;19)(q23;p13)</i></p>
Визначення дуплікації	MLL
Визначення Т- або Т-клітинної клональності	TCR BCR

Опубліковано кілька робіт, присвячених пошукові невідомих раніше генетичних дефектів при Т-ГЛЛ із використанням методів секвенування нового покоління (NGS; next generation sequencing). Зазначено, що пік захворюваності Т-ГЛЛ зареєстрований у хлопчиків-підлітків, отже, патогенез цього захворювання пов'язаний зі статтю та початком статевого дозрівання. У зв'язку з цим у хворих Т-ГЛЛ за допомогою NGS було проведено глибоке

секвенування екзонів X-хромосомних генів. У результаті були виявлені мутації гена *PHF6*, який кодує домен «цинкових пальців» – білок, який є транскрипційним фактором (PHD finger protein 6) [130].

Таким чином, при формулюванні діагностичного висновку необхідно дотримуватися загальноприйнятої термінології відповідно до критеріїв діагностики того або іншого варіанта ГЛЛ. У висновку відображена повна картина імунофенотипування, у яку входять ідентифікаційні дані про хворого, дані про експресію окремих маркерів, характеристика переважаючого паростка, наявність та опис додаткових пухлинних популяцій, а також відсотковий вміст бластів у зразку [52].

Водночас істотні відмінності формату висновків вкрай ускладнюють стандартизацію імунофенотипування [142]. Необхідним є регламентування як переліку антигенів та ступеня їх експресії, так і описової частини бланка. За зразок можуть бути взяті вже наявні приклади, прийняті в різних дослідницьких групах [121, 128]. Можлива також і розробка оригінальної системи документування результатів.

Клінічне значення виявлення молекулярно-генетичних маркерів при ГЛЛ є предметом дискусій. Традиційно в більшості лабораторій такі коекспресії вказують у висновку. Також актуальним є питання, наскільки доцільно озвучувати зроблені на основі імунофенотипу припущення про наявність тих чи інших молекулярно-генетичних аберацій [28, 134].

Окрім того, важливо додати до необхідного набору молекулярних маркерів ті, які показують високу прогностичну значимість. Уже при підозрі на гострий лейкоз можна проводити кількісне визначення експресії генів *PRAME* та *WT1*. Ці маркери універсальні: характерні як для ГЛЛ, так і для ГМЛ. Інтенсивність експресії цих генів добре корелює з кількістю пухлинних клітин, тому за допомогою цих маркерів можна визначати ступінь первинного пухлинного ураження, проводити моніторинг пухлинної маси для оцінки ефективності лікування, прогнозувати молекулярний рецидив [148]. У мінімальний набір молекулярних маркерів слід додати й такі чинники

несприятливого прогнозу, як: часткову тандемну дуплікацію гена *MLL*, химерні онкогени *BCR-ABL1* p190, *MLL-AF4* і *E2A-PBX1*. Доведеним чинником сприятливого прогнозу є експресія химерного онкогена *ETV6-RUNX1*, тому його також доцільно додати до панелі маркерів ГЛЛ [132]. У пухлинних клітинах при ГЛЛ, що утворюються з лімфоцитів, можуть бути використані як молекулярні маркери гени Т-клітинних рецепторів (при Т-ГЛЛ) та гени імуноглобулінів (при В-ГЛЛ). Ці маркери стабільні та дозволяють із високою чутливістю і специфічністю визначати мінімальну залишкову хворобу при ГЛЛ.

Висновки до розділу.

1. Алгоритм послідовної оцінки маркерів при інтерпретації даних аналізу біологічного матеріалу пацієнтів онкогематологічного профілю може спотворювати результати імунофенотипового діагнозу, який значно визначає характер і час початку терапії з використанням нових протоколів та методів лікування, що включають трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин.

2. Вимоги до діагностики залишаються незмінними: потрібно не тільки виявити пухлинну популяцію, а й повноцінно описати її, зіставити її з незміненими нормальними клітинами, за їх наявності у зразку. Пріоритети у виборі антитіл та формування діагностичних можливостей можуть визначати різні чинники, серед яких – досвід та професійний рівень співробітників лабораторії; специфічні умови лабораторії, яка проводить дослідження; вид біологічного матеріалу; доступність додаткової клінічної та морфологічної інформації; докладний опис фенотипу пухлинних та / або нормальних клітин у зразку для формулювання імунофенотипового діагнозу; моніторинг ефективності хіміотерапії або виявлення мінімальної залишкової хвороби.

Матеріали даного розділу опубліковані українською мовою у статті:

Винницька О. А., Дубей Н. В., Дорош О. І., Дубей Л. Я. Перспективи розвитку дослідження мутаційного статусу в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями. *Український медичний часопис*. 2018; Т. 2 – ІХ/Х. 5(127):24-27.

<https://www.umj.com.ua/article/131015/perspektivi-rozvitku-doslidzhennya-mutatsijnogo-statusu-v-ditej-iz-gostrimi-limfoblastnimi-lejkemiyami>

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика хворих

Обстежено 105 дітей із вперше діагностованою гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ), які перебували на лікуванні в гематологічних відділеннях КНП ООР «Одеська обласна дитяча клінічна лікарня», КНП ХОР «Харківська обласна дитяча клінічна лікарня № 1», КНП ЧОР «Чернівецька обласна клінічна дитяча лікарня», КП РОР «Рівненська обласна дитяча лікарня». Хворі поступали на первинне стаціонарне лікування з 11.05.2016 р. до 13.06.2019 р. Контроль за віддаленими результатами припинено 1 липня 2019 р. У дослідження не включали дітей, що вибули з-під нагляду через відмову батьків продовжувати хіміотерапію, та хворих, що до початку програмної терапії отримували цитостатики / преднізолон.

Серед обстежених було 62 хлопчики (59,0 %) та 43 дівчинки (41,0 %).

Медіана віку пацієнтів становила 6 років (коливання від 12 міс. до 16 років), у тому числі медіана віку хлопчиків була 7 років 4 міс. (коливання 12 міс. – 16 років) і дівчаток – 6 років 4 міс. (12 міс. – 15 років). Серед них переважали діти віком від 1 до 6 років – 49 осіб (46,7 %), менш численними були групи хворих, віком старших за 12 років – 15 (14,3 %) пацієнтів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розподіл хворих ГЛЛ за статтю та віком

Стать / роки	Вік					Усього
	$\geq 1 < 3$	$\geq 3 < 6$	$\geq 6 < 9$	$\geq 9 < 12$	≥ 12	
Хлопчики	8	21	12	10	11	62
Дівчатка	4	16	14	5	4	43
Усього	12	37	26	15	15	105

Діагностику захворювання проводили із застосуванням таких методів візуалізації: ультразвукового дослідження (УЗД), рентгенографії органів

грудної клітки, комп'ютерної томографії (КТ) або магнітно-резонансної томографії (МРТ) голови, органів грудної клітки, черева; пункцій КМ. Окрім основних діагностичних методів, визначали наявність або відсутність хромосомних аномалій та експресію прогностично важливих онкогенів.

Для встановлення діагнозу гострої лейкемії використовували дані клінічної картини, дані аналізу периферійної крові, цитологічного дослідження аспірату кісткового мозку (КМ) (відсоток бластів $\geq 25,0$ % усіх нееритроїдних клітин), а лімфоїдну належність бластів кісткового мозку і крові виявляли за допомогою морфологічного, цитохімічного та імунофенотипового досліджень.

Незалежне та генетичні дослідження проводились у Референтній лабораторії НДСКЛ «ОХМАТДИТ», м. Київ (завідувач – О.С. Кремінська). Алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин/кісткового мозку (ало-ТГСК/ало-ТКМ) від неродинного донора виконувалась у всіх випадках у закордонних клініках.

Умови проведення цитостатичної хіміотерапії

Хіміотерапія проводилася за програмою міжнародної групи BFM – ALLIC-BFM 2009, затвердженою МОЗ України як галузевий стандарт у 2010 р. Аналіз наявності або відсутності хромосомних аномалій та експресії прогностично важливих онкогенів визначав стратифікацію пацієнтів. Імуноцитологічне виявлення мінімальної залишкової – резидуальної – пухлини (minimal residual disease, MRD) служило основою для зарахування пацієнтів до тієї чи іншої групи ризику. Так, за результатами визначення на 15-й день лікувального протоколу методом проточної цитометрії виявлені 10 % лейкемічних клітин серед нуклейованих клітин кісткового мозку були підставою для віднесення пацієнта до групи високого ризику (ГВР) із найсуттєвішим об'ємом поліхіміотерапії. Впровадження такого моніторингу дозволило індивідуалізовано підходити до терапії кожного окремого пацієнта для поліпшення загального результату його лікування.

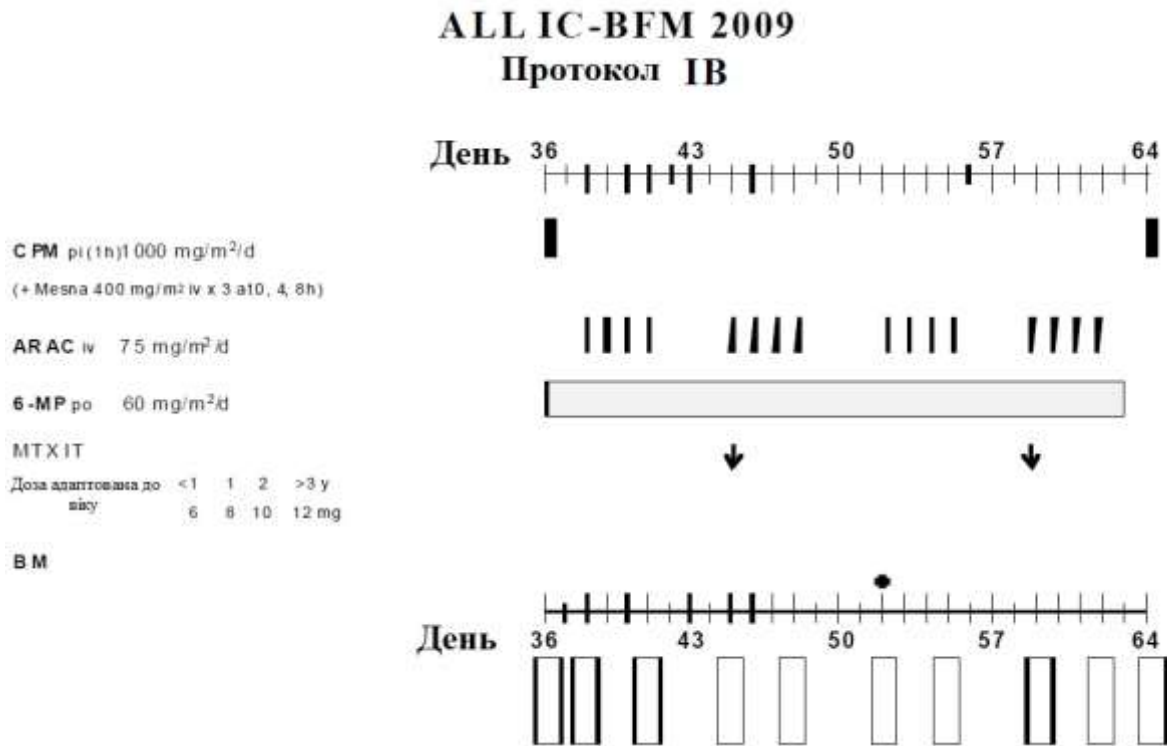
Стратифікація хворих до певних груп ризику проводилася відповідно до рекомендацій програми ALLIC-BFM 2009. Усіх хворих розділено на 3 групи

ризик: низький (ГНР), стандартний (ГСР) і високий (ГВР). Рання відповідь на терапію преднізолонової префази (PRED) є найважливішим принципом стратифікації в дослідженні. Визначається за абсолютною кількістю бластів (АКБ) у периферійній крові (ПК) на 8-й день після 7 днів попередньої фази застосування та однієї інтратекальної (і/т) дози метотрексату (MTX) у 1-й день із застосуванням алопуринолу або без нього. Днем першої дози PRED є 1-й день протокольної індукційної терапії. Пацієнти з АКБ на 8-й день < 1000 /мкл у ПК є пацієнтами з хорошою відповіддю на преднізолон (ХВП). Залежно від конкретної константації й поєднання прогностичних факторів їх можуть віднести як до ГНР, так і до ГСР. На відміну від них пацієнти з бластами ≥ 1000 /мкл у ПК належать до осіб із поганою відповіддю на преднізолон (ПВП) і повинні отримувати лікування, відповідне для ГВР, незалежно від того, якою буде подальша відповідь на терапію в досягненні ремісії.

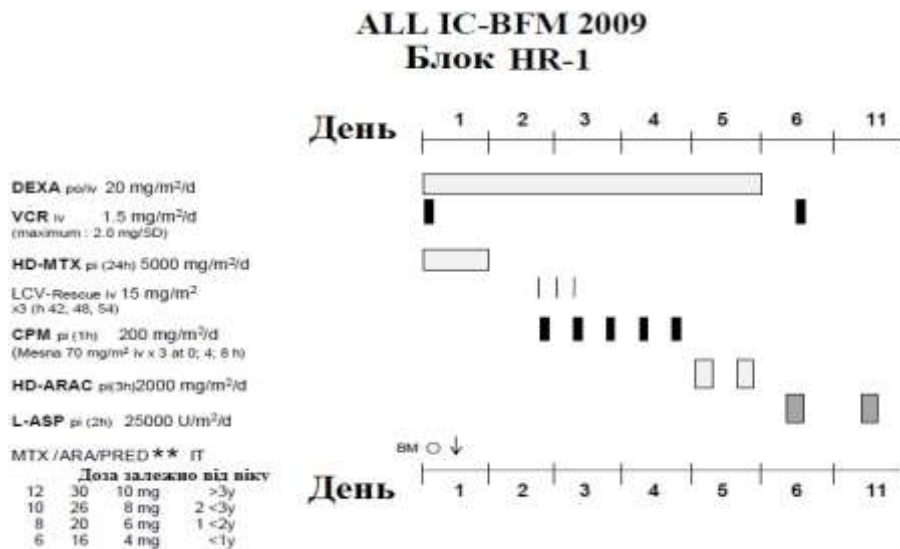
Оцінку статусу КМ проводили на 15-й день після 2 тижнів преднізолонової префази, однієї дози вінкристину, даунорубіцину й аспарагінази і двох доз MTX і/т. Діти, які мали б бути розподілені у ГНР чи ГСР відповідно до початкової кількості лейкоцитів, віку та відповіді на преднізолон на 8-й день, через статус КМ М3 із числом бластів на 15-й день ≥ 25 % були переведені в ГВР.

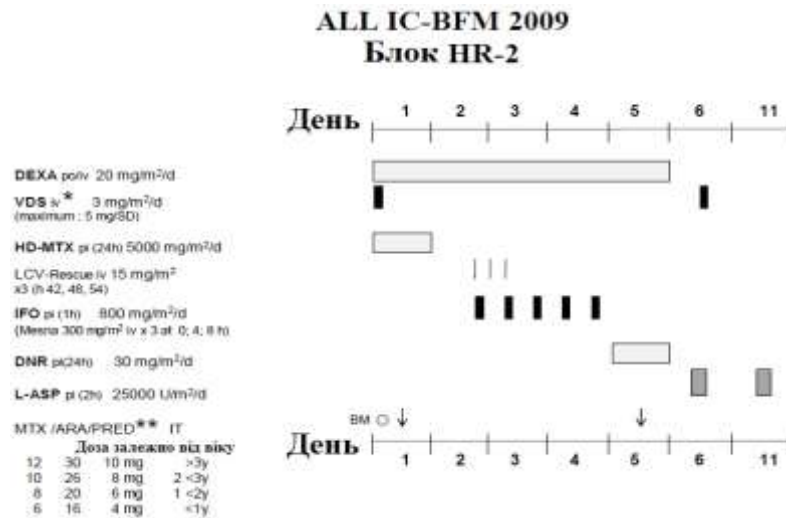
Таким чином, до ГНР віднесено осіб віком від 1 року до 6 років, із рівнем лейкоцитів менше 20,0 Г/л, абсолютною кількістю бластів на 8-й день PRED менше 1,0 Г/л, цитомофологічною кістково-мозковою ремісією на 15-ий (статус КМ М1 (бластів не більше 5,0 %)) та на 33-й день лікування, MRD на основі ПЛР на 15-ий день у КМ менше 0,1 %. До ГСР належали хворі, віком старші 6 років, з ініціальним лейкоцитозом 20,0 Г/л і більше, бластемією на 8-й день терапії менше 1,0 Г/л, статусом КМ М2 (бластів $\geq 5,0$ % – $< 25,0$ %), з MRD $> 0,1$ і < 10 % та кістково-мозковою ремісією на 33-й день. До ГВР належать діти з бластемією на 8-й день терапії більше 1,0 Г/л і / або відсутністю кістково-мозкової ремісії на 33-й день I протоколу та MRD > 10 %. Діти, у яких при молекулярно-генетичному та цитогенетичному дослідженнях

повної ремісії на 33-й день лікування за протоколом, проводилась повторна оцінка статусу ремісії на 52-й день лікування за протоколом ІВ.



У разі потреби – перед 1-м блоком HR1, і перед 1-м блоком HR2.





Оцінка цих результатів дає можливість терапевтичного розподілу дітей із ГВР, аби чітко виокремити пацієнтів, які підлягають ало-ТКМ чи подальшій хіміотерапії.

За протоколом розмежовують наступні стани:

- первинно-резистентні хворі – без відповіді на лікування («non responder» – NR), у яких у пунктаті кісткового мозку на 33-й день та після завершення протоколу I виявляли понад 5 % бластних клітин і / або бласти у спинно-мозковій рідині;
- рання смерть – наступила до 33-го дня протоколу I;
- смерть у ремісії – виникла від будь-якої причини після досягнення клініко-гематологічної ремісії на різних етапах протокольного лікування та після його закінчення;
- подія –включала рецидив; резистентність до терапії; смерть; виникнення вторинної пухлини.

2.2 Методи дослідження

У роботі застосовано загальноклінічні (наявність збільшених лімфатичних вузлів, печінки, селезінки, екстрамедулярних пухлинних інфільтратів, проявів нейролейкемії, анемічного та геморагічного синдромів, інфекційних ускладнень), цитологічні (підрахунок гемограми та мієлограми,

цитозу ліквору, у препаратах, виконаних на цитоспіні, у паноптично забарвлених мазках за Мей-Грюнвальд-Гімза). Для типування цитоморфологічного підваріанта використовували критерії за FAB-класифікацією.

Визначення формених елементів крові

У всіх дітей, хворих на ГЛЛ, проведено аналіз периферійної крові на гемоаналізаторі Coulter-GTP (Франція) методом кондуктометрії (підрахування клітин шляхом вимірювання коливань електричного опору, які виникають на рівні невеликого отвору в момент проходження клітин у провідну систему). Об'єм усієї крові, взятої апаратом, становив 100 мкл. Шляхом венозної чи капілярної пункції здійснювався забір крові, яка поміщалася у пробірки з антикоагулянтом (ЕДТА). Обережно, упродовж двох хвилин, змішувалася кров з антикоагулянтом. Пробірку з досліджуваною кров'ю підставляли під аспіраційний катетр так, щоб носик катетера впирався у дно пробірки, пізніше натискали кнопку «Start». Усі підрахунки здійснювали упродовж 24 годин. Визначали: загальну кількість лейкоцитів (WBC), відсоток лімфоцитів та моноцитів, а також загальну кількість гранулоцитів; загальну кількість еритроцитів (RBC), концентрацію гемоглобіну (Hb) та гематокритну величину (Ht), середній об'єм еритроцитів (MCV), середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті (MHC) та середню концентрацію гемоглобіну в одному еритроциті (MHCN), коливання розмірів еритроцитів; загальну кількість тромбоцитів, гематокрит тромбоцитів, їх середній об'єм, а також коливання розмірів тромбоцитів. Для контролю якості використовували стандартні зразки крові CBC-ST Plus TV: Normal, Abnormal Low, Abnormal High.

Морфологічну оцінку мазків периферійної крові, пофарбованих за методом Мей-Гімзе-Грюнвальда, здійснювали за допомогою мікроскопа CNfl (Німеччина).

Імунофенотипування бластних клітин

У Референтній лабораторії НДСКЛ «ОХМАТДИТ», м. Київ (завідувач – О.С. Кременська) проводилось імунофенотипування бластних клітин кісткового мозку, в окремих випадках у периферійній крові.

Імунофенотипова діагностика ГЛЛ ґрунтувалася на детальному вивченні антигенів мембрани й цитоплазми злоякісних клітин, тобто виявленні експресії на бластних клітинах лінійно-специфічних і стадієспецифічних маркерів, за допомогою панелі моноклональних антитіл (МКАТ). Сукупність поверхневих і цитоплазматичних маркерів у більшості випадків ГЛЛ була основою встановлення лінійної належності, виділення стадій зрілості прекурсорів В- чи Т-лімфоцитів.

Як матеріал, використовували зразки КМ. Імунофенотипування проводили на свіжих зразках аспірата КМ методом проточної цитофлуориметрії [9]. Для цього з використанням градієнта щільності (Histopaque-1077 (Sigma)) зі зразка тканини КМ, отриманого після діагностичної пункції, виділяли моноклеарне кільце. Потім відбирали отримані клітини, проводили лізування еритроцитів і двічі відмивали в розчині фосфатного буфера. Отриману суспензію клітин у концентрації 1 млн/мл вносили в сухі чисті пробірки (по 100 мкл) і додавали МКАТ у кількості, зазначеній фірмою-виробником в інструкції із застосування.

Ідентифікацію антигенів проводили з використанням широкої панелі МКАТ (Becton Dickinson, США і ДАКО, Данія). МКАТ, які застосовували в дослідженні, були кон'юговані з флюорохромами флюоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC) або фікоеритрином (PE). Імунофенотипова діагностика ГЛЛ ґрунтувалася на детальному вивченні антигенів мембрани й цитоплазми злоякісних клітин, тобто виявленні експресії на бластних клітинах лінійно-специфічних і стадіє-специфічних маркерів, за допомогою панелі МКАТ. Сукупність поверхневих і цитоплазматичних маркерів у більшості випадків ГЛЛ були основою встановлення лінійної належності, виділення стадій зрілості прекурсорів В- чи Т-лімфоцитів. На основі концепції відповідності фенотипу злоякісних клітин фенотипу нормального клітинного аналога на кожному рівні

диференціації виділено низку імунологічних варіантів, що визначають клітинну природу лейкемії й рівень блоку диференціації в неопластичній популяції.

Панель МКАТ включала 22 типи, спрямованих до різних кластерів диференціації (CD). Панель МКАТ була підбрана так, щоб можна було охарактеризувати різні лінії та стадії лімфопоезу та зіставити з ними фенотипові ознаки бластних клітин в обстежених хворих на ГЛЛ. У панель були включені МКАТ до деяких мієлоїдних антигенів, бо в літературі є повідомлення про експресію мієлоїдних маркерів на бластах лімфоїдного походження, а також для можливої діагностики біфенотипових випадків захворювання [146]. Це такі:

- лінійно-незалежні – CD34, HLA-DR, CD38, CD10, Anti-TdT;
- В-лінійні – CD19, CD20, CD22, CD79a, CD58;
- Т-лінійні – CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8;
- мієлоїдні – CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, CD117.

У дослідження включено цитоплазматичний маркер cCD3.

В аналізі застосовано також подвійне маркування з використанням наступних комбінацій МКАТ: CD19/CD34, CD19/CD33, CD19/CD38, CD10/CD38, CD10/CD19, CD10/CD34, CD33/CD34.

Оцінку результатів проводили на проточному цитометрі BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) у гейті бластних клітин, які ідентифікували за фізичними параметрами світлорозсіювання (FSC і SSC) [10]. Враховували рекомендації фірми-виробника з калібруванням проточного цитометра CaliBRITE Beads, програмним забезпеченням AutoCOMP та за умови негативного ізотипового контролю.

Антигенпозитивними вважали випадки з експресією маркера більше 20 % пухлинних клітин для лімфоїдних та лінійно-незалежних і 30 % для мієлоїдних маркерів. Тому надалі в таблицях і в тексті весь аналіз матеріалу, разом із статистичним, проводився з урахуванням цих меж.

Для оцінки лінійної належності бластних клітин застосовували критерії діагностики GALGB [146] та EGIL [37].

Молекулярно-генетичні дослідження

Визначення генних гібридів за допомогою FISH-дослідження.

Приготування препаратів для FISH-дослідження здійснювали шляхом нанесення суспензії клітин на предметне скло. За допомогою світлового мікроскопа визначали ділянку з достатньою кількістю ядер, на яку наносили 1,5 мкл ДНК-зонда (приготовленого за інструкцією виробника Cytocell aquarius, Німеччина). У дослідженнях використовували такі ДНК-зонди: LPH 081 AF4/MLL Translocation; LPH 007 BCR/ABL Translocation; LPH 079 E2A/PBX1 Translocation; LPH 012 TEL/AML Translocation.

Після нанесення відповідних зондів предметне скло накривали покривним склом, по периметру якого наносили клей для запобігання проникнення повітря. Денатурацію препарату й зонда проводили при $t=73^{\circ}\text{C}$ протягом 2 хв, гібридизацію виконували при $t = 37^{\circ}\text{C}$ не менше 16 годин. Після завершення гібридизації надлишок ДНК-зонда видаляли промивкою предметного скла в розчині 0,4 SSC / 0,3 % NP-40 протягом 2 хв при $t = 73^{\circ}\text{C}$ у водяній бані, потім протягом хвилини в розчині 2 SSC / 0,1 % NP-40 при кімнатній температурі. Для фарбування ядер, після висушування скла, на препарат наносили розчин DAPI [7]. Візуалізацію сигналів проводили під флуоресцентним мікроскопом.

Визначення рівня експресії генів полімеразною ланцюговою реакцією. Для виявлення рівня експресії злитих генів *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML* застосовували метод ПЛР. ПЛР проводили з використанням комплементарної ДНК (кДНК), отриманої реакцією зворотної транскрипції (ЗТ) з РНК за допомогою AMV транскриптази (Promega, США).

Виділення геномної ДНК з клітин кісткового мозку проводили стандартним фенольним методом [8], який полягає в денатурації та екстракції білків органічними розчинниками (фенол, хлороформ) та переході ДНК у водний розчин. Із водних розчинів ДНК осаджується додаванням етанолу чи пропанолу. Денатурацію дволанцюгової ДНК проводили при температурі 92–95°C. Ампліфікацію ДНК проводили в пробірках із реакційною сумішшю, яка

містила 3 мкл ДНК, 1 мкМ відповідного праймеру, 15 мкл розчинника. Для синтезу нового ланцюга ДНК використовували термостабільну ДНК-полімеразу в стандартному Taq-буфері (виробник New England Biolabs Inc.) при температурі 72°C. Потім реакційну суміш охолоджували при 4°C, перемішували й додавали 10 мкл реакційної суміші для зворотної транскрипції, яка містила 4 мкл 5-кратного буфера для 1-ї нитки ДНК, 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл суміші праймерів (концентрація 200 мМ), 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів dNTP) у концентрації 10 мМ, 1 мкл обратної транскриптази вірусу лейкозу мишей. Далі реакційну суміш нагрівали при 37°C 90 хв, потім при 70°C протягом 15 хв та охолоджували при 4°C. У результаті реакції ЗТ отримали кДНК, яку в подальшому використовували для ПЛР. У ПЛР використовували олігонуклеотид-праймер для *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML*. Продукти ампліфікації візуалізували за допомогою методу горизонтального електрофорезу в 2 %-ому агарозному гелі. Для визначення кількості продуктів ампліфікації використовували програму TotalLab 120.

Статистична обробка результатів

Для аналізу застосовано програму статистики «Statistica for Windows 8.0» (Statsoft, USA). Функція 7-місячного безподійного виживання – event-free survival (EFS), безрецидивного виживання – disease-free survival (DFS) та загального кумулятивного виживання – overall survival (OS) з першого діагнозу до смерті з будь-якої причини розрахована методом Каплан-Майєра. Порівняння виживання в різні терміни між групами – за допомогою F-критерію Кокса (Cox's-F-test). Розподіл кількісних показників усередині групи описували як медіану: (мінімум-максимум), [нижній-верхній квантилі] у випадку негаусівського розподілу або $M \pm m$ за умови нормальності розподілу (перевірка на нормальність за допомогою критерію Шапіро-Вілкса).

Порівняння параметричних показників за умови нормальності розподілу виконували за допомогою парного й непарного t-критерію, при негаусівському розподілі – за допомогою критеріїв Манн-Вітні і Вілкоксона.

При кількості груп більш ніж 2 проводили апостеріорний аналіз за

допомогою критерію Тьюкі для груп, різних за обсягом (критерію Сльотволл-Столайна). Для визначення зв'язку між якісними характеристиками застосовували критерій χ^2 Пірсона (точний критерій Фішера у випадку таблиць 2x2). Для з'ясування корелятивних зв'язків між параметричними показниками визначали кореляцію (r-критерій Пірсона), для рангових характеристик – рангову кореляцію (критерій τ Кендалла).

РОЗДІЛ 3 ЗАГАЛЬНА ІМУНОФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА БЛАСТНИХ КЛІТИН

3.1 Клініко-лабораторні особливості прогнозу перебігу ГЛЛ у дітей

Першим нашим завданням було оцінити основні показники кісткового мозку та периферійної крові в обстежених дітей, хворих на ГЛЛ, що відображено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Основні показники периферійної крові та кісткового мозку у дітей, хворих на ГЛЛ, на час встановлення діагнозу

Параметри		Усі хворі 105	Дівчата n=43	Хлопці n=62
Вік (місяць, роки)	med	6 років	6 років 4 міс.	7 років 4 міс.
	min-max	12 міс. – 16 років	12 міс. – 15 років	12 міс. – 16 років
Гемоглобін (г/л)	med	89,00	87,00	89,00
	min-max	40,00–162,00	40,00–151,00	40,00–162,00
Бласти кісткового мозку (%)	med	87,40	89,2	86,85
	min-max	29,90–100,00	29,90–100,00	45,70–100,00
Лейкоцити крові (Г/л)	med	13,80	12,90	14,70
	min-max	1,40–96,80	1,50–96,80	1,40–96,00
Бласти крові (%)	med	53,0	48,00	63,00
	min-max	0,0–99,70	2,00–99,00	0,0–99,70
Бласти крові (Г/л)	med	6,55	6,14	7,09
	min-max	0,0–82,3	0,06–82,3	0,0–65,07

На час встановлення діагнозу значення гемоглобіну становило ($89,0 \pm 7,9$) г/л (коливання 40,0-162,0 г/л), серед них у дівчаток – ($87,0 \pm 8,3$) г/л (коливання 40,0-151,0 г/л), у хлопчиків – ($89,00 \pm 7,9$) г/л (коливання 40,0-162,0

г/л). Середній відсоток вмісту бластних клітин у кістковому мозку становив $(87,4 \pm 7,4) \%$ (коливання 29,9-100 %): у дівчаток $(89,2 \pm 9,2 \%)$ (коливання 29,9-100 %), у хлопчиків $(86,85 \pm 8,4) \%$ (45,7-100 %). Показник кількості лейкоцитів крові дітей з ГЛЛ становив $(13,8 \pm 2,4) \text{ Г/л}$ (коливання 1,4-96,8 Г/л), у хлопчиків $(12,9 \pm 1,8 \text{ Г/л})$ (коливання 1,5-96,8 Г/л) і у дівчаток $(14,7 \pm 2,1) \text{ Г/л}$ (коливання 1,4-96,0 Г/л). Відносний вміст бластних клітин у периферійній крові становив $(53,0 \pm 7,4) \%$ (коливання 0,1-99,7 %), у дівчаток – $(48,0 \pm 5,6) \%$ (коливання 2,0–99,0 %), а у хлопчиків – $(63,0 \pm 8,1) \%$ (0,2-99,7 %). Загальна кількість бластних клітин у периферичній крові дорівнювала $(6,55 \pm 0,8) \text{ Г/л}$ (коливання 0,1-82,3 Г/л): у дівчаток – $6,14 \pm 0,4 \text{ Г/л}$ (коливання 0,1-82,3 Г/л), у хлопчиків – $(7,09 \pm 0,8) \text{ Г/л}$ (коливання 0,3-65,07 Г/л).

Таблиця 3.2

**Аналіз первинної відповіді на терапію з розподілом хворих до
терапевтичного ризику при застосуванні програми лікування ALL IC-
BFM2009**

Програма лікування	8-ий день	15-ий день	Рання смерть (до 33-го дня)	33-ій день, (бласти у мієлограмі $>5,0 \%$)*	33-ій день (бласти у мієлограмі $<5,0 \%$)*	33-ій день MDR $>0,01 \%$	ГНР	ГСП	ГВР
Відповідь на лікування	PPR	NR, MDR $\geq 10 \%$		NR	ремісія				
Всього, n=105 (%)	16 (15,24)	22 (20,95)	2 (1,9)	1 (0,97)	102 (99,03)	12 (11,65)	5 (4,77)	65 (61,90)	35 (33,33)

Примітка. *Не враховано 2 померлих дітей до 33-го дня індукційної терапії

Добру відповідь на ініціальну терапію преднізолоном (prednisolon good response (PGR), коли абсолютна кількість бластів на восьмий день протоколу I становила менше 1,0 Г/л, простежили в більшості хворих – 89 (84,76 %) осіб. У

16 (15,24 %) дітей число бластів у периферійній крові становило більше 1,0 Г/л (prednisolon poor response (PPR) (табл. 3.2).

Зазначимо, що первинна відповідь на ініціальну терапію PRED не залежить від статі хворої дитини ($p > 0,05$).

У нашому дослідженні встановлено, що показник EFS був вищим у дітей із поганою відповіддю на преднізолонову префазу (EFS 79,5 %) порівняно з особами, абсолютна кількість бластів у яких на 8-й день лікування становила $< 1,0$ Г/л (EFS 71,6 %) ($p = 0,50839$). Частота досягнення кістково-мозкової ремісії на 33-й день є досить високою (98,04 %). Не відповідали на індукційну терапію 2 (1,96 %). У 2 (1,90 %) пацієнтів зареєстровано ранню смерть від септичних ускладнень під час індукційної терапії.

Частка EFS за весь період спостереження становить $(78,7 \pm 0,05)$ % (рис. 3.1).

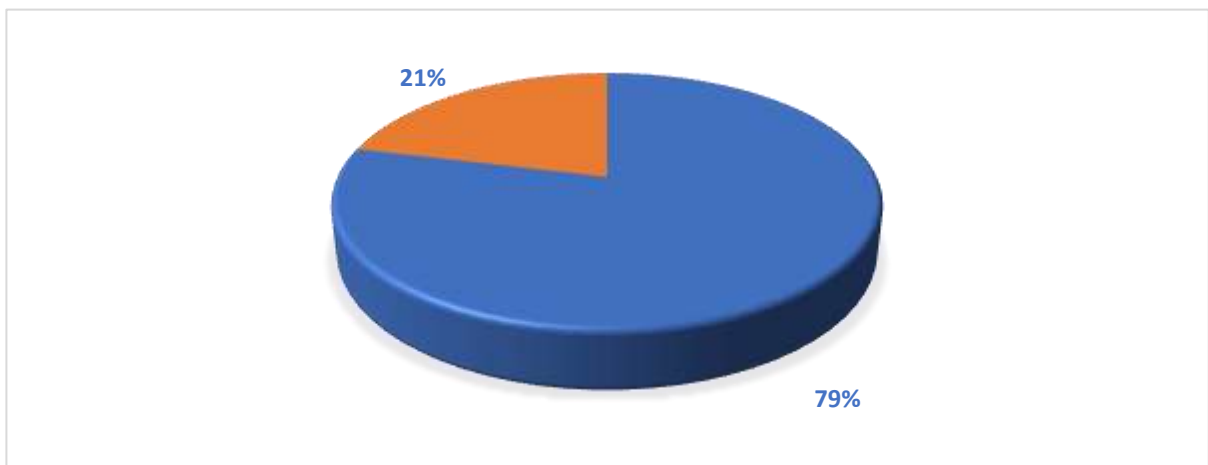


Рис 3.1 Частка EFS за весь період спостереження

Що стосується окремих показників кісткового мозку та периферійної крові первинної відповіді на індукційне лікування у дітей, хворих на ГЛЛ, на час встановлення діагнозу, то Мед показника лейкоцитів периферичної крові на 8-й день становила 4,60 Г/л (коливання 0,02-103,00 Г/л), серед них у дівчаток – 5,20 Г/л (коливання 0,38-26,50 Г/л), а у хлопчиків – 4,5 Г/л (коливання 0,20–103,00 Г/л); на 8-й день лікування Мед параметра бластних клітин у периферичній крові становила 0,058 Г/л (коливання 0,0-4,11 Г/л): у

дівчаток – Med 0,05 Г/л (коливання 0,00-2,77 Г/л), у хлопчиків – Med 0,06 Г/л (коливання 0,00-4,11 Г/л); Med відсоткового вмісту бластних клітин у периферичній крові на 8-й день становила 1,00 % (коливання 0,00-97,00 %), де у дівчаток – 1,00 % (коливання 0,00-80,00 %), у хлопчиків – 1,00 % (коливання 0,00–0,97 %) (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Окремі показники кісткового мозку та периферійної крові первинної відповіді на індукційне лікування у дітей, хворих на ГЛЛ, на час встановлення діагнозу

Параметри		Усі хворі n=105	Дівчата n=43	Хлопці n=62
Лейкоцити крові на 8-ий день, Г/л	med	4,60	5,20	4,50
	min-max	0,02–103,00	0,38–26,50	0,20–103,00
Бласти крові на 8-ий день, Г/л	med	0,058	0,05	0,06
	min-max	0,0–4,11	0,0–2,77	0,0–4,11
Бласти крові на 8-ий день, %	med	1,00	1,00	1,00
	min-max	0,0–97,00	0,0–80,00	0,0–97,00
Лейкоцити крові 15-ий день, Г/л	med	2,40	2,30	2,40
	min-max	0,60–26,50	0,70–26,50	0,60–9,50
Бласти кісткового мозку 15-ий день, %	med	4,40	4,00	0,00
	min-max	0,0–95,00	0,30–44,40	0,00–33,00
MRD на 15-ий день, %	med	2,5	2,70	2,50
	min-max	0,01–52,9	0,01–52,90	0,01–46,00
Лейкоцити крові на 33-ий день, Г/л	med	2,50	2,8	0,04
	min-max	0,0–17,30	0,0–17,30	8,10–1,97
Бласти кісткового	med	1,70	1,30	1,95

Параметри		Усі хворі n=105	Дівчата n=43	Хлопці n=62
мозку 33-ій день, %	min-max	0,0–6,70	0,0–5,40	0,0–6,70
MRD на 33-ій день, %	med	0,00	0,00	0,00
	min-max	0,0–11,00	0,0–3,50	0,0–11,00

На 15-й день основні показники кісткового мозку та периферійної крові первинної відповіді на індукційне лікування в дітей, хворих на ГЛЛ, мали показники: мед лейкоцитів крові – 2,40 Г/л (коливання 0,60-26,50 Г/л), серед них у дівчаток – 2,30 Г/л (коливання 0,70-26,5 Г/л), у хлопчиків становила 2,40 Г/л (коливання 0,60-9,50 Г/л); бласти кісткового мозку – med 4,40 % (коливання 0,0-95,00 %), при цьому в дівчаток – 4,00 % (коливання 0,3-44,40 %), у хлопчиків – 2,40 % (коливання 0,60-9,50 %); MRD – med 2,5 % (коливання 0,01-52,9 %), у дівчаток 2,7 % (коливання 0,01-52,9 %), у хлопчиків 2,5 % (коливання 0,01-46,00 %).

Показники кісткового мозку та периферійної крові дітей, хворих на ГЛЛ, на 33-й день лікування мали наступні показники: med показника лейкоцитів крові становила 2,50 % (0,00-17,30 %), де у дівчат med відповідала значенню 2,8 % (коливання 0,0-17,30 %), а у хлопчиків – 0,04 % (коливання 8,10-1,97 %). Мед рівня бластів кісткового мозку складала 1,70 % (коливання 0,0-6,70 %), серед них у дівчат – 1,30 % (коливання 0,0-5,40 %), у хлопчиків – med 1,95 % (коливання 0,0-6,7 %); MRD на 33-1 день лікування становила: med 0 % (коливання 0,0-11,00 %), у тому числі у дівчаток 0 (коливання 0,0–3,50) та у хлопчиків також 0 (коливання 0,0-11,00 %).

Щодо клініко-лабораторних особливостей прогнозу ГЛЛ у дітей, то події були в 17,14 % (n=18), лікування без подій – у 82,86 % (n=87). Розподіл за статтю виглядав наступним чином (p=0,61): серед хлопчиків зафіксовано у 17,74 % (n=11), без подій – 82,26 % (n=51), EFS – 82,2 %; серед дівчаток події були у 16,28 % (n=7), без подій – у 83,72 % (n=36), EFS – 84,1 % (табл.3.4).

Таблиця 3.4

Клініко-лабораторні особливості прогнозу перебігу ГЛЛ у дітей

Клінічні параметри (n=105)		К-ть хворих, n (%)	Подія n =18 (17,14 %)	Без події n = 87 (82,86 %)	EFS, %	p*
Стать	Хлопці	62	11 (17,74)	51 (82,26)	82,2	0,6100
	Дівчата	43	7 (16,28)	36 (83,72)	84,1	
Група ризику	ГНР	5	0	5 (100)	100	0,001
	ГСР	65	6 (9,23)	59 (90,77)	89,2**	
	ГВР	35	12 (34,29)	23 (65,71)	52,7	
Вік, місяці	≥ 12 < 72	48	9 (18,75)	39 (81,25)	77,9	0,8900
	≥ 72 < 144	42	7 (16,67)	35 (83,33)	73,1	
	≥ 144	15	2 (13,33)	13 (86,67)	85,2	
Варіант ГЛЛ	Про ВІ	8	2 (25,00)	6 (75,00)	50,0	0,94896
	Connon ВІІ	75	11 (14,67)	64 (85,33)	79,4	
	Пре ВІІІ	6	2 (33,33)	4 (66,67)	66,7	
	T	16	3 (18,75)	13 (81,25)	81,3	
Варіант ГЛЛ, залежно від коекспресій маркерів	ГЛЛ без коекспресій	78	14 (17,95)	64 (82,05)	79,4	0,2700
	ГЛЛ+CD13+	15	1 (6,67)	14 (93,33)	90,0***	
	ГЛЛ+CD33+	2	1 (50,0)	1 (50,0)	50,0	
	ГЛЛ+CD13+CD33+	4	1 (25,0)	3 (75,0)	0,0****	
	В+Т ГЛЛ	6	1 (16,67)	5 (83,33)	81,8	0,88915
	В чисті	64	11 (17,18)	53 (82,81)	79,6	
	В+Му	19	3 (15,78)	16 (84,22)	61,5	
	В+Т	6	1 (16,67)	5 (83,33)	81,8	
	Т/Т+Му	16	3 (18,72)	13 (81,25)	81,3	

Клінічні параметри (n=105)		К-ть хворих, n (%)	Подія n =18 (17,14 %)	Без події n = 87 (82,86 %)	EFS, %	p*
Бласти, Г/л, до лікування	< 10,0	40	8 (20,0)	32 (80,0)	70,2	0,26312
	≥ 10,0	65	10 (15,38)	55 (84,62)	73,8	
Бласти к/мозку, %, до лікування	< 90,0	55	10 (18,18)	45 (81,82)	69,4	0,69272
	≥ 90 < 100,0	41	7 (17,07)	34 (82,93)	75,9	
	100,0	9	1 (11,11)	8 (88,89)	71,4	
Лейкоцити, Г/л, до лікування	< 4,0	24	3 (12,50)	21 (87,50)	72,9	0,58387
	≥ 4,0 < 10,0	17	4 (2,53)	13 (76,47)	67,9	
	≥ 10,0 < 50,0	56	9 (16,07)	47 (82,93)	80,8	
	≥ 50,0	8	2 (25,00)	6 (75,00)	49,1	
Лейкоцити, Г/л, 8-й день лікування (n=)*****	< 10,0	88	17 (19,32)	71 (81,68)	72,1	0,08907
	≥ 10,0	17	1 (5,88)	16 (94,12)	50,0	
Бласти, Г/л, 8-й день лікування	< 1,0	89	15 (16,85)	74 (83,15)	71,6	0,50839
	≥ 1,0	16	3 (18,75)	13 (81,25)	79,5	
Лейкоцити, Г/л, на 15-ий день	< 1,5	29	6 (20,69)	23 (79,31)	65,4	0,66140
	≥ 1,5	76	12 (15,79)	64 (84,21)	76,1	
Бласти кісткового мозку, %, на 15-ий день	< 10,0	88	8 (9,09)	80 (90,90)	87,6	0,00002
	≥ 10,0	17	10 (58,82)	7 (41,18)	15,0	
MRD у кістковому мозку, %, на 15-ий день	< 10,0	82	10 (12,05)	72 (87,80)	84,5	0,01076
	≥ 10,0	23	8 (36,36)	15 (65,22)	53,3	
Бласти кісткового мозку, %, на 33-ій день*****	< 5,0	100	14 (14,00)	86 (86,00)	74,4	0,02327
	≥ 5,0	2	2 (66,67)	1 (33,33)	33,3	
MRD у кістковому мозку, %, на 33-ій день*****	< 0,01	91	8 (8,79)	83 (91,21)	86,3	0,00000

Щодо груп ризику ($p=0,001$), то до ГНР увійшло 5 осіб, де не зафіксовано подій та EFS становило 100 %; ГСР - $n=65$, серед яких 9,23 % мали події ($n=6$) та без подій – 90,77 % ($n=59$), EFS – 89,2 %, враховуючи те, що $p=0,00137$ достовірно, порівняно з групою високого ризику (ГВР); до ГВР увійшло 35 осіб, де події були в 34,29 % ($n=12$), без подій – 65,71 % ($n=23$), EFS – 52,7 %. За віком картина була наступна ($p=0,89$): у категорії 12–72 місяці ($n=48$) події були у 18,75 % ($n=9$), без подій – 81,25 % ($n=39$), EFS – 77,9 %; у групі 72–144 місяці ($n=42$) події зафіксовано в 16,67 % ($n=7$), без подій 83,33 % ($n=35$), EFS – 73,1 %; в осіб більше 144 місяців ($n=15$): в 13,33 % ($n=2$) зафіксовано події, 86,6 % ($n=13$) без подій при EFS 85,2 %. Враховуючи варіанти ГЛЛ ($p=0,94896$), то у групі Про ВІ ($n=8$) частка подій становила 25,0 % ($n=2$), без подій – 75,0 % ($n=6$), EFS=50 %; у Connon ВІІ ($n=75$): події були в 14,67 % ($n=11$), без подій – 85,33 % ($n=64$), EFS – 79,4 %; у Пре ВІІ ($n=6$) у 33,33 % ($n=2$) були події, без подій – 66,7 % ($n=4$), EFS – 66,7 %; у групі варіанта Т ($n=16$), події були у 18,75 % ($n=3$), без подій – 81,25 %.

Отже, результати проведених досліджень показали, що у дітей з ГЛЛ, до проведення курсу хіміотерапії, у тканині КМ виявлено $46 \pm 4,5$ % бластних клітин. Не виключено, що бластні клітини в КМ містять генетичний дефект, що призводить до порушення клітинного поділу й диференціювання. Такі бластні клітини (анаплазовані бласти) не перетворюються в зрілі функціональні клітини, а інтенсивно проліферують, утворюючи нащадків із тим самим генетичним дефектом. Накопичення бластних клітин у КМ заважає нормальному кровотворенню, що обумовлює клінічні прояви лейкемії у дітей. Серед яких найчастішими були: синдром інтоксикації – найбільш ранній прояв захворювання та, зазвичай, є маніфестним. Він характеризувався слабкістю, млявістю, гіподинамією, астенизацією, підвищенням температури тіла від субфебрильної до високої, можлива тривала температурна реакція, пітливість, анорексія без значної втрати маси тіла. Анемічний синдром включав наростаючу блідість при погіршенні загального стану, запаморочення й

головний біль, пониження зору, тахікардію, задишку. Геморагічний синдром був обумовлений переважно тромбоцитопенією, підвищенням проникності та зниженням резистентності стінки судин, рідше порушенням коагуляційних властивостей крові з дефіцитом V, VII факторів згортання, протромбіну, фібриногену, підвищенням фібринолітичної та антикоагулянтної активності крові. При обстеженні хворого відзначалось поліморфні геморагії (від петехійних до крововиливів різних розмірів) на шкірі й у підшкірно-жировій клітковині будь-якої локалізації, а також у слизовій рота, субкон'юнктивально, синці над кістковими виступами й на місці ін'єкцій, кровотечі зі слизових оболонок (носові, ясенні, шлунково-кишкові, ниркові, маткові). Крововиливи в сітківку ока та головний мозок при обстеженні дітей не спостерігалися.

Гіперпластичний синдром обумовлений лейкемічною інфільтрацією тканин. Одним із типових симптомів ГЛЛ у дітей було безболісне збільшення периферійних лімфатичних вузлів, найчастіше – шийних, пахвових, пахових. Водночас лімфатичні вузли щільноеластичної консистенції при пальпації неболючі, не спаяні з навколишньою клітковиною, рухливі, шкіра над ними не змінена. В поодиноких випадках спостерігалось значне збільшення лімфовузлів середостіння аж до здавлення верхньої порожнистої вени (задишка, ціаноз, одутість обличчя, пастозність повік, вибухання шийних вен). За аналізу гендерних особливостей перебігу ГЛЛ, у кількох хлопчиків виявлялось збільшення яєчок (5 %) у вигляді безболісних, щільних, одно або двосторонніх інфільтратів. Наявність цих симптомів у початковому періоді гострої лейкемії вважають поганою прогностичною ознакою. Також при ГЛЛ відзначалось безболісне збільшення периферійних лімфатичних вузлів, найчастіше потиличних, шийних, надключичних і пахвових. Кістково-суглобовий синдром обумовлений лейкемічною інфільтрацією периосту та кісткової тканини, порушенням мінерального обмін. Виявлявся біль у кістках і / або суглобах, що посилювався вночі. У результаті структурних порушень ймовірно сплюснення тіл хребців. Можливе залучення до процесу центральної нервової системи (ЦНС), статевих органів, очей та легенів. Ураження ЦНС у вигляді

менінгеальної форми, менінго-енцефалічної, енцефалічної, мієлітичної, за типом полірадикулоневриту, епідуриту, дієнцефального синдрому у нашому випадку не спостерігалось. При ураженні очей визначалась проліферація лейкемічних клітин у ділянці судинної оболонки, сітківки, соска зорового нерва, передньої камери ока та склоподібного тіла.

Застосування цитостатичної хіміотерапії досить ефективно, бо продемонструвало цитолітичну дію стосовно бластних клітин КМ, що відображалось позитивною динамікою щодо клінічної симптоматики у дітей групи дослідження.

3.2 Характеристика бластних клітин при рецидиві

Застосування ALLIC-BFM 2009 терапії показало її ефективність у 88 % дітей, що призводило до повної ремісії. Приблизно у 12 % дітей виявлена часткова резистентність до хіміопрепаратів, що проявлялося рецидивом захворювання (рис. 3.2).

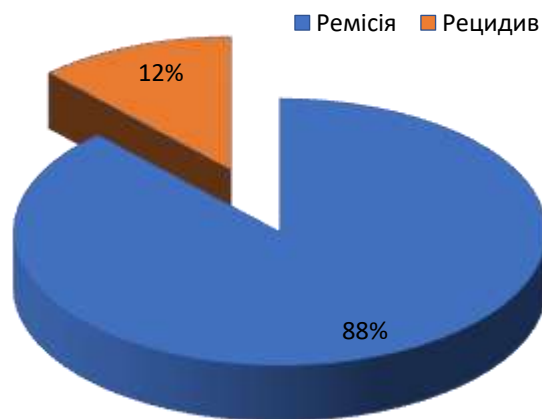


Рис. 3.2 Розподіл хворих дітей із ГЛЛ за частотою появи рецидивів

Аналізуючи виживання на основі кривих Каплан–Майєра (як подію взято факт смерті хворого від основного захворювання) встановлено, що безрецидивне виживання в загальній вибірці дітей складає 85 % впродовж 6,6

років (80 міс.) спостереження, тоді як безподійне виживання становило 78,7 % (рис. 3.3).

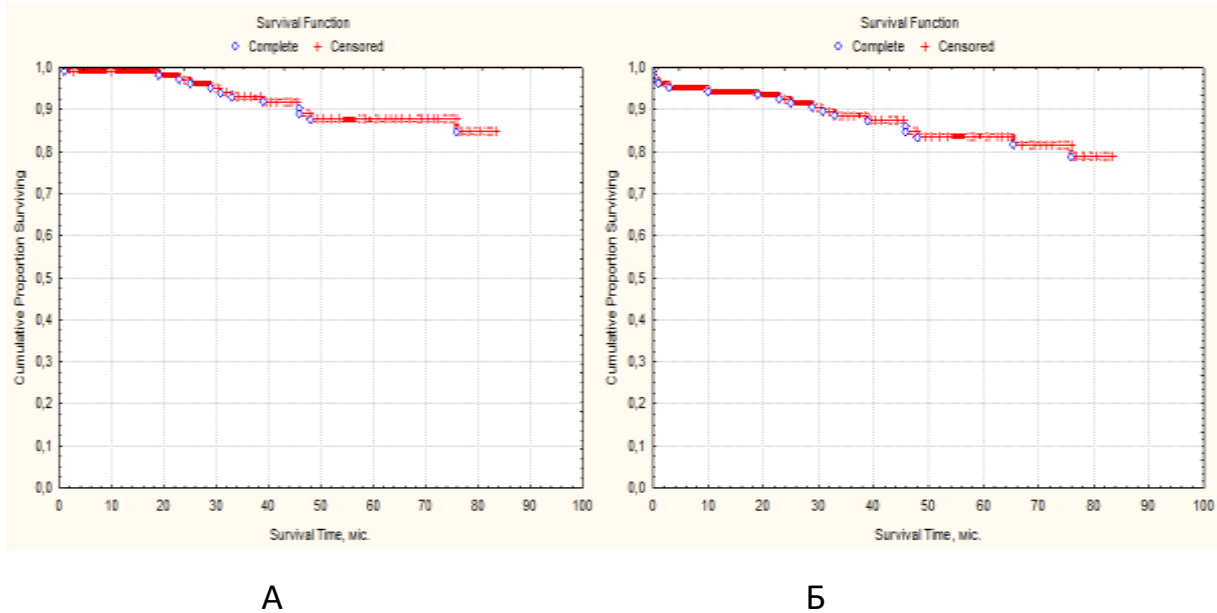


Рис. 3.3 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного виживання (Б) у загальній вибірці дітей, хворих на ГЛЛ

Дослідження виживання дітей із ГЛЛ залежно від статі показало, що безрецидивне виживання в період від 47 до 75 міс. становить 90 % – для хлопчиків та 84 % – для дівчаток. Після 75 міс. безрецидивне виживання перебуває на рівні 84 % та не залежить від статі. Безподійне виживання до 40 міс. вище для дівчаток, після чого вирівнюється та не залежить від статі (рис. 3.4).

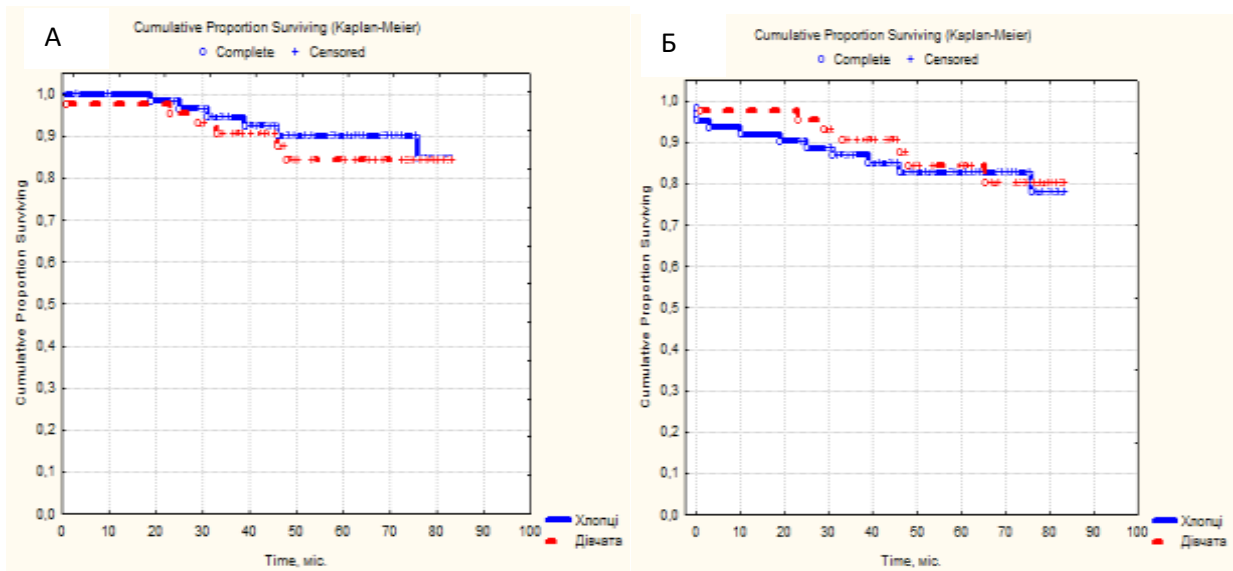


Рис. 3.4 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного виживання (Б) хворих на ГЛЛ залежно від статі

Аналіз безрецидивного виживання дітей із ГЛЛ залежно від віку показав, що найвище виживання хворих спостерігаємо в дітей віком старше 12 років (144 міс.), у яких виживання до 46 міс. було на рівні 100 %, а потім – 90 %.

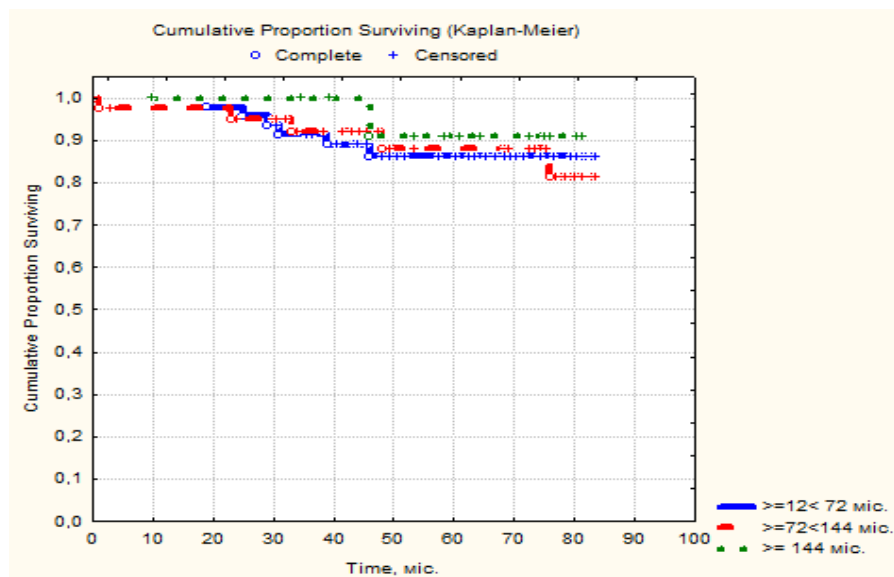


Рис. 3.5 Крива Каплан–Майєра безрецидивного виживання хворих на ГЛЛ залежно від віку

У дітей віком від 1 до 6 років (12-72 міс.) безрецидивне виживання становило 87 %, починаючи з 47 міс. після проведення курсу хіміотерапії (рис. 3.5).

Отже, у дітей із ГЛЛ безрецидивне виживання знаходиться на вищому рівні, ніж значення безподійного виживання в загальній вибірці дітей. Безрецидивне виживання вище у хлопчиків у період до 75 міс. спостереження. У пізніші терміни значення цього показника не залежить від статі. Щодо віку пацієнтів, то найвищий відсоток виживання спостерігаємо в дітей віком 12 років і вище, що необхідно враховувати під час проведення курсу цитостатичної хіміотерапії. Високий відсоток безрецидивного виживання може свідчити про тривалу та повну ремісію в пацієнтів.

Наступним етапом було дослідження кількості бластних клітин. Бластні клітини – це незрілі клітини, які під час дозрівання перетворюються у функціональні клітини крові [63], тому підвищений їхній рівень у КМ після проведення курсу хіміотерапії вказує на порушення процесів кровотворення – бластні клітини не дозрівають у функціонально-активні клітини крові [64].

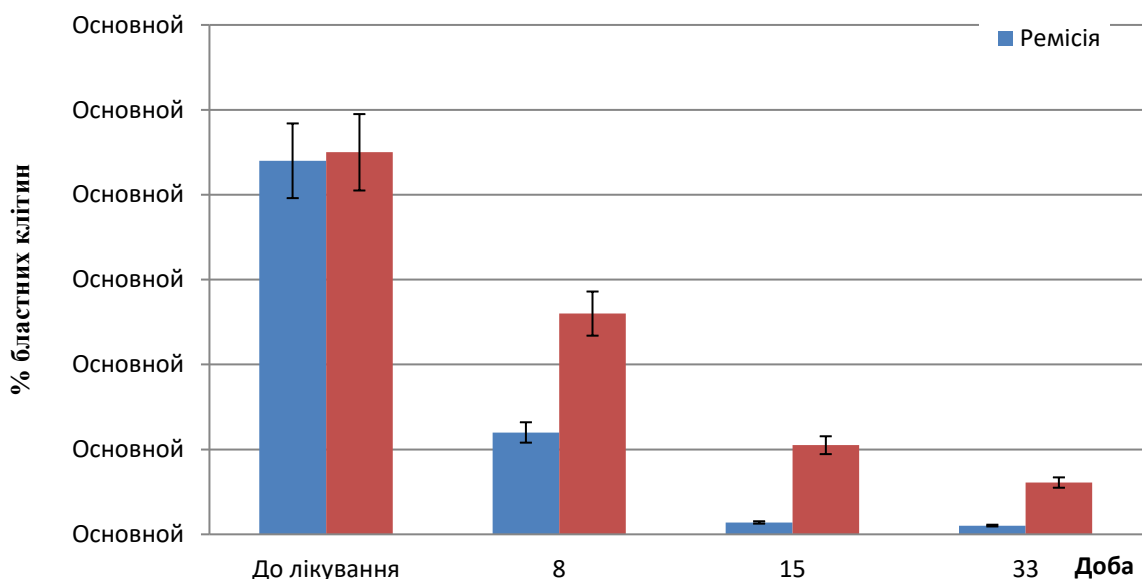


Рис. 3.6 Рівень бластних клітин у кістковому мозку дітей із ГЛЛ при застосуванні ALLIC-BFM 2009 терапії

Аналіз зміни кількості бластів у пунктаті КМ у пацієнтів із ремісією показав, що в процесі проведення першого курсу хіміотерапії виявлено різке зниження кількості бластів (рис. 3.6).

Так, уже на 8-й день хіміотерапії кількість бластів знижувалася у 2,2 рази порівняно з групою пацієнтів, у яких спостерігався рецидив захворювання. Після закінчення курсу цитостатичної терапії рівень бластів у КМ за умови повної ремісії становив $1,03 \pm 0,212 \%$, що свідчить про сприятливий перебіг захворювання та задовільний стан кровотворної тканини. Водночас у периферійній крові виявлено нормальне співвідношення всіх паростків кровотворення при кількості еритроцитів більше $3,5 \times 10^{12}$ клітин/л, при кількості тромбоцитів більше 160×10^9 клітин/л, при кількості лейкоцитів менше 10×10^9 клітин/л та при відсутності екстремедулярних вогнищ лейкемічного зростання.

Отже, підвищення рівня бластних клітин у КМ свідчить про рецидив захворювання, бо активна проліферація бластів відбувається в результаті порушення міжклітинної сигналізації або через здатність клітин уникати апоптичної загибелі, що і свідчить про резистентність пухлинного клону до дії цитостатиків.

У результаті досліджень виявлено взаємозв'язок між показником рівня бластних клітин у кістковому мозку та периферійній крові. Так, з огляду на коефіцієнт кореляції Пірсона встановлено високий ступінь взаємозв'язку рівня бластних клітин між кістковим мозком та кров'ю, бо коефіцієнт кореляції був рівним 0,87 ($p < 0,05$). Використовуючи регресійний аналіз, ми створили математичну модель типу $y=f(x)$. Як незалежна змінна X виступає показник кісткового мозку, а як залежна змінна Y – відповідний показник периферійної крові. Таким чином, за допомогою математичної моделі можна визначати усереднене значення показників периферійної крові на основі фактичних значень відповідних показників кісткового мозку (рис. 3.7).

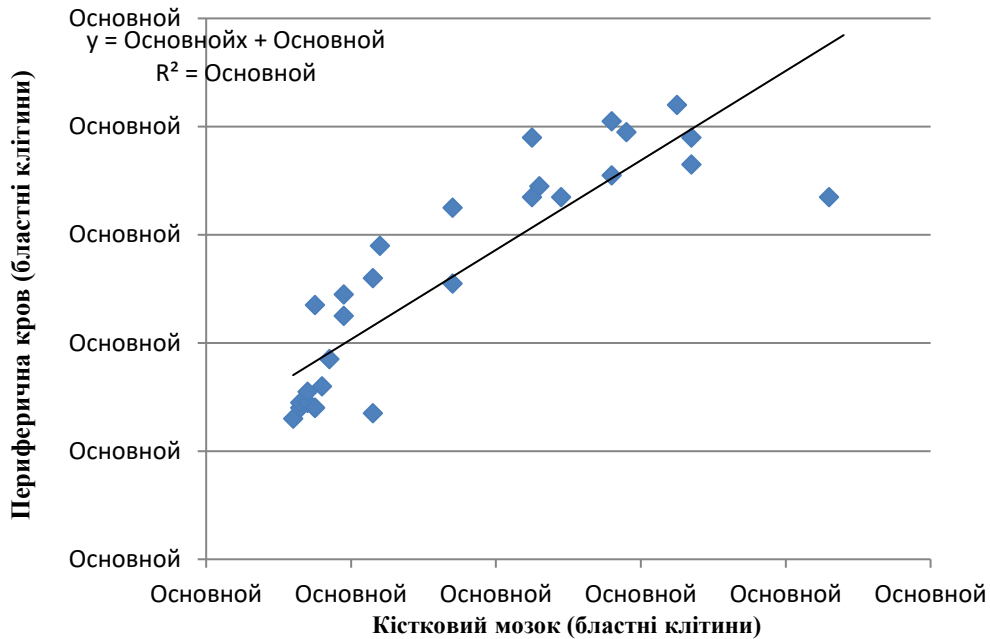


Рис. 3.7 Кореляційний взаємозв'язок між рівнем бластних клітин кісткового мозку та аналогічним показником периферійної крові

Так, для показника рівня бластних клітин математична модель мала такий вигляд: $Y=0,8271X+24,116$ (рис. 3.7). Значення коефіцієнта апроксимації $R^2=0,7641$ вказує на високий ступінь достовірності підбраної функції.

Таким чином, використання кореляційного аналізу вказує на високий ступінь взаємозв'язків між підвищенням рівня бластних клітин у периферійній крові з їхнім рівнем у кістковому мозку. Підвищена кількість бластних клітин свідчить про прогресування ГЛЛ під час набуття клітинами лейкемічного клону.

Поряд із цим рівень бластних клітин у кістковому мозку може спрогнозувати ступінь виживання пацієнтів. Так, у пацієнтів, у яких рівень бластних клітин на 15-й день лікування становив менше 10 % як безрецидивне, так і безподійне виживання спочатку перебувало на рівні 100 %, а потім знижувалося до 90 % – для безрецидивного лікування (рис. 3.7А) та до 88 % – для безподійного виживання (рис. 3.7Б). При чому, таке зниження спостерігається більше ніж через 6 років після закінчення терміну лікування.

У пацієнтів, у яких на 15-ий день лікування в кістковому мозку виявлено більше 10 % бластних клітин, уже на початковому етапі спостереження безрецидивне виживання становило 92 % (рис. 3.8А), а безподійне – 82 % (рис. 3.8Б).

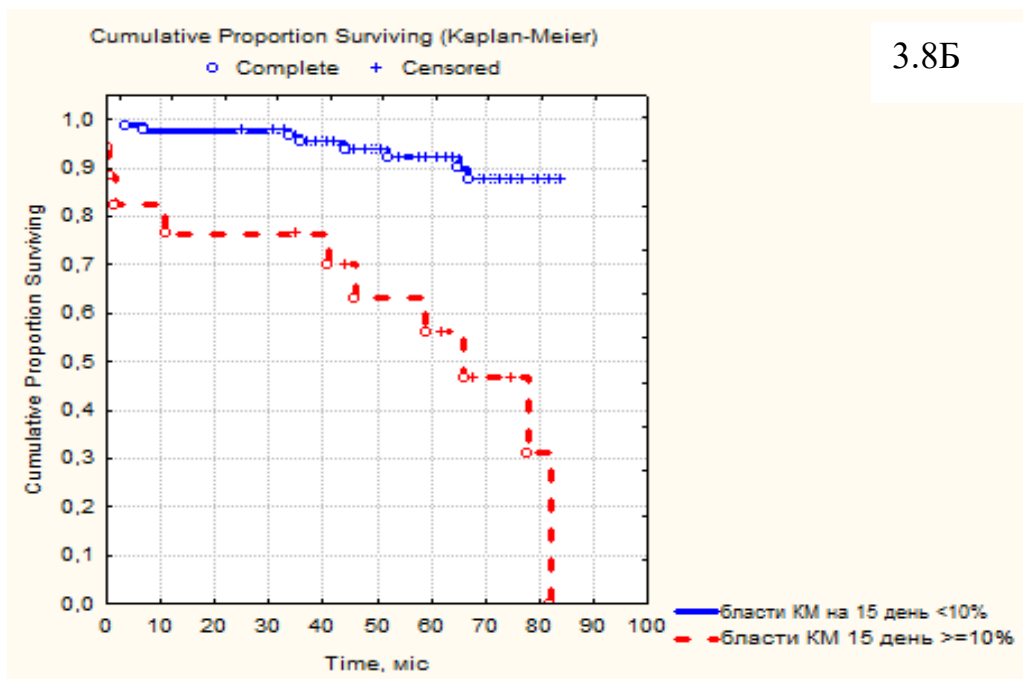
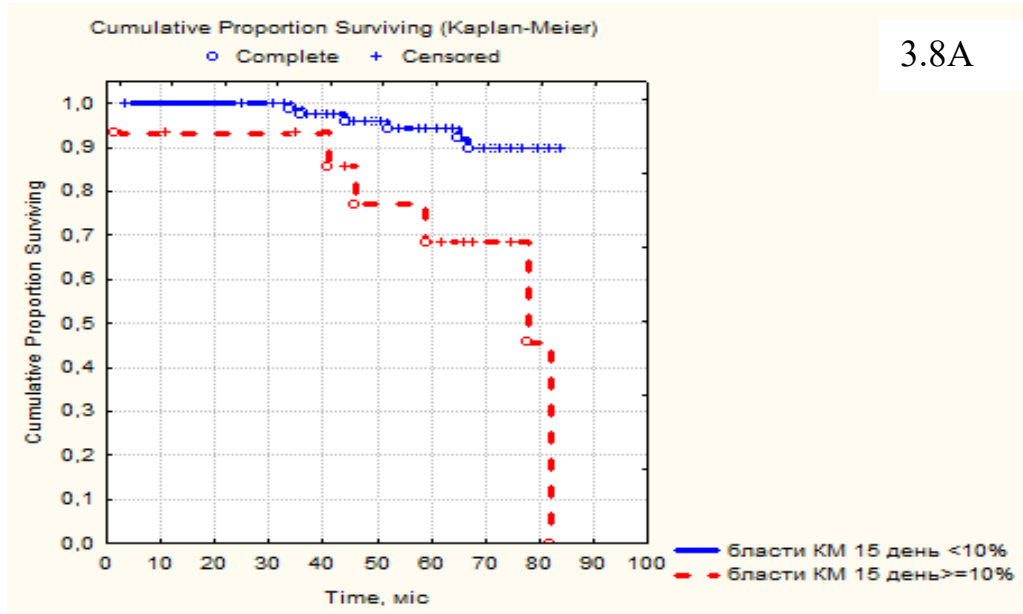


Рис. 3.8 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного (Б) виживання хворих на ГЛЛ залежно від % бластів у кістковому мозку на 15-ий день індукційної терапії

За ступенем віддалення від терміну лікування відсоток безрецидивного та безподійного виживання знижувався, а через 6 років виявлені летальні наслідки.

Якщо ж кількість бластів перебувала на рівні 5 % після 33 днів лікування, то як безрецидивне виживання, так і безподійне виживання становило 68 % протягом 5 років спостереження (рис. 3.9).

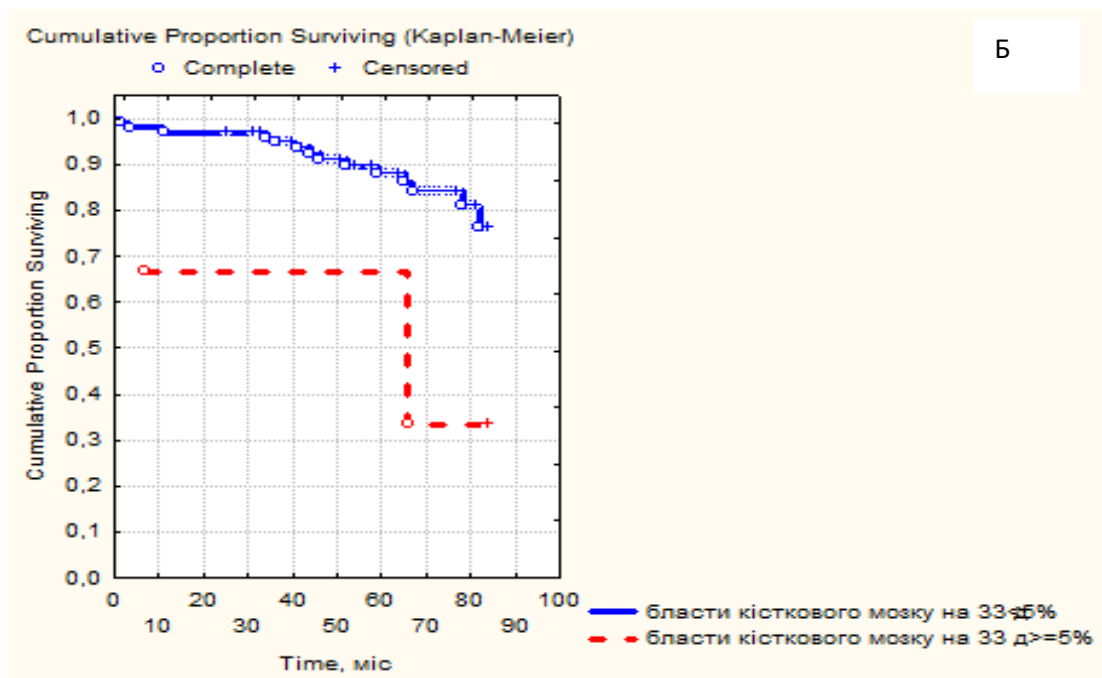
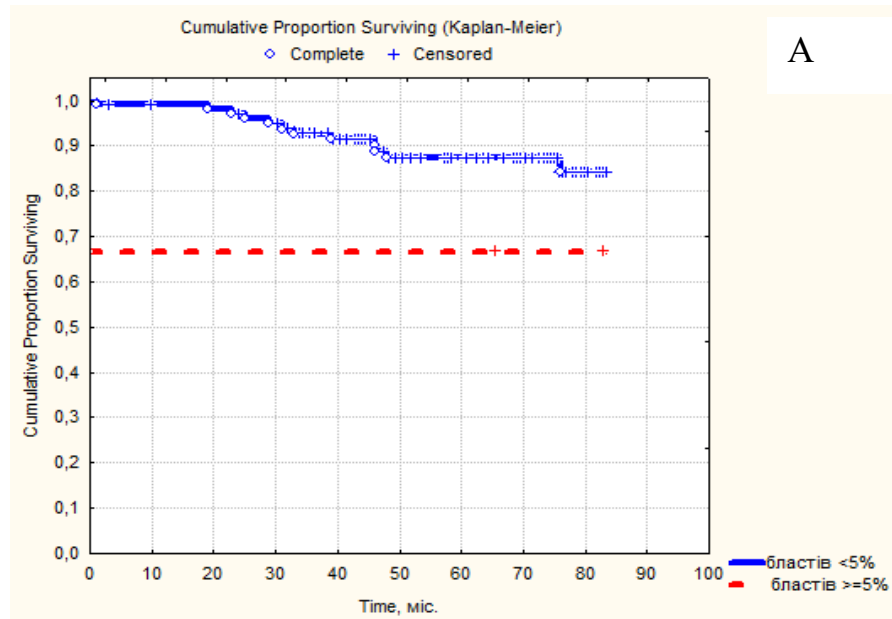


Рис. 3.9 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного (Б) виживання хворих на ГЛЛ залежно від % бластів у кістковому мозку на 33-ій день індукційної терапії

Встановлений факт вказує на важливість моніторингу бластних клітин у кістковому мозку та крові для попередження ускладнень та летальних випадків.

Одним із способів моніторингу адекватної відповіді пацієнта на лікування під час та після проведення курсу цитостатичної хіміотерапії є оцінка ступеня MRD, який проводять високоточними засобами сканування хворих або методами цитогенетичного, молекулярно біологічного та імунофенотипового аналізу [138].

Визначення MRD як незалежного критерію оцінки відповіді організму дитини на терапію у групі пацієнтів із повною ремісією показало зниження показника в динаміці проведення хіміотерапії. Мінімальний показник MRD простежували після закінчення курсу хіміотерапії (33-я доба) (рис. 3.10).

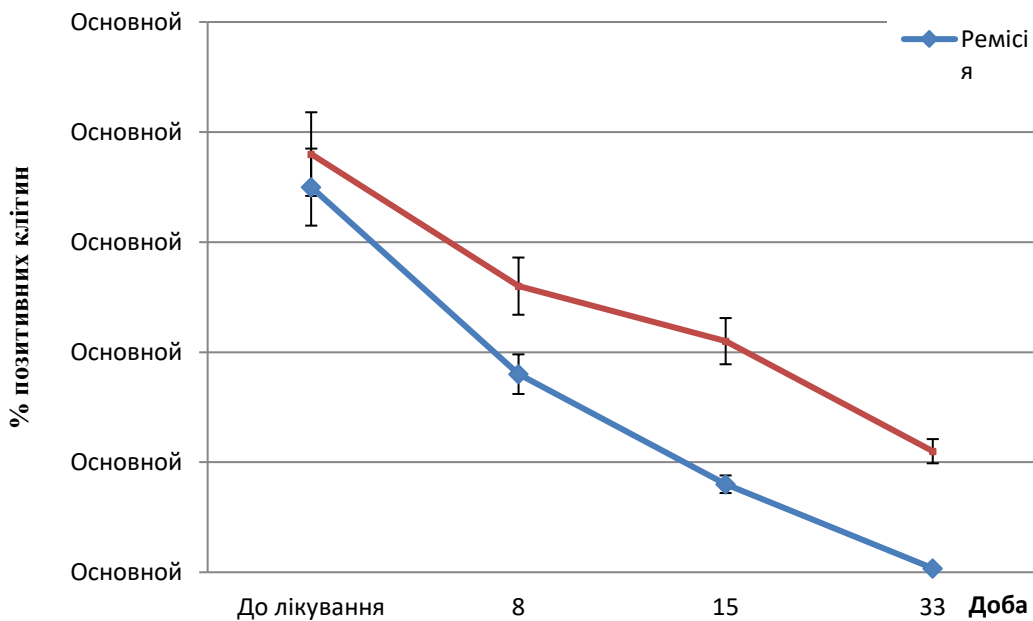


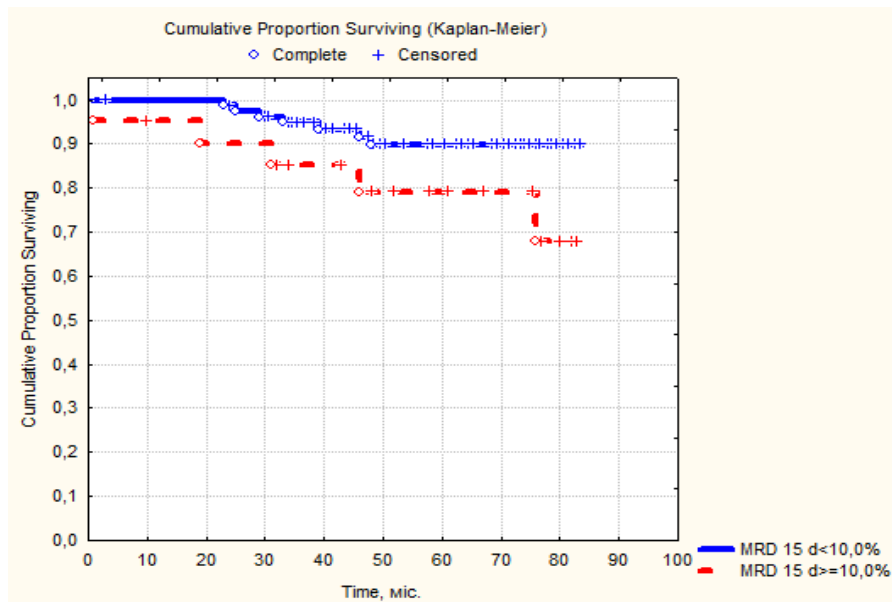
Рис. 3.10 Моніторинг MRD у дітей із ГЛЛ під час проведення цитостатичної терапії ALLIC-BFM 2009

Водночас у пацієнтів, у яких у подальшому був виявлений рецидив захворювання, зниження MRD спостерігалось, однак не досягало значень, характерних для пацієнтів із ремісією (рис. 3.10).

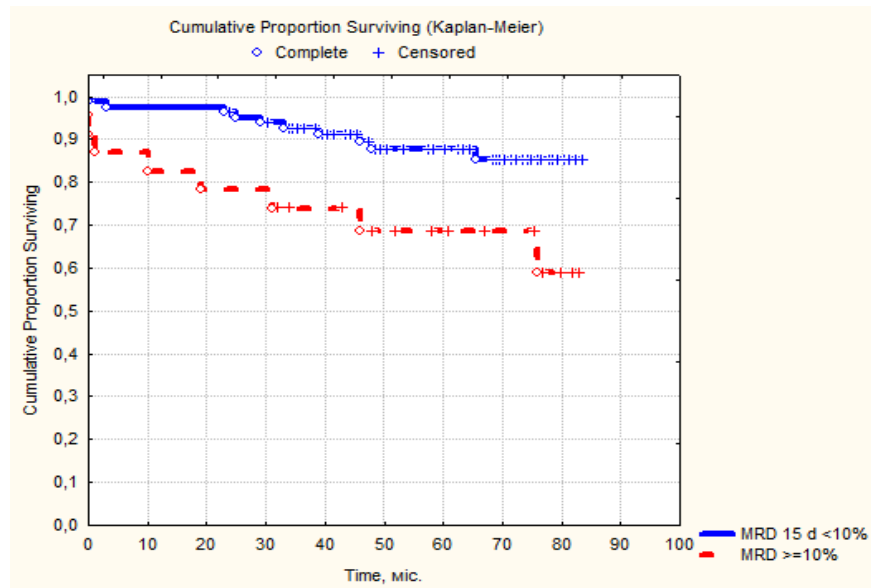
Визначення MRD полягає у виявленні залишкових лейкемічних бластів, які не розпізнаються морфологічно [125], тому підвищені його значення відразу після закінчення курсу хіміотерапії свідчать про ризик росту пухлинного клону.

Отже, як показують результати наших досліджень, ризик розвитку рецидиву вищий у тих хворих, у яких після завершення цитостатичної терапії рівень MRD складав 1 % і більше, порівняно з пацієнтами, чий рівень MRD був менше 1 % – у цієї групи пацієнтів спостерігалася повна ремісія. Залишається відкритим питання, чи залежить показник виживання пацієнтів від показника MRD.

Результати досліджень показали, що в пацієнтів із рівнем MRD менше 10 % після 15 днів лікування безрецидивне та безподійне виживання перебувало на рівні 100 % протягом двох років спостереження після проведення хіміотерапії, із наступним зниженням до 90 % та 87 % відповідно (рис. 3.11).



A



Б

Рис. 3.11 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного (Б) виживання хворих на ГЛЛ залежно від % MRD у кістковому мозку на 15-ий день індукційної терапії

У пацієнтів із рівнем MRD 10 % і вище, починаючи з 5-го року спостереження після лікування, безрецидивне виживання знижувалося до 80 %, а безподійне – до 70 %, а далі і до 68 та 59 % відповідно (рис. 3.11).

У хворих, у яких на 33-й день індукційної терапії показник MRD був на рівні 0,01 % безрецидивне та безподійне виживання не опускалося нижче 90 % (рис. 3.12).

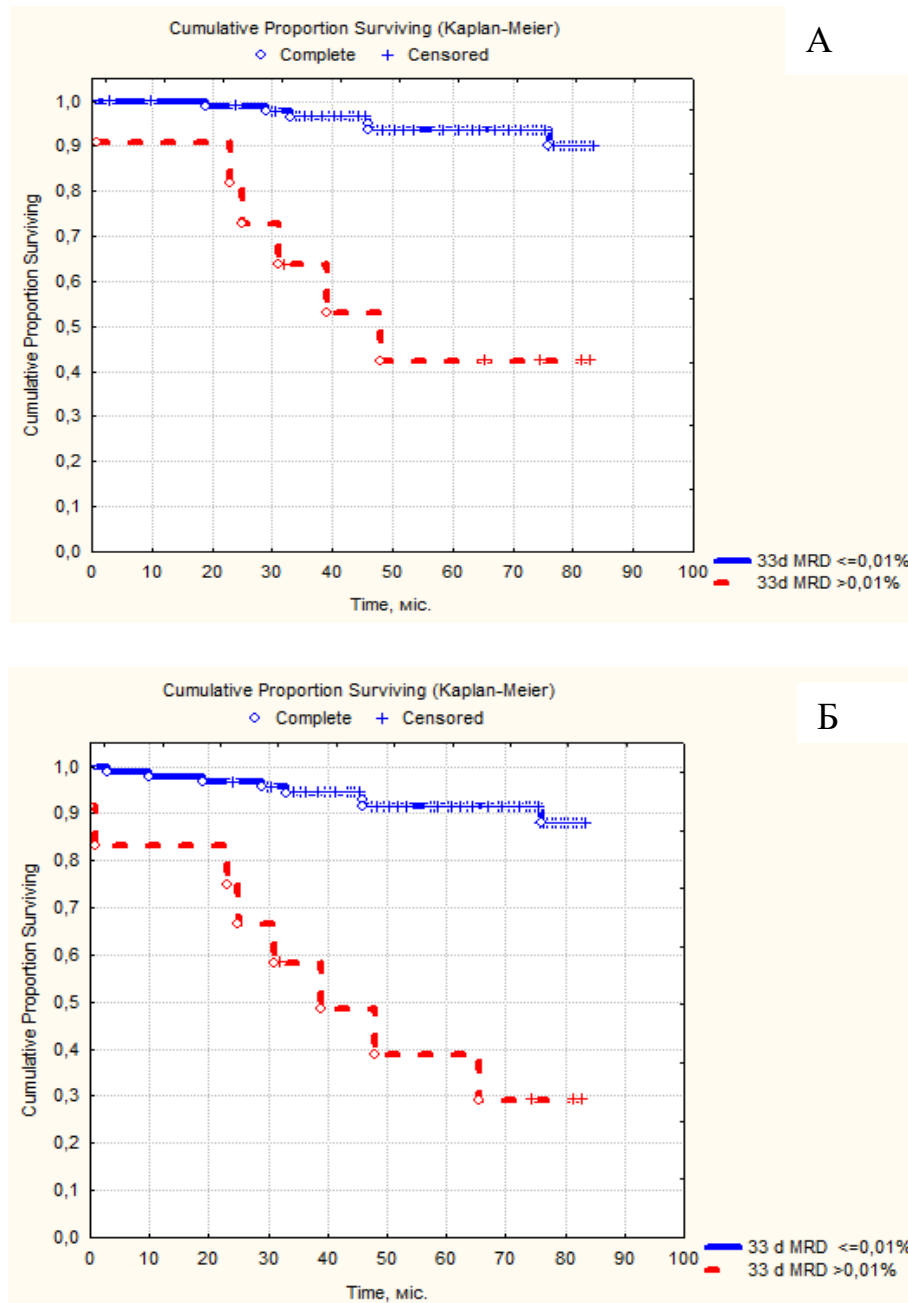


Рис. 3.12 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного (Б) виживання хворих на ГЛЛ залежно від % MRD у кістковому мозку на 33-ій день індукційної терапії

Водночас за умови MRD вище 0,01 % показник безрецидивного виживання знижується до 41 % (рис. 3.12А), а безподійного виживання – до 30 % (рис. 3.12Б).

Отже, за даними рівня бластних клітин та показником MRD у кістковому мозку та крові можна передбачити ефективність лікування та можливий

розвиток рецидивів. Однак невідомим залишається взаємозв'язок виду лейкомічного клону з частотою розвитку рецидивів.

3.3 Імуно-фенотипова класифікація ГЛЛ у дітей

В основі лабораторної діагностики гострих лейкемій лежить виявлення в периферійній крові, кістковому мозку або спинномозковій рідині бластних клітин. Морфологічний та цитохімічний опис різних типів бластів вимагає від лікаря значного досвіду та часу, проте не завжди надає можливість диференціювати бласти, що належать до різних клітинних ліній та рівнів диференціювання [93]. В основі ГЛЛ як клонального злоякісного новоутворення лежить дефект стовбурових клітин різного рівня або ураження клітин-попередників. Неопластично трансформовані клітини, що наділені здатністю до пригнічення нормального гемопоезу, поступово витісняють нормальні паростки кровотворення, а потім, у процесі лейкозної трансформації, поступово втрачають необхідність стромальної підтримки та заселяють органи, які брали участь у гемопоезі на різних стадіях онтогенезу. Подальша пухлинна прогресія призводить до того, що бласти можуть вражати практично будь-який орган.

Імунофенотипування бластних клітин за допомогою моноклональних антитіл дозволяє встановити лінійну приналежність та стадію зрілості бластних клітин. Кожному імунопідваріанту лейкемії відповідає специфічний набір антигенів.

У нашому дослідженні для імунофенотипової класифікації ГЛЛ та оцінки лінійності лімфобластів у хворих дітей враховували експресію окремих диференційних антигенів на поверхні бластних клітин.

Дослідження антигенної структури лейкомічних клітин у дітей із ГЛЛ показало, що у 90 (85,7 %) дітей діагностовано В-лінійну ГЛЛ, а у 15 (14,3 %) – Т-лінійну ГЛЛ (табл. 3.4). Серед В-лінійної ГЛЛ у 65 (61,9 %) пацієнтів виявлено тільки В-клітинні антигени, у 6 (5,7 %) В+Т-антигени, у 19 (18,1 %)

В+Му-антигени. Незалежно від виявленого типу В-клітинної ГЛЛ у переважній більшості пацієнтів спостерігалася ремісія, однак у всіх типах В-лінійної ГЛЛ були виявлені й рецидиви.

Щодо Т-клітинної ГЛЛ, то цей вид лейкемії простежували тільки у 15 (14,3 %) хворих дітей, при чому після проведення цитостатичної хіміотерапії у всіх пацієнтів із Т-лінійною ГЛЛ виявлена ремісія (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Розподіл хворих дітей із ГЛЛ за типом бластних клітин

Вид лейкемії	Кількість випадків до лікування, %	Кількість випадків після лікування, %	
		Рецидив	Ремісія
В-клітинна ГЛЛ	90 (85,7)	12 (11,4)	78 (74,3)
Тільки В-клітинні антигени	65 (61,9)	8 (7,6)	57 (54,3)
В+Т-антигени	6 (5,7)	1 (0,95)	5 (4,7)
В+Му-антигени	19 (18,1)	3 (2,9)	16 (15,2)
Т-клітинна ГЛЛ	15 (14,3)	0	15 (14,3)
Т+Му-антигени	15 (14,3)	0	15 (14,3)

Із проаналізованих результатів видно, що під час вибору тактики лікування та прогнозу хвороби виділення морфологічних типів лімфобластів суттєвої ролі не відіграє. Однак імунофенотипування бластних клітин після проведення курсу хіміотерапії ALLIC-BFM 2009 може мати важливе значення для виявлення ранніх рецидивів захворювання.

Прогнозувати успіх подальшої терапії після рецидиву можемо за допомогою трьох показників: 1 – тривалості першої ремісії, 2 – локалізації

вогнища ремісії (медулярного або екстрамедулярного), 3 – за допомогою визначення імунофенотипу [76]. У результаті комплексного застосування цих трьох показників виділяють групу високого, проміжного й стандартного ризику неуспішності стандартної схеми терапії після рецидиву. Було визначено, що пацієнтів із цитогенетично високим ризиком неуспішності терапії мають лікувати згідно з інтенсифікованим протоколом як до, так і після рецидиву, незважаючи на клінічно визначену прогностичну групу [69]. Діти з клінічно стандартним або проміжним ризиком і цитогенетично низьким ризиком добре відповідають на стандартні схеми терапії. Особи з клінічно високим ризиком і цитогенетично низьким ризиком неуспішності терапії часто мають мутації шляху RAS (особливо діти з гіпердиплоїдією), що суттєво погіршує прогноз перебігу ГЛЛ після рецидиву.

Імунофенотипування бластних клітин полягало в детальному вивченні антигенів на поверхні плазматичної мембрани цих клітин. За допомогою панелі МКАТ на злоякісних клітинах виявляли стадієспецифічні та лінійно-специфічні антигени, що є основою для визначення функціонального стану клітин, встановлення лінійної належності та визначення стадії зрілості прекурсорів В- та Т-лімфоцитів.

Досліджуючи антигенний склад бластних клітин встановлено, що після проведення ALLIC-BFM 2009 цитостатичної терапії найвищий рівень експресії виявлений для лінійно-незалежних та В-лінійних антигенів бластних клітин. Так, аналіз імунофенотипу лінійно-незалежних лімфобластів показав експресію HLA – $93 \pm 8,4$ %, Anti-TdT – $91 \pm 7,1$ %, CD10 – $78 \pm 7,2$ %, CD38 – $91 \pm 7,9$ % та CD34 – $57 \pm 4,3$ % (табл. 3.6).

Експресія антигенів CD10 та CD38 підтвердила, що вони нерівномірно розподілялися в популяції В-лімфобластів. Відомо, що наявність маркера CD38 не пов'язана з клінічною картиною, що спостерігається при ГЛЛ та не впливає на загальну виживанність хворих. Водночас для пацієнтів, на клітинах яких визначається експресія CD34, характерне менше виживання [23].

Таблиця 3.6

Гетерогенність експресії антигенів бластних клітин кісткового мозку дітей із ГЛЛ після проведення цитостатичної терапії

Вид антигена (CD)	Частка бластів (%), на поверхні яких перебував антиген	
	Рецидив захворювання	Повна ремісія
<i>Лінійно-незалежні антигени</i>		
CD34	57±4,3	21±1,9
HLA	93±8,4	64±5,2
TdT	91±7,1	22,5±2,8
CD10	78±7,2	26±3,1
CD38	91±7,9	90,5±9,4
CD45	28±2,1	89±7,6
<i>B-лінійні антигени</i>		
CD79a	58±6,4	36,5±4,1
CD22	78±8,3	83,5±7,3
CD19	98±9,3	56±4,9
CD58	87±7,6	73±8,4
<i>Мієлоїдні антигени</i>		
CD33	47±5,6	19±2,1
CD13	39±4,3	16±1,3

Аналізуючи імунофенотип бластних клітин, можемо встановити стадію їх дозрівання. Відомо, що в ході нормального гемопоезу для кожного етапу дозрівання В-лімфоцитів характерний певний спектр експресії антигенів. На ранній стадії (стадії про-В-лімфоцитів) В-попередники експресують CD34 і TdT, спостерігається низька інтенсивність експресії CD10, при цьому відзначається повна відсутність антигена CD20 [21]. Під час дозрівання клітин

відбувається поступова втрата таких маркерів, як CD34 і TdT, і стає більш вираженою експресія CD10 [25].

Саме такі зміни виявлені в пацієнтів із повною ремісією, у яких знижується експресія CD34 до $21 \pm 1,9$ % та TdT до $22,5 \pm 2,8$ % з одночасно високим рівнем CD10 – $26 \pm 3,1$ (табл. 3.6).

Виявлений факт вказує, що під час ремісії у КМ відновлюються процеси диференціації та дозрівання бластних клітин.

На наступній стадії гемопоезу поступово з'являється експресія CD20 (у наших дослідженнях антиген CD20 не ідентифікувався) та виражена експресія антигена CD38. У пацієнтів із ремісією експресія CD38 була на рівні $90,5 \pm 9,4$ % (табл. 3.6).

При переході на стадію зрілих В-лімфоцитів відбувається втрата експресії CD10, CD38, збільшується рівень експресії маркера CD22 [21]. У наших дослідженнях таких змін у групах із рецидивами та повною ремісією не виявлено, очевидно, через те, що бластні клітини КМ аналізували одразу після закінчення курсу хіміотерапії. Низький рівень експресії CD45 при рецидивах – $28 \pm 2,1$ % та високий при ремісії $89 \pm 7,6$ % свідчить про наявність клітин на ранніх та пізніх стадіях дозрівання в досліджуваних групах відповідно, бо експресія CD45 спостерігається на ранній стадії диференціювання і збільшується під час дозрівання клітин.

Серед В-лінійних антигенів висока експресія виявлена для антигена CD19 – $98 \pm 9,3$ %, а також для антигенів: CD22 – $78 \pm 8,3$ %, CD58 – $87 \pm 7,6$ %. Нижчий рівень експресії спостерігався для CD79a – $58 \pm 6,4$ (табл. 3.6). Експресований CD19 на мембранах бластів у пацієнтів із рецидивами може стати мішенню для терапії пухлин лімфоїдного походження через його високий рівень експресії, що варто враховувати при виборі подальшої тактики лікування. Такі маркери, як CD19, CD79a і HLA-DR, позитивні протягом усіх етапів диференціювання В-лімфоцитів [24], тому вони наявні в пацієнтів як із рецидивами, так і з ремісією (табл. 3.6).

Отже, у результаті нашої роботи встановлено, що в пацієнтів із рецидивом захворювання із різним ступенем вираження трапляються імунофенотипові аберації, не властиві нормальним гемопоетичним клітинам. Асинхронна експресія маркерів диференціювання спостерігається в більшості випадків дітей із рецидивом ГЛЛ, що необхідно враховувати при моніторингу хворих під час та після проведення цитостатичної хіміотерапії.

Дослідження експресії антигенів, характерних для Т-клітинної ГЛЛ, показало їхню відсутність як у пацієнтів із рецидивами, так і в пацієнтів із ремісією. Водночас у пацієнтів із рецидивом була виявлена експресія мієлоїдних антигенів – CD33 ($47 \pm 5,6\%$) та CD13 ($39 \pm 4,3\%$) (табл. 3.6).

Наявність експресії антигена CD13 була виявлена в 15 (14,3 %) хворих дітей.

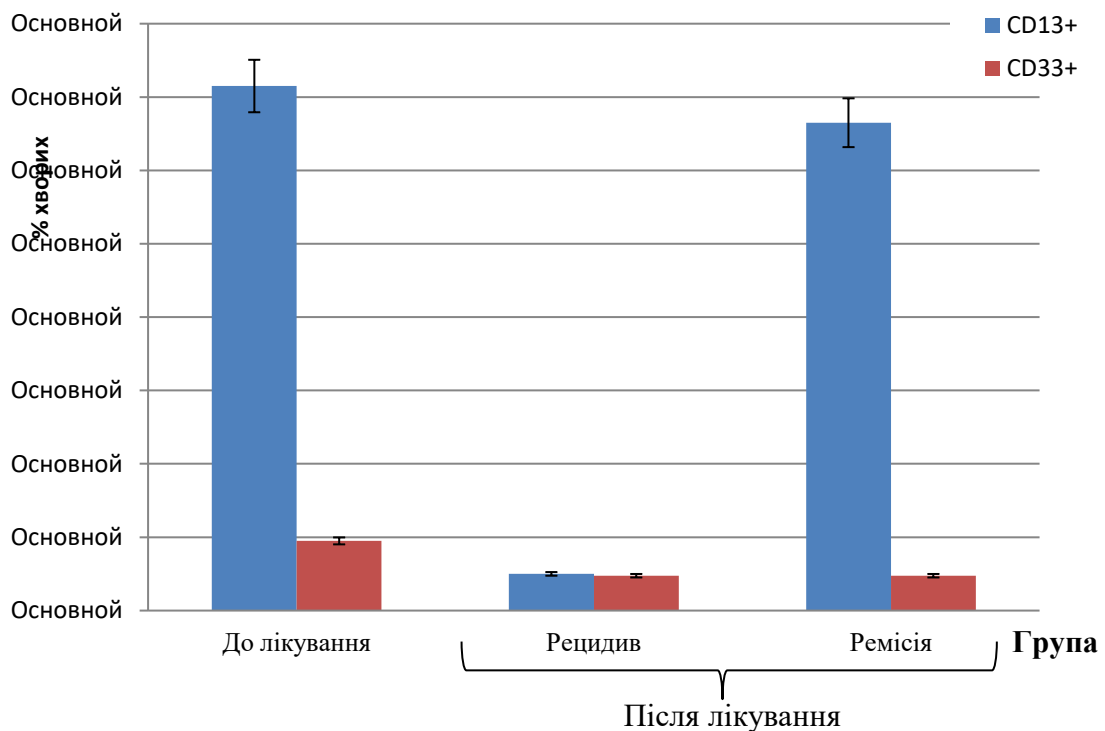


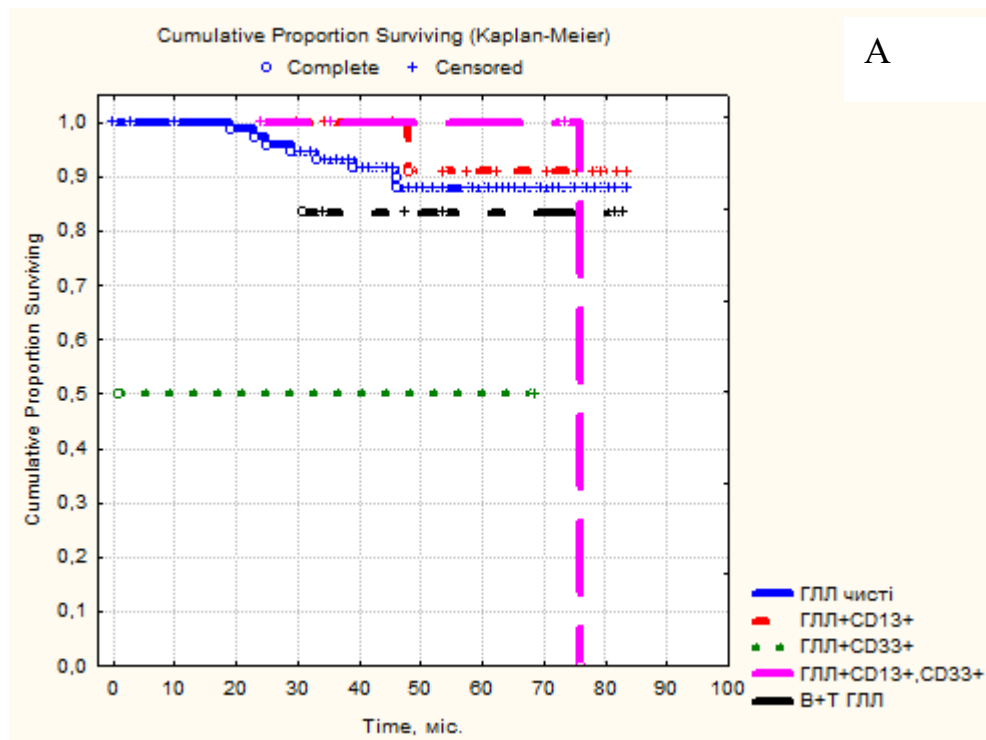
Рис. 3.13 Розподіл дітей із ГЛЛ за наявністю мієлоїдних антигенів у клітинах кісткового мозку

Експресія мієлоїдних маркерів CD33 та CD13 при лімфобластних лейкозах може бути пов'язана з тим, що бластні клітини відповідають раннім

тимоцитам, однак їх не можна враховувати як діагностичні маркери виявлення ранніх рецидивів. Водночас встановлено, що триваліше виживання хворих на ГЛЛ співвідноситься з експресією на бластних клітинах CD33 [25].

Отже, аналіз імунофенотипу бластних клітин КМ із використанням МКАТ допомагає визначити форму ГЛЛ, що дозволяє спрогнозувати перебіг захворювання. Наявність MRD є незалежним несприятливим прогностичним фактором розвитку рецидиву, що необхідно враховувати під час розробки комплексної цитостатичної терапії. Виживання пацієнтів може залежати від наявності на бластних клітинах відповідних рецепторів, що забезпечуватиме резистентність пухлин до дії цитостатиків.

Результати досліджень показали, що найвище безрецидивне та безподійне виживання спостерігається при чистих формах ГЛЛ, найнижче за умов експресії на бластних клітинах CD33. За умови коекспресії на бластних клітинах CD13 та CD33 безрецидивне та безподійне виживання перебуває на рівні 100 % протягом 6 років спостереження, після чого різко знижується (рис. 3.14).



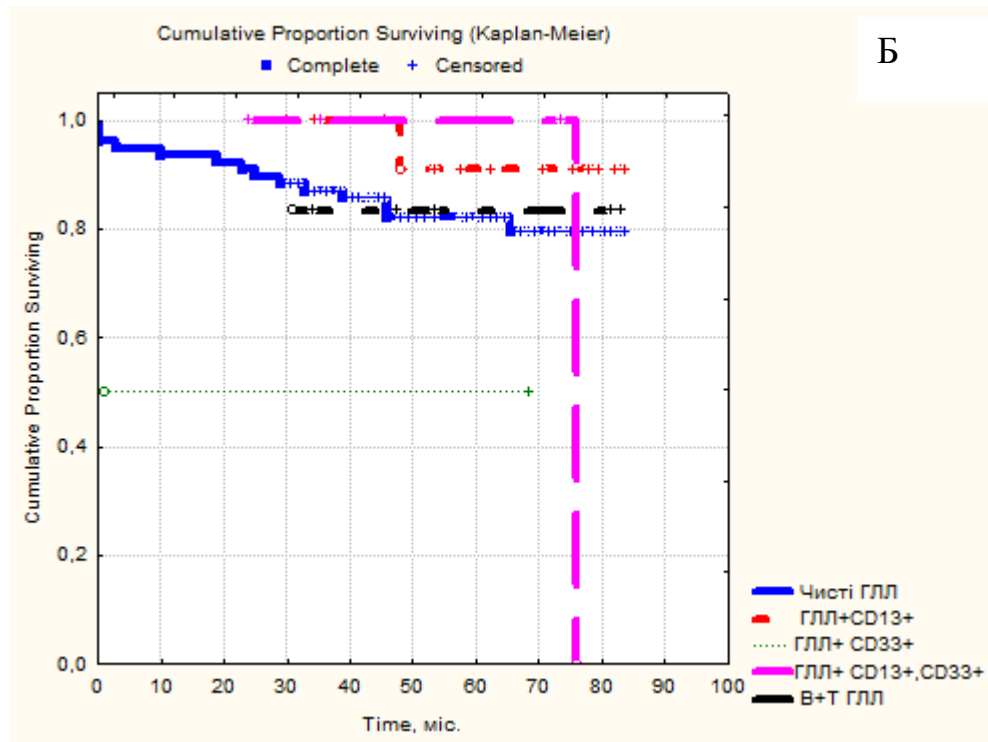


Рис. 3.14 Криві Каплан–Майєра безрецидивного (А) та безподійного (Б) виживання хворих на ГЛЛ залежно від присутності додаткових коекспресій на бластах

Висновки до розділу:

Виявлені зміни параметрів експресії мембранних антигенів відображають процеси, що відбуваються всередині клітини. Це дає можливість припустити, що популяція В-лімфоїдних пухлинних клітин у пацієнтів із рецидивами неоднорідна, існують субпопуляції з різними фізичними та функціональними характеристиками, з різним ступенем сприйнятливості та резистентності до проведеної терапії.

Під час антилейкемічного лікування відбувається зниження показників середньої інтенсивності флуоресценції лейкоз асоційованих антигенів. Це слід враховувати під час проведення моніторингу MRD: застосовувати комбінації антигенів, простежувати інтенсивність флуоресценції маркерів, контролювати популяції з нестандартним фенотипом.

Матеріали даного розділу опубліковані у статтях:

1. Винницька О. А., Дубей Н. В., Дорош О. І., Дубей Л. Я. Імунофенотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої

лімфобластної лейкемії у дітей. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021;6(1):56-64. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.01.056>

2. Винницька О.А. Прогнозування окремих клінічних і лабораторних показників лімфобластної лейкемії у дітей, що отримали цитостатичну терапію ALLIC BFM 2009. *Клінічна Онкологія* .2021; Т.11№1-2:33-40. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.41-1.

РОЗДІЛ 4 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БЛАСТНИХ КЛІТИН І ПЕРЕБІГ ХВОРОБИ

4.1 Клініко-лабораторні особливості ГЛЛ у дітей залежно від виявлених молекулярно-генетичних транслокацій

Дослідження ініціальних клініко-гематологічних показників у дітей із ГЛЛ показали, що в пацієнтів із транслокаціями середній рівень гемоглобіну становив 88 Г/л, тоді як без транслокацій – 84 Г/л. Слід зауважити, що прослідковується досить широке коливання рівня гемоглобіну у пацієнтів з транслокаціями, яке становить від 40 Г/л до 162 Г/л, тоді як у пацієнтів без генетичних модифікацій таке коливання перебуває в межах від 40 Г/л до 130 Г/л. Встановлений факт може свідчити про непередбачуваність перебігу захворювання та складність моніторингу під час лікування (рис. 4.1).

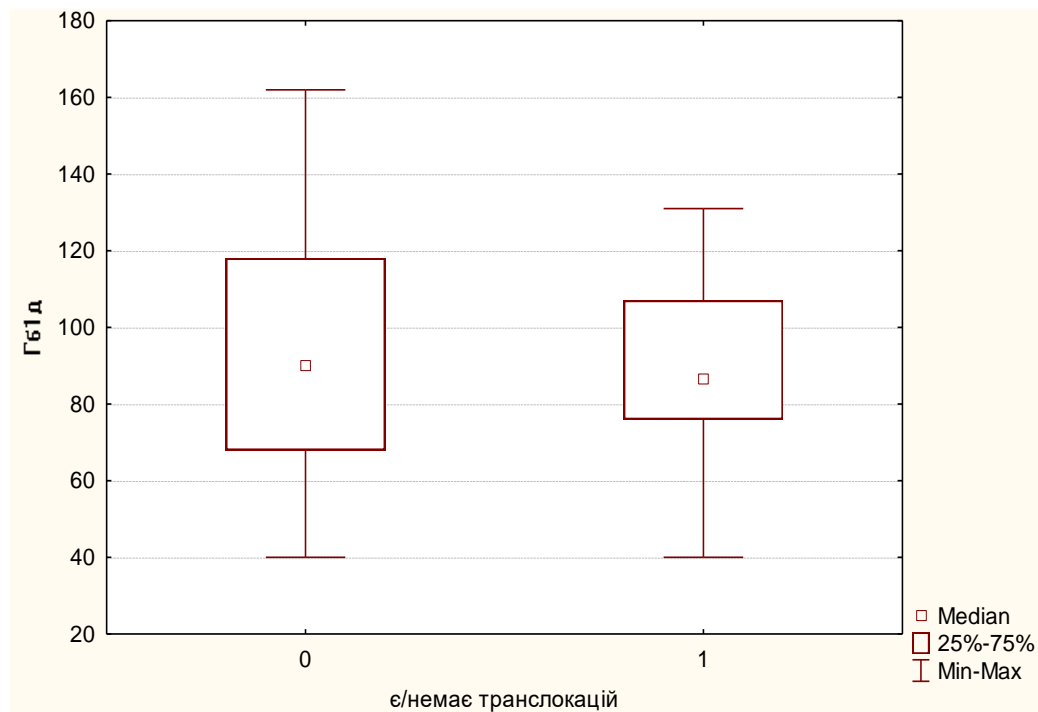


Рис. 4.1 Коливання ініціального рівня гемоглобіну (Гб) залежно від наявності чи присутності генетичних транслокацій на бластах

Щодо кількості лейкоцитів, то їхнє середнє значення у пацієнтів з наявними транслокаціями та за умови їхньої відсутності становлять 16 Г/л та 18 Г/л відповідно. Причому межі коливань у пацієнтів із транслокаціями значно ширші – (2-98) Г/л порівняно з пацієнтами, у яких транслокації відсутні: межі коливань (2-78) Г/л (рис. 4.2).

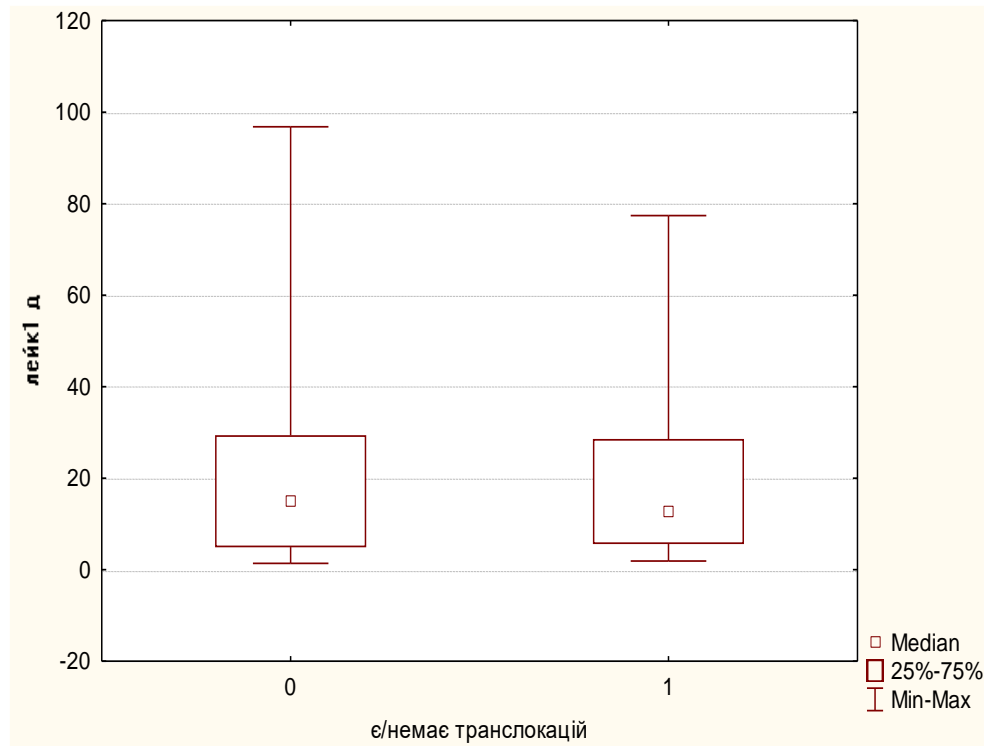


Рис. 4.2 Коливання значення лейкоцитів (лейк) на 1-ий день залежно від наявності чи присутності генетичних транслокацій на бластах

Під час проведення цитостатичної хіміотерапії коливання кількості лейкоцитів різко змінюється. Так, на 8-ий день лікування в пацієнтів із транслокаціями та без них середнє значення кількості лейкоцитів не відрізняється та перебуває на рівні 3 Г/л, тоді як максимальне значення кількості лейкоцитів у пацієнтів із транслокаціями – на рівні 38 Г/л, а в пацієнтів за умови відсутності транслокацій на рівні 102 Г/л, що може свідчити про більшу чутливість пухлинного клону до хіміотерапії на початкових етапах лікування ГЛЛ (рис. 4.3).

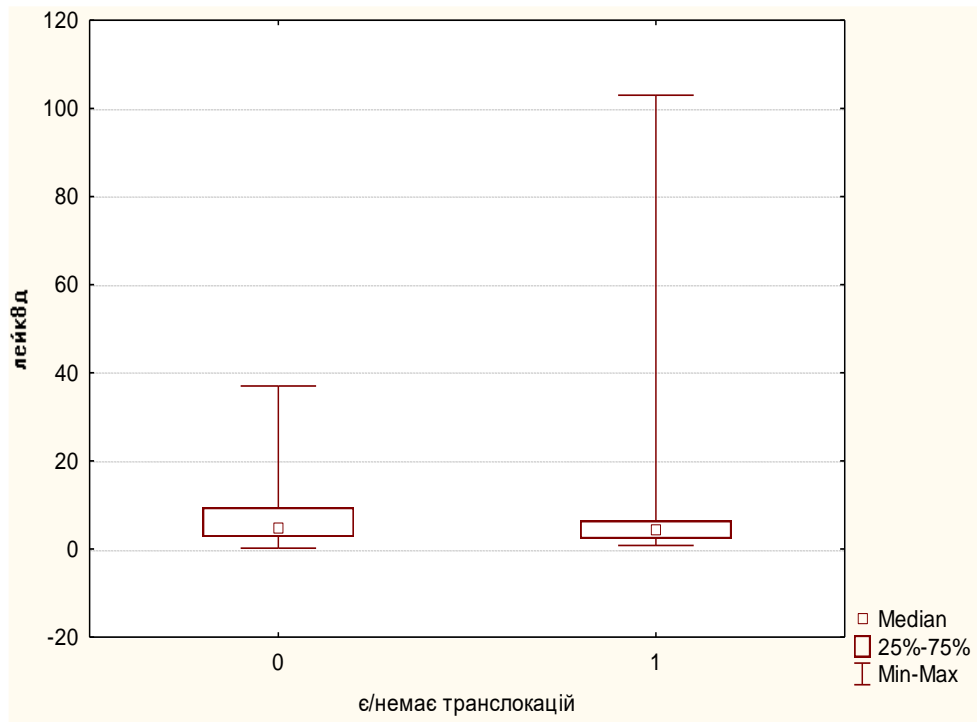


Рис. 4.3 Коливання значення лейкоцитів (лейк) на 8-ий день індукційного лікування залежно від наявності чи присутності генетичних транслокацій на бластах

Продовження цитостатичної хіміотерапії супроводжується, очевидно, підвищенням резистентності пухлинного клону в деяких пацієнтів з транслокаціями, бо максимальний рівень лейкоцитів перебуває на рівні 26,5 Г/л, тоді як у пацієнтів без транслокацій – на рівні 9 Г/л. Середнє значення кількості лейкоцитів статистично не відрізняється, оскільки становить 2,5 Г/л – у пацієнтів із наявними транслокаціями та 2,1 – у пацієнтів без транслокацій. Такі відхилення від середнього арифметичного, очевидно, пов'язані з видом хромосомної аберації, тобто залежать від залучення тих чи інших генів в утворенні відповідних транслокацій (рис. 4.4).

Щоб перевірити вище зазначене припущення, ми проаналізували рівень лейкоцитів залежно від виду утвореного химерного гена.

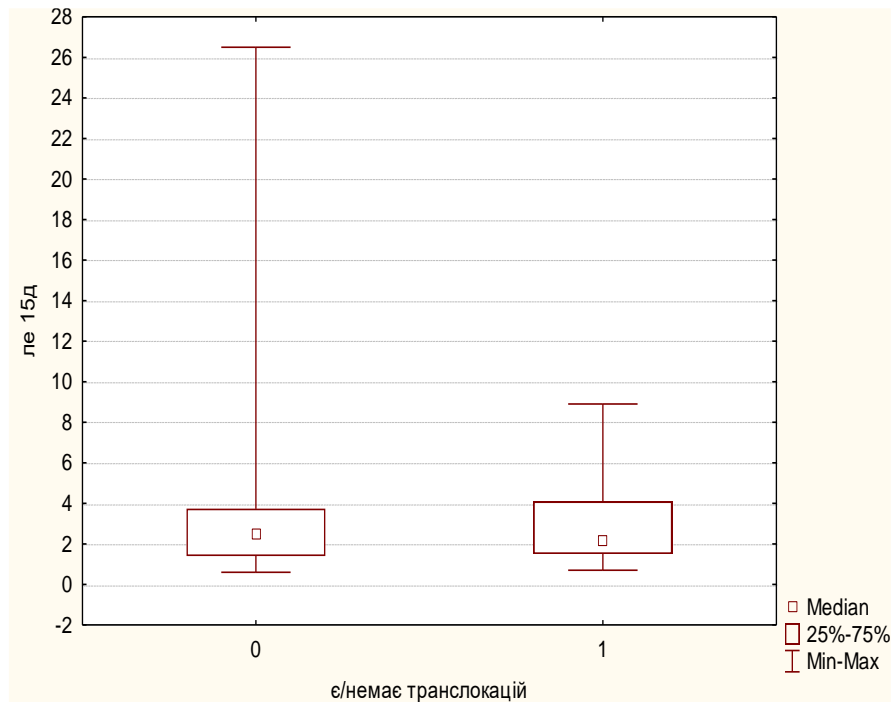


Рис. 4.4 Коливання значення лейкоцитів (лейк) на 15-ий день індукційного лікування залежно від наявності чи присутності генетичних транслокацій на бластах

Результати проведених досліджень показали, що найвище коливання кількості лейкоцитів у крові спостерігається в пацієнтів з *BCR/ABL* t(9;22) (q34;q11) та *TEL/AML* t(12;21)(q13;q22) химерними генами (табл. 4.1).

Так, на перший день хіміотерапії у пацієнтів із виявленими *BCR/ABL* транслокаціями коливання рівня лейкоцитів становить 19,30–54,40 Г/л, а з виявленими *TEL/AML* транслокаціями – 2,20–77,4 Г/л (табл. 4.1). На 8-ий день хіміотерапії в пацієнтів із *BCR/ABL* коливання становить 1,50–5,30 Г/л (тобто знижується), а в пацієнтів із *TEL/AML* межі коливання залишаються широкими й перебувають на рівні 1,20–103 Г/л.

На 15-й та 33-й день хіміотерапії рівень коливання лейкоцитів залишається найвищим у пацієнтів із генетичною транслокацією *TEL/AML* та становить 0,80–8,90 Г/л та 1,10–8,00 Г/л відповідно (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Окремі показники кісткового мозку та периферійної крові первинної відповіді на індукційне лікування в дітей, хворих на ГЛЛ, на час встановлення діагнозу залежно від молекулярно-генетичних особливостей

Параметри		Усі хворі n=105	Потрійний сигнал на хромосомі 17 n=5	t(4;11) (q23;p23) AF4/MLL n=1	t(9;22) (q34;q11) BCR/ABL n=2	t (12;21) (q13;q22) TEL/AML n=22	t(1;19)) n=6	Молекулярно-генетичних змін не виявлено n=66
Вік	med, міс	6 років	42,00	84,00	72,00	60,00	84,00	72,00
	min-max	12 міс. – 16 років	34–175	84,00	72,00–72,00	12,00–180,00	33,00–120,00	12,00–192,00
Гемоглобін, г/л	med	89,00	84,00	99,00	100,50	84,50	84,50	90,00
	min-max	40,00–162,00	76,00–106,00	99,00	87,00–114,00	40,00–131,00	53,00–96,00	40,00–162,00
Бласти кісткового мозку, %, на 1-ий день	med	87,40	93,80	86,40	97,15	90,90	97,65	87,20
	min-max	29,90–100,00	43,40–96,00	86,40	94,40–99,90	43,10–100,00	56,90–100,00	62,00–100,00
Бласти крові, %, на 1-ий день	med	13,80	52,00	57,00	67,500	48,50	73,500	54,00
	min-max	1,40–96,80	5,00–78,0	57,00	40,00–95,00	4,00–99,00	1,00–99,00	0,00–99,70
Бласти крові, Г/л, 1-ий день	med	53,0	2,91	5,30	9,75	5,70	20,08	7,50
	min-max	0,0–99,70	0,12–35,26	5,30	7,72–11,78	0,19–50,79	0,20–31,03	0,00–82,26
Лейкоцити крові, Г/л, на 1-ий день	med	6,55	5,60	9,30	36,85	12,35	22,60	15,00
	min-max	0,00–82,28	2,40–45,20	9,30	19,30–54,40	2,20–77,4	1,900–43,10	1,40–82,28
Лейкоцити крові, Г/л, на 8-ий день	med	4,60	2,50	4,50	3,400	5,00	4,40	4,70
	min-max	0,02–103,00	1,20–4,60	4,50	1,50–5,30	1,20–103,0	0,800–11,20	0,20–37,00
Бласти крові, Г/л, на 8-ий день	med	0,058	0,47	0,045	2,10	0,02	0,24	0,06
	min-max	0,00–4,11	0,03–1,15	0,045	0,70–3,50	0,00–2,77	0,02–1,79	0,00–4,11
Бласти крові, %, на 8-ий день	med	1,00	17,00	1,00	49,00	1,00	5,50	1,00
	min-max	0,00–97,00	2,00–25,00	1,00	1,00–97,00	0,00–16,00	1,00–28,00	0,00–80,00
Лейкоцити крові, Г/л, на 15-ий день	med	2,40	1,90	4,60	5,45	3,19	2,04	2,50
	min-max	0,60–26,50	0,70–3,00	4,60	1,40–9,50	0,80–8,90	0,90–5,20	0,60–26,50
Бласти кісткового мозку, %, на 15-ий день	med	4,40	5,00	3,60	1,81	3,50	6,95	4,40
	min-max	0,00–95,00	3,20–21,20	3,60	1,35–2,60	0,09–16,4	1,60–12,00	0,00–33,00
MRD, %, на 15-ий день	med	2,5	8,50	4,70	1,81	1,80	3,45	2,5
	min-max	0,01–52,9	2,10–26,40	4,70	1,35–2,26	0,01–15,6	0,73–12,10	0,01–46,00

Параметри		Усі хворі n=105	Потрійний сигнал на хромосомі 17 n=5	t(4;11) (q23;p23) <i>AF4/MLL</i>	t(9;22) (q34;q11) <i>BCR/ABL</i>	t (12;21) (q13;q22) <i>TEL/AML</i>	t(1;19)) n=6	Молекулярно-генетичних змін не виявлено n=66
				n=1	n=2	n=22		
Лейкоцити крові, Г/л, на 33-й день	med	2,50	1,00	2,80	1,20	3,15	1,95	2,50
	min-max	0,00–17,30	0,04–1,20	2,80	1,10–1,30	1,10–8,00	0,40–6,00	0,00–17,30
Бласти кісткового мозку, %, на 33-й день	med	1,70	2,00	0,00	2,95	1,50	2,85	1,70
	min-max	0,00–6,70	0,40–1,20	0,00	0,00–5,90	0,00–5,40	1,00–6,70	0,00–5,40
MRD, %, на 33-й день	med	0,00	0,01	0,04	0,05	0,00	0,00	0,00
	min-max	0,00–11,00	0,00–0,06	0,04	0,36–0,0,6	0,00–3,20	0,00–11,00	0,00–3,50
Тривалість ремісії, міс.	med	58,00	31,00	48,00	–	–	71,50	62,50
	min-max	0,00–83,50	25,00–46,00	48,00	–	–	0,00–81,50	0,00–83,50

Отже, з отриманих результатів видно, що проведення курсу цитостатичної хіміотерапії потребує ретельного моніторингу адекватної відповіді пацієнта на лікування та оцінки ступеня MRD, особливо в пацієнтів із наявними транслокаціями, для передбачення онкогенного процесу. Такий моніторинг необхідно проводити з визначенням показника MRD.

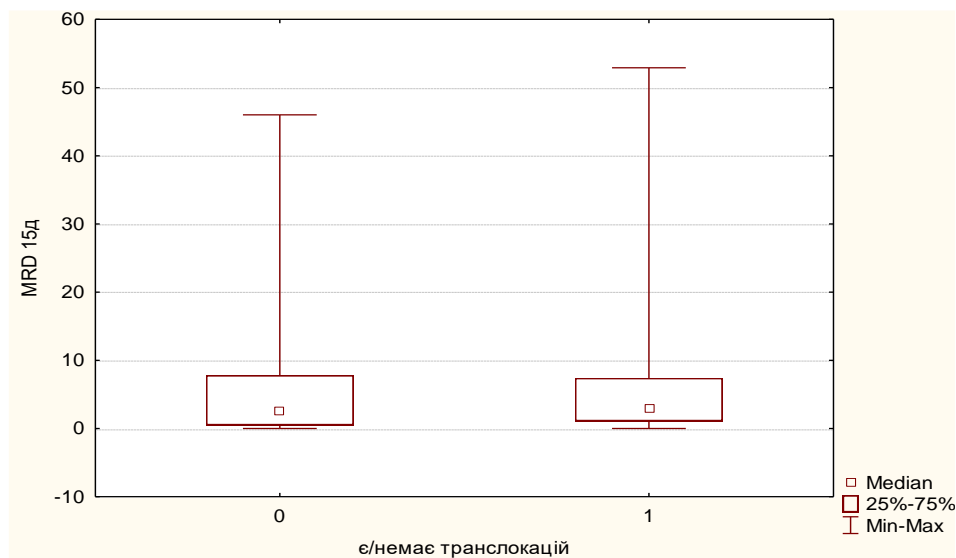


Рис. 4.5 Коливання значення MRD у кістковому мозку на 15-ий день індукційного лікування залежно від наявності чи відсутності генетичних транслокацій на бластах

Визначення MRD у пацієнтів із наявними та відсутніми транслокаціями не показало відмінностей середнього значення MRD у цих груп пацієнтів на 15-ий день проведення хіміотерапії (рис. 4.5).

Відсутня й статистично достовірна різниця середнього значення показника MRD між групами пацієнтів із генетичними транслокаціями й без них на 33-ій день лікування (рис. 4.6).

Водночас максимальне значення вище в пацієнтів без транслокацій (рис. 4.5, рис. 4.6).

Отже, в динаміці проведення хіміотерапії спостерігається зниження рівня кількості лейкоцитів та показника MRD із мінімальними значеннями на 33-ій день проведення хіміотерапії.

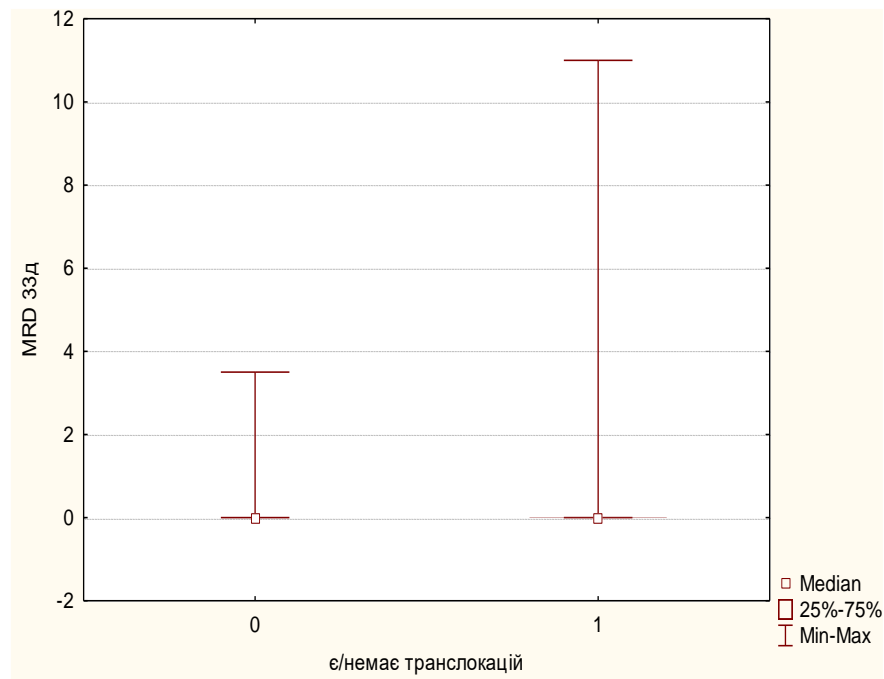


Рис. 4.6 Коливання значення MRD у кістковому мозку на 33-й день індукційного лікування залежно від наявності чи відсутності генетичних транслокацій на бластах

Коливання кількості лейкоцитів характерне для пацієнтів із транслокаціями, однак механізми змін за умови різних транслокацій потребують подальшого вивчення. Геномне профілювання з високою роздільною здатністю значно допоможе зрозуміти молекулярні механізми, що

лежать в основі результатів лікування, відповіді на терапію та біології рецидиву.

4.2 Окремі молекулярно-генетичні транслокації в дітей із ГЛЛ

В основі розвитку гострих лейкемій лежать порушення функціонування нормальних генів у клітинах-попередниках гемопоезу. Однією з ознак лейкемій, зокрема ГЛЛ, є хромосомна транслокація – специфічна хромосомна аберація, яка полягає в обміні сегментами між двома, зазвичай, негомологічними, хромосомами.

Основними хромосомними транслокаціями при ГЛЛ є *AF4/MLL* $t(4;11)(q23;p23)$, *BCR/ABL* $t(9;22)(q34;q11)$, *E2A/PBX1* $t(1;19)(q23;p13)$, *TEL/AML* $t(12;21)(q13;q22)$. Подальша експресія зазначених химерних генів призводить до синтезу химерних протеїнів, структурно-функціональні властивості яких змінені. Такі протеїни набувають онкогенних властивостей [4].

У низці випадків спостерігали зміну лінійної приналежності лейкемії («перемикання» фенотипу, lineage switch) – явище, при якому бластні клітини в дебюті захворювання відповідають морфологічним, цитохімічним та імунологічним критеріям однієї лінії диференціювання, а після рецидиву – іншим. У дітей рецидиви зі зміною лінійної приналежності трапляються частіше [54]. Найчастіше перемикання ліній відбувається при лейкемії з перебудовою гена *KMT2A* (lysine (K) – specific methyltransferase 2A; раніше відомої, як *MLL* – mixed lineage leukemia) – близько 50 % випадків.

Методи молекулярної біології у випадку ГЛЛ спрямовані на прицільний пошук специфічних, частіше мінімальних змін ДНК або мРНК у пухлинних клітинах. Найчастіше для діагностики використовуються ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), ДНК-секвенування та саузєрн-блотинг.

Аналіз результатів хромосомних порушень показав, що хромосомні аберації мали місце у 22 % пацієнтів до проведення курсу хіміотерапії. Найменші транслокаційні зміни в геномі хворих дітей із ГЛЛ стосувалися

химерного гена *AF4/MLL* t(4;11)(q23;p23), бо зазначений химерний ген був виявлений в 1 % пацієнтів.

Аналіз мутаційного статусу в клітинах кісткового мозку дітей із ГЛЛ показав наявність інших химерних генів.

Встановлено, що у 2 % дітей, хворих на ГЛЛ, виявлений химерний ген *BCR/ABL* t(9;22)(q34;q11), який формується в результаті реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами. Гібридний білок, який утворюється в результаті експресії цього гена, є конститутивно активною тирозинкіназою, яка має здатність фосфорилувати білки (рис. 4.7).

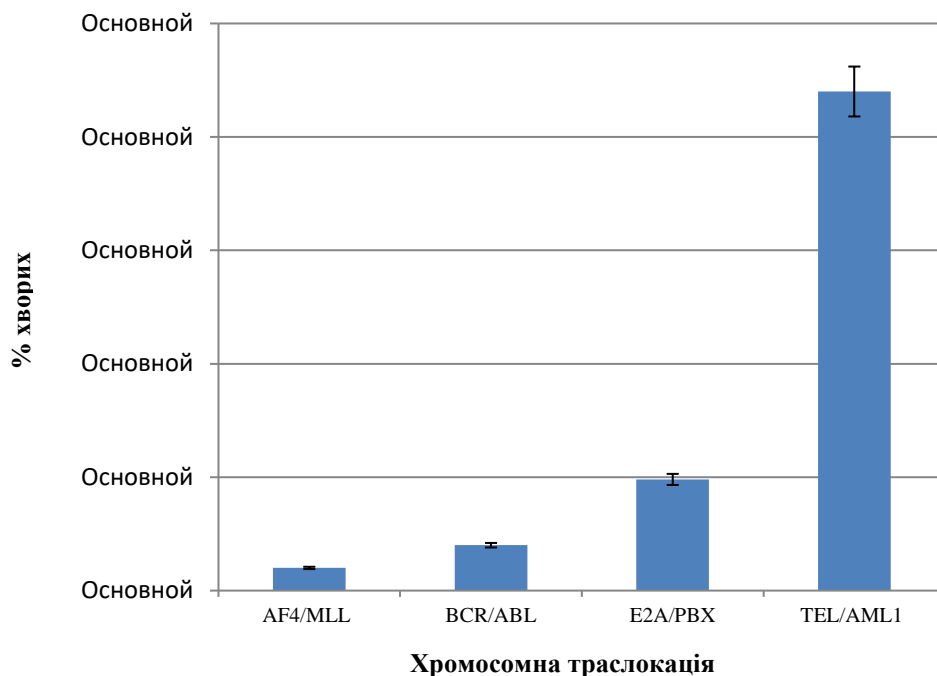


Рис. 4.7 Розподіл дітей із ГЛЛ за наявністю хромосомних аберацій

У значно більшого відсотка дітей спостерігається наявність химерних генів *E2A/PBX1* та *TEL/AML*. Так, ідентифікація злитого гена *E2A/PBX1* t(1;19)(q23;p13) наявна у 5 % хворих ГЛЛ, а гена *TEL/AML* t(12;21)(q13;q22) – у 21,5 %. Як видно з отриманих результатів, при ГЛЛ хромосомні аберації найчастіше трапляються в результаті транслокацій генів *TEL* і *AML* (21,5 %). Гени *TEL* і *AML* кодують ядерні транскрипційні фактори, які відіграють важливу роль у нормальному гемопоезі. Їх злиття призводить до виникнення й

розвитку лейкозу шляхом порушення нормальної функції *TEL* і / або зниження рівня експресії гена *AML1* (рис.4.7).

Після проведення курсу ALLIC BFM 2009 цитостатичної хіміотерапії в 11,76 % дітей був виявлений рецидив захворювання, тоді як у 88,23 % пацієнтів спостерігалася повна ремісія. Результати досліджень хромосомних аберацій у досліджуваних групах пацієнтів показали відмінності в наявності транслокацій генів. Так, у пацієнтів із виявленими рецидивами ідентифікувалися хромосомні транслокації таких генів: *AF4/MLL* – у 9 %; *BCR/ABL* – у 9 %; *E2A/PBX1* – у 9 %; ген *TEL/AML1* не діагностували (рис. 4.8).

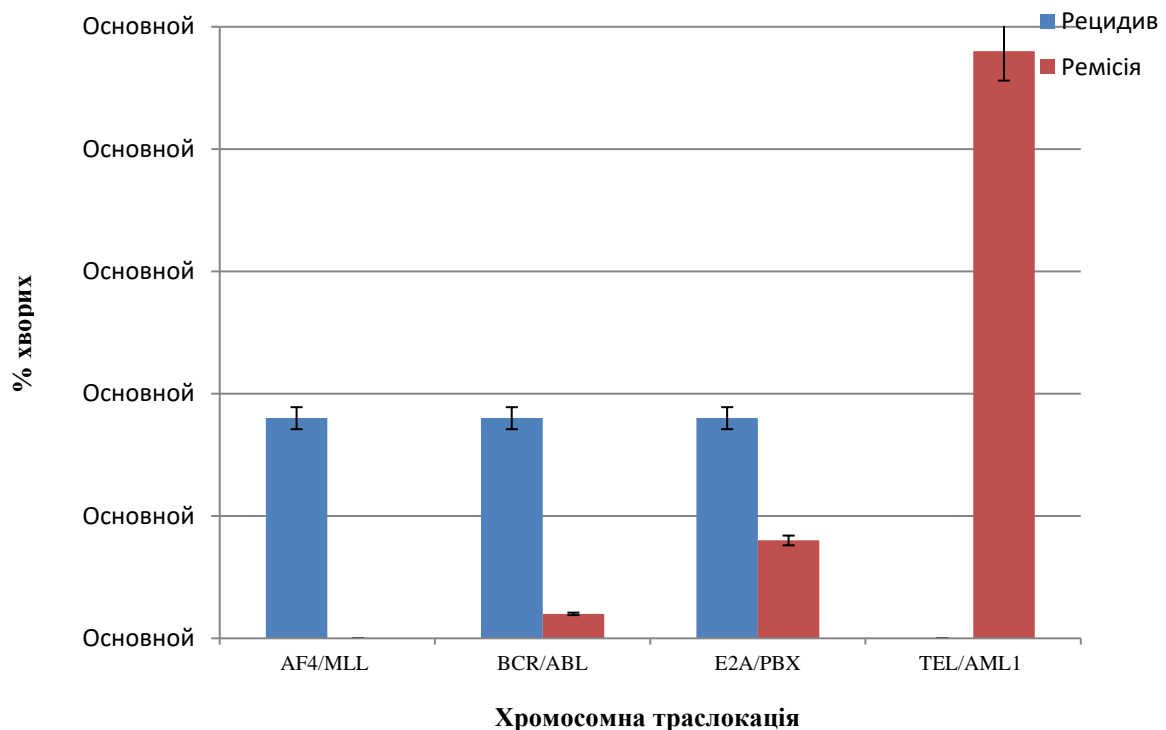


Рис. 4.8 Спектр хромосомних транслокацій у дітей із рецидивами та ремісією ГЛЛ після проведення курсу цитостатичної терапії за протоколом ALLIC BFM 2009

З отриманих даних видно, що ключову роль у розвитку рецидивів ГЛЛ мають досліджувані три хромосомні транслокації відповідних локусів хромосом: *AF4/MLL* t(4;11)(q23;p23), *BCR/ABL* t(9;22)(q34;q11) та *E2A/PBX1* t(1;19)(q23;p13). Очевидно, продукти експресії цих генів відіграють важливу

роль не лише в трансформації гемопоетичних клітин із підвищенням їхньої проліферації та зниження здатності до апоптозу, але й сприяють резистентності пухлинних клітин до дії цитостатиків. Клітини пухлинного (лейкемічного) клону можуть мати нестабільний геном, у результаті чого в химерних генах *AF4/MLL*, *BCR/ABL* та *E2A/PBX1* можуть відбутися мутації, які призведуть до зміни конформації онкогенних білків, у результаті чого цитостатики втрачають здатність блокувати онкогени та посилену проліферацію клітин, які, у свою чергу, набувають резистентності до препарату [10].

Тому, вкрай необхідним є своєчасне виявлення нечутливості пухлинних клітин при ГЛЛ до цитостатиків, що дозволить провести корекцію лікувальної тактики хворого. Відсутність онкогену *TEL/AML* у хворих ГЛЛ із рецидивами вказує на його другорядну роль у розвитку ускладнень досліджуваної патології.

Аналіз спектру хромосомних транслокацій у пацієнтів із повною ремісією захворювання після проведення цитостатичної терапії ALLIC BFM 2009 показав повну відсутність химерного гена *AF4/MLL*. Встановлений факт свідчить про сприятливий прогноз захворювання, бо одночасно з транслокаціями, що зачіпають локус 11q23, у ядрах пухлинних клітин хворих ГЛЛ можуть спостерігатися додаткові хромосомні пошкодження: виявляються +X, +8, і (7) (q10), аномалії 7p і 9p. До числа вторинних хромосомних пошкоджень, виявлених синхронно з t (4; 11), входять +X, +8 і del (6q). Тому відсутність химерного гена *AF4/MLL* вказує на ефективність проведеної цитостатичної терапії.

Водночас у пацієнтів із ремісією ідентифікуються химерні гени *BCR/ABL* – у 1 %, *E2A/PBX1* – у 4 % та *TEL/AML* – у 24%. Наявність химерних генів у пацієнтів із ремісією може свідчити про ризик повторного онкогенезу. Однак важливу роль у цьому процесі належить саме експресії химерних онкогенів із синтезом онкобілків. Щоб перевірити це припущення, ми дослідили спектр експресії химерних генів як маркерів молекулярно-генетичної діагностики ГЛЛ та ефективності цитостатичної терапії в умовах рецидиву та ремісії захворювання.

Участь хромосомних аберацій у канцерогенезі полягає не тільки в злитті нуклеотидних послідовностей різних генів, але й в експресії химерних онкогенів і, як наслідок, у появі в клітинах чужорідних білків – онкобілків, які можуть бути онкомаркерами при ГЛЛ. Тому саме експресія химерних генів лежить в основі виникнення рецидивів та вказує на ефективність проведеної тактики лікування онкозахворювання.

Для визначення статусу онкогенів був проведений аналіз експресії всіх чотирьох онкогенів. Для виявлення експресії химерних генів у клітинах кісткового мозку дітей із ГЛЛ використовували стандартну ПЛР у реальному часі з праймерами *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML*, що призводило до синтезу фрагментів ДНК відповідної ділянки транслокації хромосом і, відповідно, онкогенів, а також мРНК.

Результати досліджень показали, що до лікування в усіх пацієнтів з ГЛЛ, які були носіями химерних генів, спостерігалася їхня експресія в реальному часі, що свідчить про їхню активність *in vivo* та синтез химерних протеїнів (рис. 4.8).

Молекулярно-генетичне дослідження кісткового мозку пацієнтів із ГЛЛ за допомогою ПЛР у реальному часі показало, що найвища експресія спостерігається в онкогена *BCR/ABL*, бо виявлено $4,2 \pm 0,65 \times 10^{-3}$ копій мРНК онкогена *BCR/ABL* відносно контрольного гена *ABL1*. Встановлений факт вказує, що ген *BCR/ABL* є ключовим патогенетичним фактором розвитку переважної кількості випадків ГЛЛ у дітей. Після проведення курсу ALLIC BFM 2009 цитостатичної терапії експресія цього гена знижується у 20 разів у пацієнтів із повною ремісією та у 2,3 рази у хворих, у яких спостерігався рецидив захворювання (рис. 4.9).

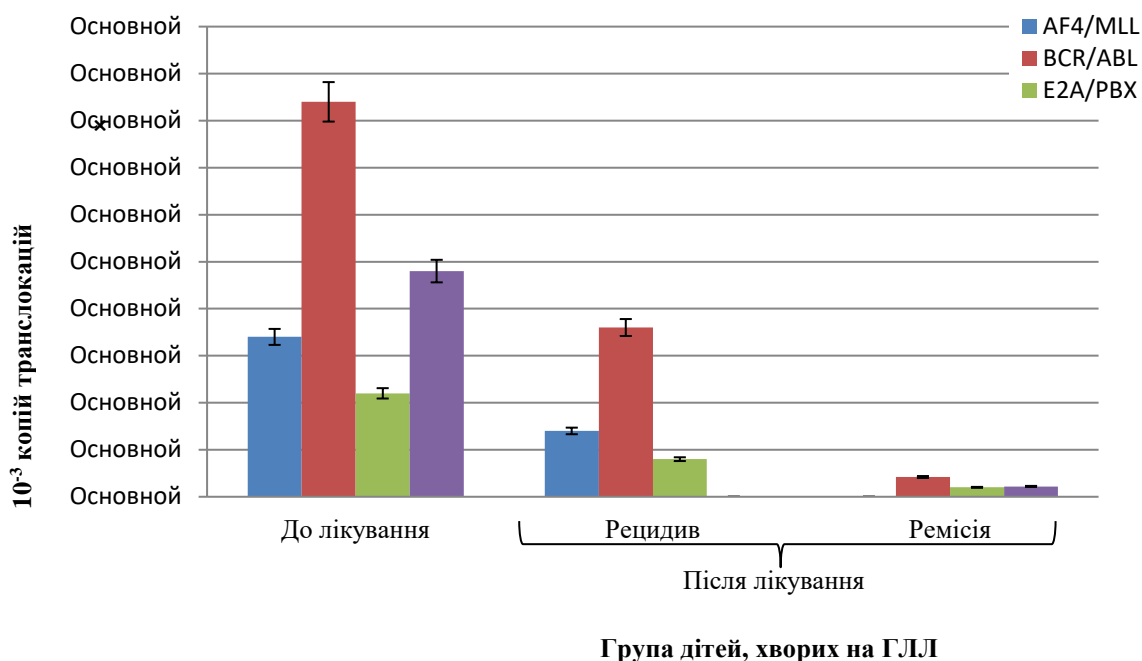


Рис. 4.9 Експресія онкогенів *AF4/MLL*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* та *TEL/AML* у клітинах кісткового мозку дітей із ГЛЛ після проведення курсу цитостатичної терапії за протоколом ALLIC BFM 2009

Значне зниження експресії онкогена *BCR/ABL* під час повної ремісії захворювання свідчить про ефективність вибраної терапії для досліджуваної групи хворих, що необхідно враховувати при розробці методів моніторингу індивідуальної відповіді пацієнта на застосовану терапію. Високий рівень експресії онкогена *BCR/ABL* у пацієнтів із рецидивами може бути наслідком мутацій у химерному гені, що свідчить про резистентність клітин пухлинного клону до дії цитостатиків.

Аналіз результатів досліджень показав, що до лікування ГЛЛ на високому рівні виявлена експресія онкогена *TEL/AML* (рис. 4.9). Однак, з огляду на той факт, що після проведення ALLIC BFM 2009 хімотерапії у пацієнтів із рецидивами цей онкоген не ідентифікується, але виявлений у 24 % пацієнтів із повною ремісією, то цей показник не можна вважати цінним маркером діагностики рецидивів ГЛЛ. Водночас ідентифікований химерний ген *TEL/AML* у пацієнтів із повною ремісією проявляє досить низьку активність, так як його експресія, виявлена ПЛР у реальному часі, становить $1,1 \pm 0,25 \times 10^{-3}$ копій мРНК.

Наступним за рівнем експресії з чотирьох досліджуваних онкогенів трансформованих клітин є химерний ген *AF4/MLL*, що утворюється злиттям фрагментів двох генів: *AF4* (4q21) та *MLL* (11q23) [18, 21]. Встановлено, що цей ген експресується в дітей як до лікування ГЛЛ, так і в дітей, у яких виявлені рецидиви після проведення хіміотерапії, що свідчить про ключову роль цього онкогена в розвитку рецидивів та патогенезі ГЛЛ [17]. У дітей, у яких виявлена повна ремісія, онкоген *AF4/MLL* не експресується, що відображено на рисунку 4.9.

Утворення химерного генного продукту *E2A/PBX1* свідчить про дисфункціонування В-клітин, бо ізольований ген *E2A* кодує базовий фактор транскрипції.

Протипухлинна активність цитостатичних засобів проявляється у впливі на клітини, які активно діляться внаслідок пошкодження різними способами ДНК. При цьому нерідко проявляється вплив і на здорові клітини, які активно проліферують. Ці властивості можуть лежати в основі безрецидивного виживання хворих ГЛЛ, при чому ступінь виживання може залежати від наявності змін у геномі. Щоб перевірити це припущення, ми дослідили показник безрецидивного виживання пацієнтів після проведення курсу хіміотерапії залежно від наявності хромосомних транслокацій (рис. 4.10).

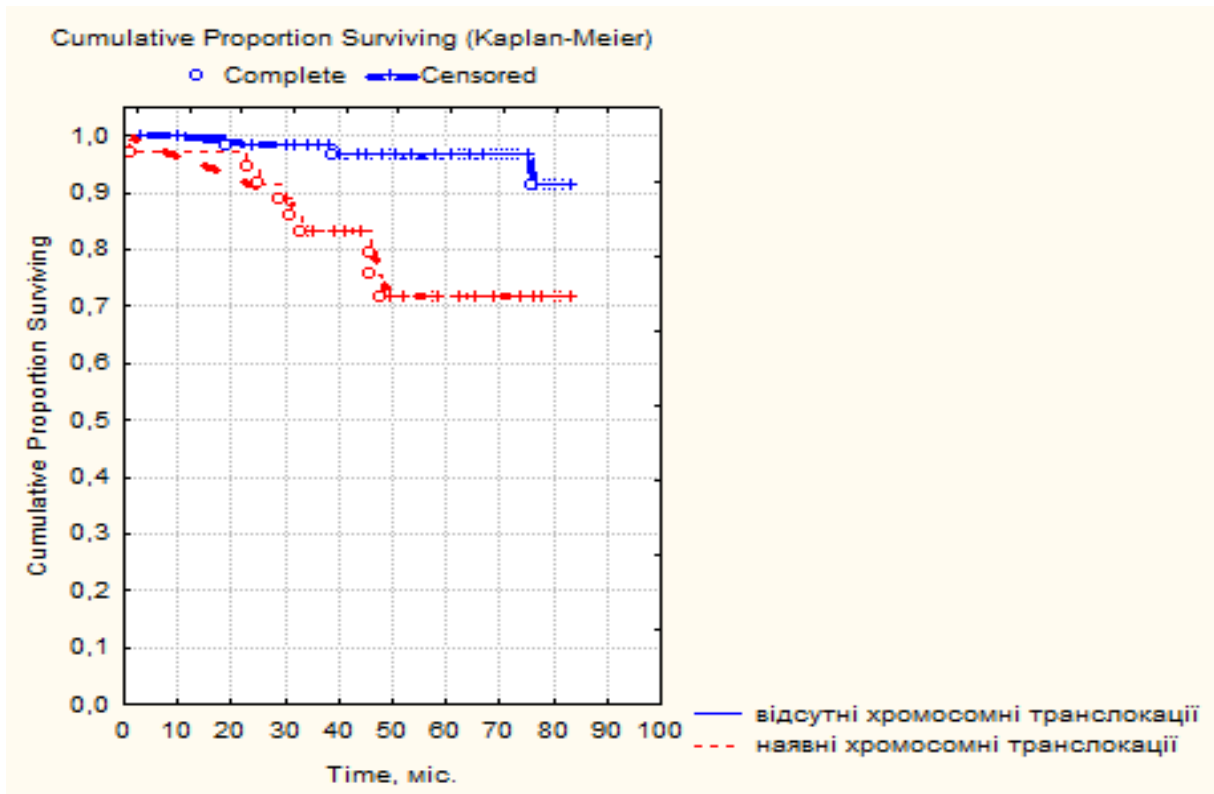


Рис. 4.10 Безрецидивне виживання хворих на ГЛЛ залежно від наявності хромосомних змін

Аналіз результатів показав, що виживання пацієнтів, у геномі яких відсутні хромосомні транслокації, перебуває на рівні 92 % протягом 6 років спостереження. Водночас безрецидивне виживання пацієнтів із виявленими хромосомними транслокаціями дорівнює 82 % протягом 3-4 років спостереження та знижується до 71 % у ході віддалення від терміну лікування (від 4-х років і вище) (рис. 4.10).

Встановлений факт може бути зумовлений більшістю побічних ефектів хіміотерапії (мієлотоксичність, мукозити, алопеція тощо).

Для розуміння ролі конкретних геномних транслокацій у летальних випадках пацієнтів ми дослідили показник безрецидивного виживання цих хворих. Встановлено, що найнижче безрецидивне виживання (найвища летальність) спостерігається в пацієнтів, у яких виявили транслокацію *BCR/ABL* t(9;22)(q34;q11), бо через 2 роки після хіміотерапії зафіксована смертність хворих (рис. 4.11).

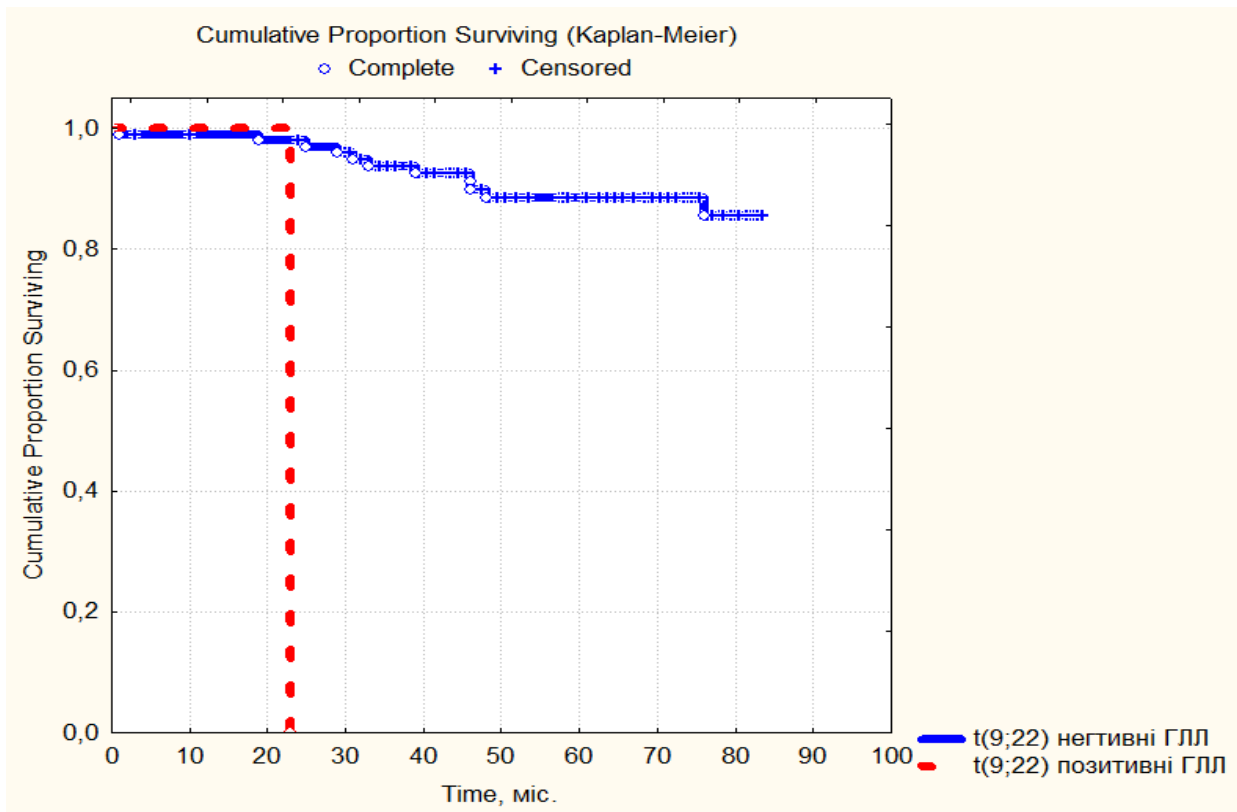


Рис. 4.11 Безрецидивне виживання хворих на ГЛЛ залежно від наявності в геномі транслокації *BCR/ABL* $t(9;22)(q34;q11)$

На другому місці за найнижчим виживанням були пацієнти з виявленим химерним геном *AF4/MLL* $t(4;11)(q23;p23)$, у яких смертність зафіксована на 5-му році життя після проведення курсу хіміотерапії (рис. 4.12), що, очевидно, зумовлено змінами молекулярних процесів, які відбуваються в здорових клітинах після хіміотерапії.

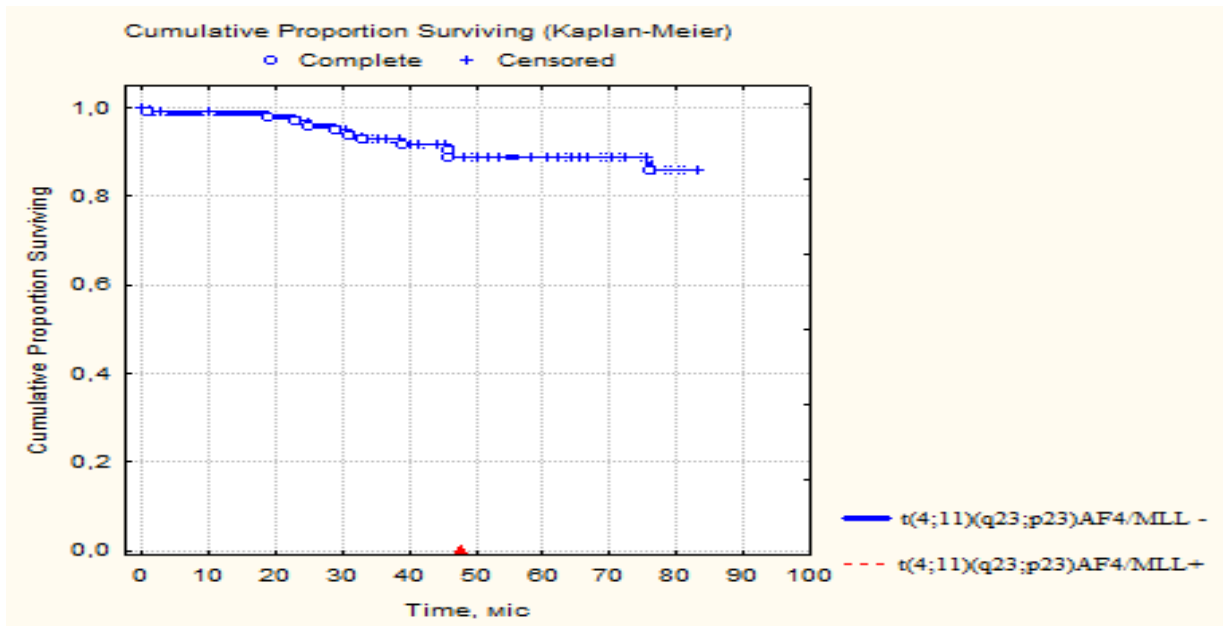


Рис. 4.12 Безрецидивне виживання хворих на ГЛЛ залежно від наявності в геномі транслокації *AF4/MLL t(4;11)(q23;p23)*

Найвищий показник безрецидивного виживання спостерігається в пацієнтів із наявною в геномі транслокацією *TEL/AML t(12;21)(q13;q22)*, у яких виявлено 100 % виживання та в пацієнтів із виявленим химерним геном *E2A/PBX1 t(1;19)(q23;p13)*, у яких безрецидивне виживання перебувало на рівні 80 % (рис. 4.13 і рис. 4.14).

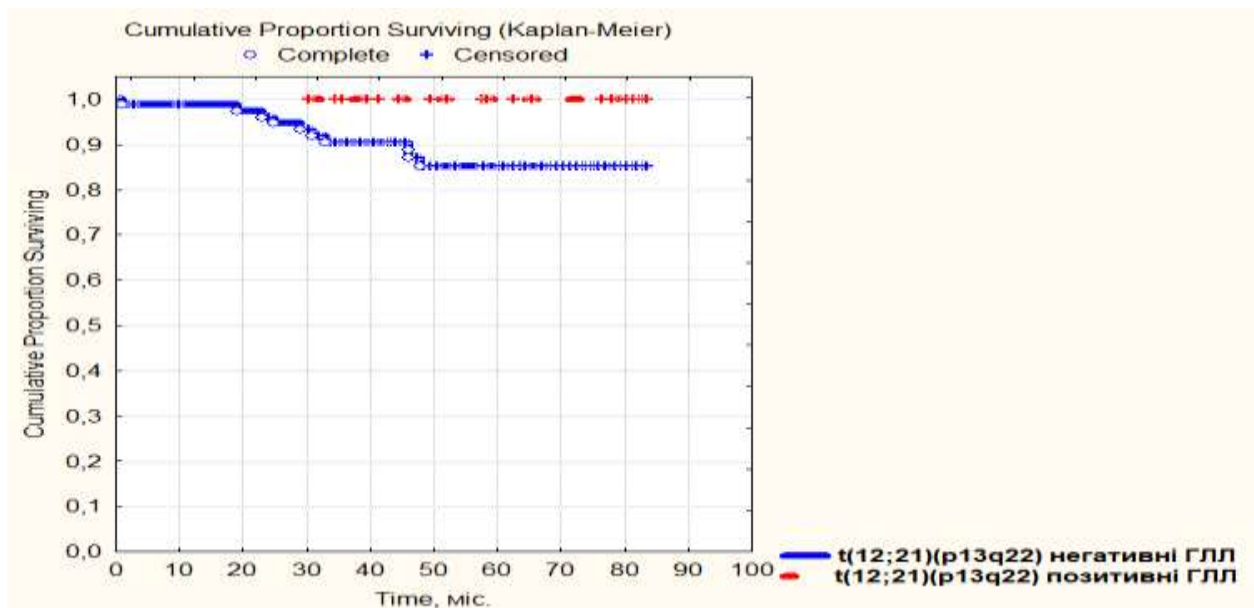


Рис. 4.13 Безрецидивне виживання хворих на ГЛЛ залежно від наявності в геномі транслокації *TEL/AML t(12;21)(q13;q22)*

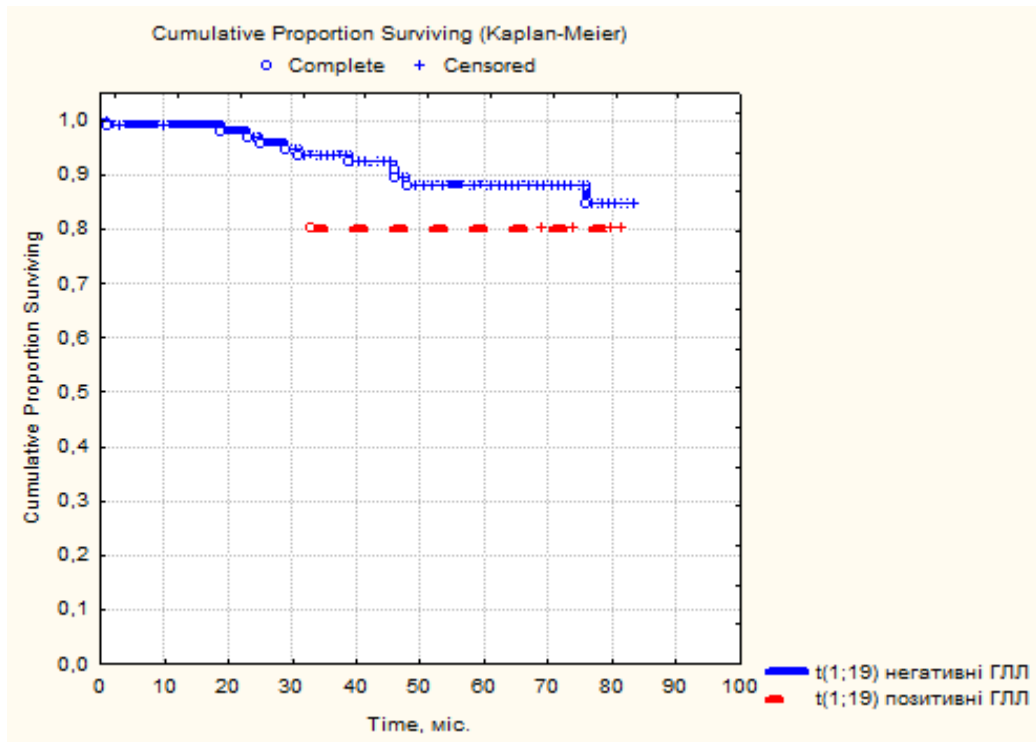


Рис. 4.14 Безрецидивне виживання хворих на ГЛЛ залежно від наявності в геномі транслокації *E2A/PBX1* t(1;19)(q23;p13)

Окрім того, низьке безрецидивне виживання спостерігається в пацієнтів із наявністю потрійного сигналу на хромосомі 17, яке перебуває на рівні 80 % протягом 2-х років спостереження та знижується до нуля протягом 5 років спостереження (рис. 4.15).

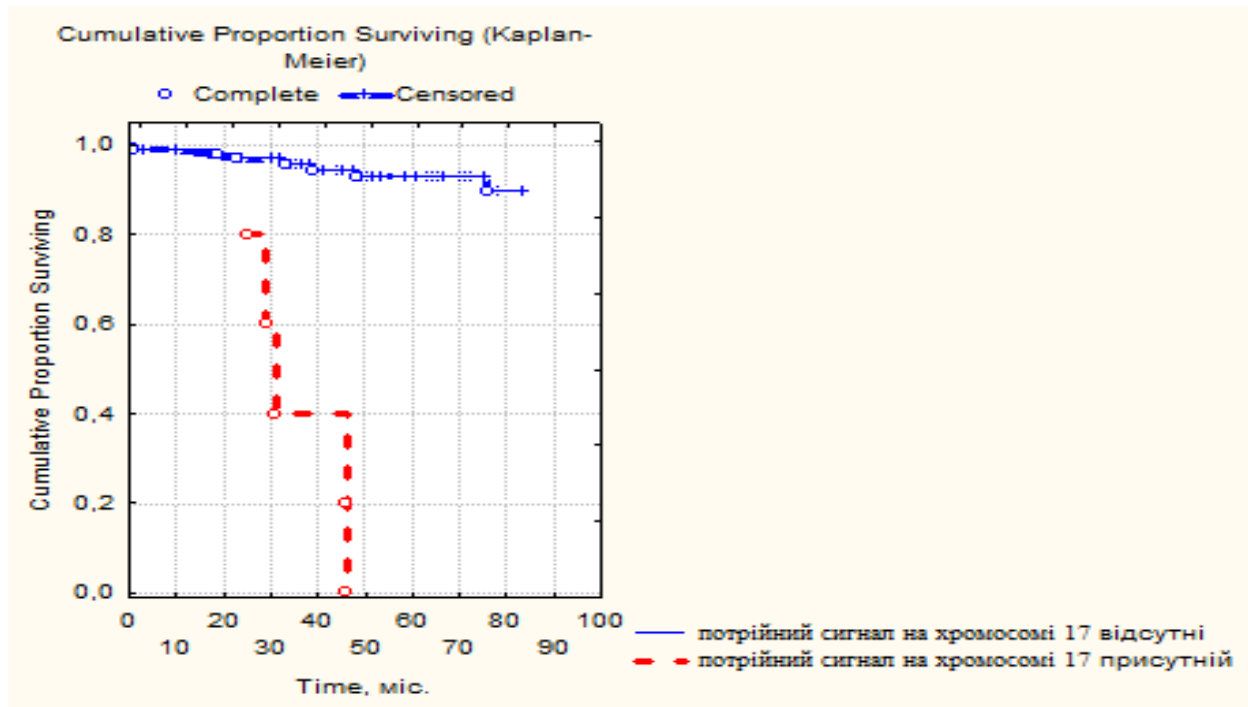


Рис. 4.15 Безрецидивне виживання залежно від наявності потрійного сигналу на хромосомі 17

Безрецидивне виживання пацієнтів, у яких виявили зміни на хромосомі 21 становить 50 % (рис. 4.16).

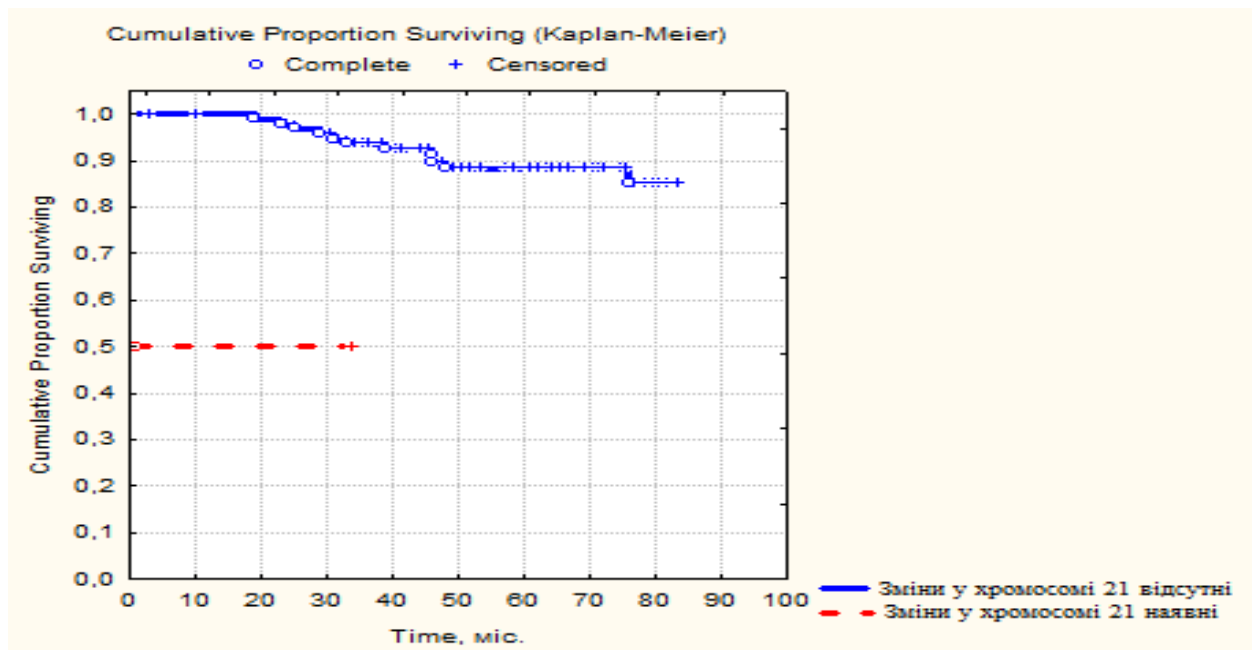


Рис. 4.16 Безрецидивне виживання залежно від наявності змін на хромосомі 21

Висновки до розділу:

Встановлені результати вказують, що найвищою групою ризику є хворі ГЛЛ, у яких у геномі виявляються *AF4/MLL* та *BCR/ABL* химерні гени.

Це необхідно враховувати під час проведення цитостатичної терапії та подальшого моніторингу пацієнтів. Окрім того, низьке безрецидивне виживання спостерігається в пацієнтів із наявністю потрійного сигналу на хромосомі 17, яке перебуває на рівні 80 % протягом 2-х років спостереження та знижується до нуля протягом 5 років спостереження (рис. 4.15).

Безрецидивне виживання є одним з основних критеріїв в оцінці результатів проведеного комплексного лікування хворих на ГЛЛ і безпосередньо залежить від наявності чи відсутності хромосомних аберацій у пацієнтів, що необхідно враховувати при розвитку лейкемічного клону в організмі.

Матеріали даного розділу опубліковані у статтях:

1. Винницька О. А., Дубей Л. Я. Експресія химерних генів у клітинах кісткового мозку дітей з гострою лімфобластною лейкемією за умов застосування цитостатичної терапії. Винницька О. А., Дубей Л. Я. *Biopolymers and Cell*. 2022; Vol; 38(1): 17-25. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A704>.

2. Винницька О. А. Молекулярно-генетичні механізми розвитку гострої лімфобластної лейкемії у дітей та їх корекція ALLIC BFM 2009 цитостатичною терапією. *World Science*. 2021; 1(62): 10-18. DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws

3. Винницька О. А., Дубей Л. Я., Дубей Н. В., Дорош О. І. Роль молекулярно-генетичних транслокацій у первинній відповіді на лікування дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію, за програмою ALLIC BFM 2009. *Вісник проблем біології і медицини. Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021; Т.6 (3): 162-169. DOI: 10.26693/jmbs06.03.162.

4. Винницька О. А., Дубей Л. Я., Дубей Н. В., Дорош О. І. Взаємозв'язок генетичних відхилень з лабораторними показниками периферичної крові та кісткового мозку в дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію.

Буковинський медичний вісник. Український науково-практичний журнал. 2021; Т. 25; 1(97):11-18..

7. Винницька О.А. Прогнозування окремих клінічних і лабораторних показників лімфобластної лейкемії у дітей, що отримали цитостатичну терапію ALLIC BFM 2009. *Клінічна Онкологія* .2021; Т.11№1-2:33-40. (Здобувачу належить проведення аналізу науково-фахової літератури, опрацювання та узагальнення отриманих даних, формулювання основних висновків роботи та написання статті).

УЗАГАЛЬНЕННЯ Й ОБГОВОРЕННЯ

Онкогематологічні захворювання в дітей характеризуються складністю диференційної діагностики та різноманітністю клінічного перебігу, що вимагає комплексних підходів до їх лікування. Врахування мультифакторного характеру низки прогностичних чинників у межах однієї нозологічної групи необхідне під час раціонального вибору оптимальної схеми цитостатичної терапії при ГЛЛ у дітей. Неконтрольоване розмноження лімфобластних клітин, утворених внаслідок активації протоонкогена в клітинах-попередниках гемопоезу, призводить до росту пухлинного клону та поширення трансформованих клітин по всьому організму. Тому визначення рівня бластних клітин у КМ має важливе значення для моніторингу онкохворих під час застосування цитостатичної хіміотерапії і як прогностичні маркери виявлення ймовірності рецидивів захворювання.

Так, необхідність у визначенні нових чинників, що можуть впливати на прогноз перебігу ГЛЛ, підтверджується позитивними результатами дослідження Okuku P et al., у якому комплексна математична оцінка 14 прогностичних факторів із 81 % -ою точністю стратифікувала пацієнтів із ГЛЛ на прогностичні групи [90]. Водночас комбінація двох методів стратифікації ризику (стратифікації NCI і методу визначення числа копій генів), за дослідженням A. V. Moorman et al., дозволила підвищити п'ятирічне виживання дітей внаслідок деінтенсифікації терапії в певних групах дітей [76]. На думку дослідників, застосування комплексного підходу дозволило точніше диференціювати пацієнтів із високим і низьким ризиком рецидиву. Учені зазначають, що в пацієнтів із кращим цитогенетичним профілем рецидив траплявся значно рідше (у 4 % випадків), ніж в осіб із гіршими цитогенетичними характеристиками (у 17 % випадків) [90].

Наявність мінімальної залишкової хвороби (MRD) на 4–5 тиждень від початку лікування є вагомим незалежним прогностичним маркером

неуспішності протоколу терапії та високої імовірності рецидиву [68, 73]. Наразі існує багато доказів щодо використання наявності MRD як основного прогностичного маркера при застосуванні різних протоколів лікування [69-74]. Так, інтенсифікація терапії в дітей стандартного та проміжного ризику, у яких виявили MRD, значно покращує подальший прогноз [8]. Головним недоліком цього прогностичного показника є те, що він може застосовуватись лише за декілька тижнів після початку імовірно неправильного лікування [85, 86].

Застосовуючи прогностичну класифікацію на основі , дослідники R. Pieters et al. (American Society of Clinical Oncology, США) досягли покращення п'ятирічного виживання дітей із стандартним і проміжним прогнозом ГЛЛ з 76 % до 88 % за допомогою інтенсифікації терапії [93]. У пацієнтів із високим ризиком за допомогою інтенсифікації хіміотерапії й трансплантації стовбурових клітин п'ятирічне виживання збільшилось від історичних 16 % до 78 % [88]. Однак у дітей із MRD у межах 0–5 %, необхідні інші додаткові стратифікаційні методи для точнішого прогнозування, бо такий діапазон MRD не має достатньої прогностичної сили [92]. Вирішення цієї проблеми може полягати в комплексному застосуванні цитогенетичної класифікації дітей із дослідженням мутаційного статусу і виявленні наявності MRD у процесі лікування. Таким чином, виділили межі MRD від 0,01 % до 0,1 % у пацієнтів із цитогенетично хорошим ризиком, при яких пацієнти не потребують інтенсифікації терапії й добре реагують на стандартний протокол лікування. Дані підтверджує й інше дослідження L. M. Vrooman et al., у якому завдяки поглибленій стратифікації дітей, хворих на ГЛЛ, на нові прогностичні групи із застосуванням нових інтервалів MRD відповідно до кожної цитогенетичної прогностичної групи, змогли покращити результати терапії [131-132].

У дослідженні R. Sutton et al. була запропонована нова комбінована система стратифікації прогнозу рецидиву ГЛЛ у дітей зі стандартним та проміжним ризиком неуспішності терапії згідно зі стандартною класифікацією NCI [121]. Ця нова схема включає в себе показники наявності делеції гена IKZF1, злиття генів P2RY8-CRLF2, віку, кількості лейкоцитів крові, наявності

МЗХ на 33 день терапії. Схема дозволяє виділити три прогностичні групи: ризик 0, ризик 1, ризик 2+, зі статистично різними показниками безрецидивного виживання і загального виживання 93 %, 78 %, 49 % і 99 %, 91 %, 71 % відповідно.

У дослідженні J. Wang et al. у групах дорослих і дітей було ідентифіковано 6 генів лімфобластів, гіперекспресія яких асоційована з прогнозом лікування й рецидивування ГЛЛ [136]. Гіперекспресія генів CAMSAP1, PCGF6, SH3RF3 позитивно корелювала з ефективністю стандартної терапії ГЛЛ, а гіперекспресія генів AK022211, FASTKD1, STARD4 була асоційована з негативними результатами терапії в дослідженні [87]. Учені запропонували класифікацію пацієнтів із прогнозовано позитивним і негативним результатами лікування залежно від кількості гіперекспресованих у пацієнта «позитивних» і «негативних». А саме: 1) пацієнти з одним негативним геном і менше двох позитивних генів і хворі з двома або більше негативними генами незалежно від кількості позитивних склали групу високого ризику неуспішності лікування; 2) особи з одним або менше негативними генами і двома або більше позитивними генами – групу низького ризику неуспішності терапії. Цікаво, що ця методика стратифікації пацієнтів показала свою ефективність у поєднанні з цитогенетичною стратифікацією, наявністю MRD і гіперекспресією гена CRLF2, поглиблюючи їхню прогностичну цінність [87].

Важливу роль у прогнозуванні перебігу захворювання та реакції на лікування відіграє цитогенетичне дослідження. Наприклад, наявність у дітей із раннім Пре-В ГЛЛ t(12; 21) свідчить про сприятливий прогноз. За наявності t(9; 22) прогноз є гіршим. У 10 % хворих на ГЛЛ відзначаються делеції та транслокації із залученням хромосоми 9p, часто спостерігається гіперлейкоцитоз, збільшення лімфовузлів середостіння. Діти з Т-клітинним імунофенотипом мають високий ризик рецидиву [51, 122].

Цитогенетичні та молекулярні маркери є незалежними прогностичними факторами ГЛЛ у дітей та дорослих. У зв'язку з цим, у хворих на ГЛЛ цитогенетичний і молекулярний аналізи є обов'язковим компонентом

первинних діагностичних заходів [141]. У 25-30 % випадків В-ГЛ у дітей [127] та в 2-10 % у дорослих спостерігається гіперплоїдія [143], при якій у ядрах лейкозних клітин міститься 51–67 хромосом замість 46, за нормою. При Т-ГЛ гіперплоїдія трапляється вкрай рідко. Цікаво, що розподіл додаткових хромосом при гіперплоїдії не є випадковим. Гіперплоїдія при ГЛЛ у дітей – фактор сприятливого прогнозу. Повні ремісії досягаються в усіх хворих, 5-річне безподійне виживання становить 71-83 %, а 5-річне загальне виживання досягає 90 % [130].

Дослідження цитогенетичних показників у пацієнтів із ГЛЛ із урахуванням лінійного походження та ступеня диференціювання клітин лейкоемічного клону є одним із критеріїв сучасної діагностики та ефективності терапії досліджуваної патології [53, 61, 66]. Визначення імунофенотипових, молекулярно-генетичних та цитохімічних особливостей патологічних клітин при ГЛЛ є важливим для прогнозу захворювання, а в перспективі – для диференційованого підходу до лікування дитячої когорти хворих [48, 62].

Із проаналізованих результатів нашого дослідження видно, що частота захворюваності на ГЛЛ найбільше виражена в дітей віком від 3 до 6 років – 37 осіб (35,2 %) та віком від 6 до 9 років – 26 осіб (24,8 %). Один із діагностичних критеріїв виявлення ГЛЛ – різке підвищення бластних клітин у кістковому мозку та крові. Так, з огляду на коефіцієнт кореляції Пірсона встановлено високий ступінь взаємозв'язку рівня бластних клітин між кістковим мозком та кров'ю, бо коефіцієнт кореляції рівний 0,87. Підвищена кількість бластних клітин свідчить також про прогресування ГЛЛ під час відновлення і / або появи нового лейкоемічного клону.

Діагностика гострого лейкозу полягає у визначенні його лінійної спрямованості (Т- або В-лімфобластний, міелоїдний), встановленні імунологічного варіанту ГЛЛ та визначенні лейкозасоційованого імунофенотипу [117], необхідного для подальшого моніторингу мінімальної залишкової хвороби.

В-лінійний ГЛЛ діагностується в тому випадку, коли пухлинні бласти експресують CD19, CD79a, CD22. При цьому вони також можуть експресувати інші В-лінійні маркери, такі як CD10, CD20, мембранні або цитоплазматичні легкі або важкі ланцюги імуноглобулінів. Для постановки діагнозу достатньою є наявність експресії одного з лінійно-специфічних маркерів, якщо відсутні специфічні маркери інших ліній. При В-лінійних ГЛЛ можлива коекспресія будь-яких мієлоїдних антигенів (CD13, CD33, CD15, CD65, CD117) та їх поєднання, що не скасовує діагнозу В-лінійного ГЛЛ. Також для В-лінійних ГЛЛ ступінь зрілості визначається за наявністю CD10, а також мембранних та цитоплазматичних легких і важких ланцюгів імуноглобулінів. Інші маркери, такі як CD20, CD34, CD58, мають лише допоміжне значення та не є основою для постановки діагнозу [148].

Варіанти VI, VII та VIII належать до ГЛЛ із В-лінійних попередників (ВП-ГЛЛ). Згідно з рекомендаціями EGIL-95 ВП ГЛЛ залежно від наявності або відсутності на поверхні пухлинних клітин специфічних маркерів поділяються на 3 підтипи: Про-В-ГЛЛ, Common В-ГЛЛ і Пре-В-ГЛЛ [27, 44].

Діагностика Т-лінійного диференціювання заснована на позитивній реакції з антигеном суцCD3 більш ніж у 20 % бластних клітин. Т-лінійний ГЛЛ діагностується в тому випадку, якщо бласти експресують CD7, а також цитоплазматичний CD3. Ці клітини також можуть експресувати CD2, CD5, CD3, CD1a Т-клітинні рецептори. Також при Т-ГЛЛ можуть експресуватися В-лінійні маркери, такі як іCD79a та CD10, проте не CD19 або CD22. При Т-лінійних ГЛЛ ступінь зрілості визначається за наявністю CD2, CD5, CD1a, CD4 або CD8, мембранного CD3, а також Т-клітинних рецепторів (ТКР). Експресія CD3 на поверхні клітин наявна вже на ранніх стадіях зрілості, а не тільки на стадії TIV. Експресія CD1a, незалежно від інших маркерів, дозволяє поставити діагноз ТШ-ГЛ.

При ГЛЛ із ранніх Т-лінійних попередників бласти експресують CD3 внутрішньоклітинно, також для них характерні низька (менше 75 %) експресія

CD5, відсутність експресії CD1a та CD8, експресія хоча б одного з мієлоїдних антигенів (CD13, CD33, CD11b, CD117) або маркерів клітин-попередників [58].

Для діагностики В-клітинного компонента, на противагу наведеним раніше критеріям мієлоїдного та Т-лімфоїдного диференціювання, виявлення одного маркера вважається недостатнім. В-лінійна природа бластних клітин може бути визначена тільки при наявності кількох популяцій пухлинних клітин, одна з яких повністю відповідає критеріям В-ГЛЛ. При виявленні однієї популяції бластних клітин підтвердженням їх В-клітинної природи є яскрава експресія антигену CD19 в поєднанні з експресією принаймні одного з антигенів – CD10, CD79a, CD22 – або слабка експресія CD19 в поєднанні з яскравою експресією як мінімум двох із зазначених вище маркерів. Гострий лейкоз зі змішаним фенотипом діагностують у тих випадках, коли бластні клітини експресують одночасно специфічні маркери мієлоїдної та однієї з лімфоїдних ліній або визначаються 2 пухлинні популяції з різною лінійною належністю. Імунофенотип ГЛ визначається, коли популяцію бластів можна чітко відрізнити від нормальних клітин, незалежно від численного порогового вмісту бластів. Враховуються фенотипово-абераційні популяції, що дають підставу припускати ГЛЛ, навіть у випадках, коли відсоток бластів занадто малий для формальної постановки діагнозу лейкозу [72, 100].

У нашому дослідженні оцінка лінійності лімфобластів та дослідження антигенної структури лейкемічних клітин у хворих дітей показала, що в 90 (85,7 %) дітей діагностовано В-лінійну ГЛЛ, а у 15 (14,3 %) – Т-лінійну ГЛЛ. Аналізуючи хворих із В-лінійною ГЛЛ, у 65 (61,9 %) пацієнтів виявлено тільки В-клітинні антигени, у 6 (5,7 %) – В+Т-антигени, у 19 (18,1 %) – В+Му-антигени.

Заслуговує уваги й інший погляд, за яким лейкози потрібно ділити тільки на ГМЛ, Т- і В-лінійні ГЛ без подальшого диференціювання за стадіями [125]. Неоднозначність критеріїв інтерпретації даних ІФТ у поєднанні з гетерогенністю імунофенотипового профілю бластних клітин при ГЛЛ в одного пацієнта може істотно ускладнювати підсумкову оцінку результатів різних

досліджень (морфологія, цитохімія, ІФТ тощо). Це означає, що ІФТ призначене не тільки для визначення лінійної належності бластів, проте повинні бути застосовані подальші зусилля для визначення прогностичного значення пухлинного фенотипу.

Генні трансформації часто лежать в основі розвитку ГЛЛ. Вони можуть бути первинними – однакові в усіх лімфобластних клітинах хворої дитини (хромосомні трансформації), і вторинними – можуть бути різними в різних клонів лімфобластної клітини (варіації числа копій генів, точкові мутації) [55, 56, 60]. Первинні генні трансформації, такі, як: хромосомні транслокації й анеуплоїдія, ініціюють утворення пре-лейкемічного клону, який за умови набуття певних вторинних трансформацій і може стати причиною ГЛЛ [33, 63]. Первинні генні трансформації визначають приблизно в 75 % всіх випадків ГЛЛ [64]. Цікаво, що пре-лейкемічні клони можуть знаходитись у латентному стані до 10 років і лише при набутті вторинної трансформації можуть ініціювати ГЛЛ [39]. Частота наявності хоча б однієї вторинної генної трансформації в пацієнтів із ГЛЛ коливається в межах 66–83 % [30, 32, 50]. Важливо, що залежно від наявності певної первинної мутації можна прогнозувати виникнення конкретних вторинних.

Нами встановлено, що до неконтрольованого поділу попередників лімфоцитів та розвитку новоутворення у вигляді Т- та В-лінійної ГЛЛ призводять хромосомні аберації, виявлені в недиференційованих бластних клітинах. Отримані в роботі дані, що стосуються транслокацій генів при ГЛЛ у дітей, показали наступне. У геномі дітей, хворих на ГЛЛ, ідентифікуються хромосомні транслокації у вигляді химерних онкогенів – *AF4/MLL* t(4;11)(q23;p23), *BCR/ABL* t(9;22)(q34;q11), *E2A/PBX1* t(1;19)(q23;p13), *TEL/AML* t(12;21)(q13;q22). За нашими даними, найвища частота хромосомних аберацій виявлена для онкогена *TEL/AML*, який встановлено у 24 % пацієнтів із ГЛЛ, найнижча – для онкогена *AF4/MLL*, який виявляється в 1 % пацієнтів. Найбільше підвищення рівня бластних клітин у кістковому мозку, яке вище 95 %, простежуємо при хромосомних транслокаціях *BCR/ABL* t(9;22) та

E2A/PBX1 t(1;19). Водночас рівень бластних клітин у кістковому мозку пацієнтів із транслокаціями *AF4/MLL* та *TEL/AML* перебуває на рівні $86 \pm 4,4 \%$ та $91 \pm 10,8 \%$ відповідно. Поряд із цим, зростає рівень бластних клітин у крові хворих.

Така особливість у клінічних проявах захворювання може відобразитися змінами в аналізі крові [110]. За отриманими власними результатами встановлено, що у хворих на ГЛЛ спостерігається ініціальний лейкоцитоз, найбільше виражений у пацієнтів із *BCR/ABL* та *E2A/PBX1* хромосомними абераціями. У групі хворих із хромосомними абераціями *AF4/MLL* та *TEL/AML* рівень лейкоцитів до лікування знижений порівняно з групою пацієнтів без аберацій. На фоні змін рівня лейкоцитів до лікування, у всіх пацієнтів рівень гемоглобіну перебував нижче норми, однак у пацієнтів із *BCR/ABL* та *TEL/AML* химерними генами його рівень найнижчий. Зниження рівня гемоглобіну свідчить про розвиток анемії в усіх досліджуваних групах із геномними порушеннями. Найбільш виражену анемію простежуємо в пацієнтів із транслокаціями *BCR/ABL* та *TEL/AML*, що свідчить про порушення роботи кісткового мозку.

Базовими принципами сучасного лікування гострих лімфобластних лейкозів є програмність та ризик-адаптованість терапії. Програмність терапії означає суворе дотримання певних доз і комбінацій хіміопрепаратів у чітко встановлені терміни [29]. Під ризик-адаптованістю розуміють те, що інтенсивність терапії визначається групою ризику залежно від ймовірності розвитку рецидиву та/або токсичних ускладнень. Різні режими хіміотерапії розробляють кооперативні клінічні групи в рамках багатоцентрових досліджень: BFM-SG (Berlin-Frankfurt-Munster Study Group; Німеччина), COALL (Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia; Німеччина) [61], AIEOP (Italian Pediatric Hematology Oncology Association; Італія), ALL IC-BFM 2009 [62]. Стратифікація (розподіл) пацієнтів на групи ризику ґрунтується на прогностичних факторах, які включають клініко-біологічні характеристики під час діагностики, а також параметри ранньої відповіді на терапію й терміни

виходу в ремісію [38]. Наприклад, приналежність бластних клітин до В-або Т-лінії диференціювання використовується як один із критеріїв, що визначають групу ризику при стратифікації лікування. Так, при використанні протоколу ALL-BFM-2009 наявність Т-імунофенотипу є показанням для віднесення пацієнта до групи середнього або високого ризику й проведення більш інтенсивної терапії. Стратифікація є дуже важливою при проведенні клінічних досліджень із погляду доказової медицини. За даними кооперативних досліджень, застосування програмного лікування в дітей із гострими лімфобластними лейкеміями дозволило досягти 70 % рівня 10-річної безпідійної виживаності. Удосконалення протоколів поліхіміотерапії збільшило цей показник до 86,4 % [64]. В Україні проведення протокольного лікування гострих лімфобластних лейкозів у дітей також базується на впровадженні протоколу ALL IC-BFM 2009. Основна стратегічна лінія даного протоколу – швидка редукція популяції лейкемічних клітин для попередження стійкості до хіміотерапії. За нашими даними, встановлено, що застосування цитостатичної терапії ALLIC BFM 2009 у 88,23 % пацієнтів призводить до повної ремісії, а в 11,76 % дітей виявлений рецидив захворювання. В основі виникнення рецидивів лежить персистенція залишкових лейкемічних клітин або мінімальна залишкова хвороба (MRD), тому підвищення вмісту залишкових пухлинних клітин у пацієнтів із хромосомними абераціями *BCR/ABL* та *TEL/AML* може служити одним із надійних критеріїв раннього виявлення рецидивів у хворих із ГЛЛ. Як показують результати наших досліджень, ризик розвитку рецидиву вищий у тих хворих, у яких після завершення цитостатичної терапії рівень MRD складав 1 % і більше, порівняно з пацієнтами, чий рівень MRD був менше 1 % – у цієї групи пацієнтів спостерігалася повна ремісія. Слід зауважити, що ремісія наявна в усіх пацієнтів із Т-лінійною ГЛЛ, тоді як у пацієнтів із В-лінійною ГЛЛ простежуємо як ремісію (у переважній більшості пацієнтів), так і рецидиви.

Повною ремісією вважають відсутність клінічних проявів захворювання при нормоклітинному кістковому мозку з кількістю бластних клітин менше 5 % та нормальних показниках спинномозкової рідини [2].

При ремісії ГЛЛ на тлі зниження відсоткового й абсолютного вмісту лімфоцитів периферійної крові знижується відносна й абсолютна кількість Т-лімфоцитів, абсолютний рівень NK-клітин, В-лімфоцитів та лімфоїдних клітин, що експресують маркер HLA-DR [65, 66]. Зниження кількості Т-лімфоцитів у хворих на цій стадії захворювання відбувається внаслідок вираженого зниження у відсотковому й абсолютному значеннях вмісту CD4+ та цитотоксичних Т-лімфоцитів. Підвищення величин лейке-Т і лейке-В клітинних коефіцієнтів відображає відповідне зниження часток Т- і В-лімфоцитів у цілісній фракції лейкоцитів крові. Подібне зниження реактивності клітинного імунітету, мабуть, визначається тим, що хворі на гостру лейкемію мають послідовну схему лікування і, як правило, для підтримки ремісії потрапляють у стаціонар тоді, коли ще не відновилися зміни від проведеної раніше хіміотерапії. Єдиним показником імунного статусу, величина якого відновлюється при ремісії ГЛЛ, є імунорегуляторний індекс.

Після закінчення курсу цитостатичної терапії за умов повної ремісії рівень бластів у кістковому мозку становив $1,03 \pm 0,2$ %, що свідчить про сприятливий перебіг захворювання та задовільний стан кровотворної тканини. При цьому в периферійній крові виявлено нормальне співвідношення всіх паростків кровотворення, при кількості еритроцитів більше $3,5 \times 10^{12}$ клітин/л, при кількості тромбоцитів більше 160×10^9 клітин/л, при кількості лейкоцитів менше 10×10^9 клітин/л та при відсутності екстремедулярних вогнищ лейкемічного росту.

Про рецидив захворювання свідчить підвищений рівень бластних клітин у кістковому мозку, бо відбувається активна проліферація бластів, очевидно, в результаті порушення міжклітинної сигналізації або здатності клітин уникати апоптичної загибелі, що може бути наслідком резистентності пухлинного клону до дії цитостатиків. Такі властивості пухлинних клітин можуть бути пов'язані з

антигенним складом на їх поверхні [86]. Рецидивом вважають стан, коли є повернення активної стадії захворювання після повної ремісії та однієї з наступних ознак: кількість бластів у кістковому мозку більше 20 %; наявність екстрamedулярних осередків ураження (ЦНС, статеві залози та ін.) при вмісті бластних клітин у кістковому мозку менше 5 %; наявність 5 та більше лейкоцитних клітин в 1 мкл ліквору. Рецидив захворювання може мати різну локалізацію: ізольований кістково-мозковий, екстрamedулярний із ураженням ЦНС, статевих залоз, шкіри, орбіти, мигдаликів та ін. Можливі також і комбіновані рецидиви [47].

Дослідження антигенного складу бластних клітин після проведення ALLIC-BFM 2009 цитостатичної терапії показало, що найвищий рівень експресії виявлений для лінійно-незалежних та В-лінійних антигенів бластних клітин, бо аналіз імунофенотипу лінійно-незалежних лімфобластів показав експресію HLA – $(93 \pm 8,4)$ %, Anti-TdT – $(91 \pm 7,1)$ %, CD10 – $(78 \pm 7,2)$ %, CD38 – $(91 \pm 7,9)$ % та CD34 – $(57 \pm 4,3)$ % у пацієнтів у період рецидиву.

У пацієнтів із повною ремісією знижується експресія CD34 до $(21 \pm 1,9)$ %, TdT до $(22,5 \pm 2,8)$ % та експресія CD10 до $(26 \pm 3,1)$ %. Виявлений факт вказує, що під час ремісії в кістковому мозку відновлюються процеси диференціації та дозрівання бластних клітин. Низький рівень експресії CD45 при рецидивах $(28 \pm 2,1)$ % та високий – при ремісії $(89 \pm 7,6)$ % свідчать про наявність клітин на ранніх та пізніх стадіях дозрівання в досліджуваних групах відповідно, бо експресія CD45 спостерігається на ранній стадії диференціювання та збільшується під час дозрівання клітин.

Серед В-лінійних антигенів висока експресія виявлена для антигена CD19 – $(98 \pm 9,3)$ %, а також для антигенів: CD22 – $(78 \pm 8,3)$ %, CD58 – $(87 \pm 7,6)$ %. Нижчий рівень експресії спостерігався для CD79a – $(58 \pm 6,4)$ %.

Експресований CD19 на мембранах бластів у пацієнтів із рецидивами може стати мішенню для терапії пухлин лімфоїдного походження через його високий рівень експресії, що варто враховувати при виборі подальшої тактики лікування. Такі маркери, як CD19, CD79a і HLA-DR, позитивні протягом усіх

етапів диференціювання В-лімфоцитів, тому вони наявні в пацієнтів як із рецидивами, так і з ремісією [11,11,11].

Оскільки клітинний імунітет при первинній атаці ГЛЛ характеризується зниженням концентрації Т-клітин та CD4+-лімфоцитів. Стан клітинного імунітету на стадії ремісії відзначається зниженням абсолютної кількості лейкоцитів, зниженням абсолютного й відносного вмісту Т-, CD4+, цитотоксичних лімфоцитів, NK-клітин, зниженням абсолютної кількості В-лімфоцитів та лімфоїдних клітин, експресуючих маркер HLA-DR [51].

Інші автори вказують, що стан клітинного імунітету у хворих на стадії первинної атаки ГЛЛ характеризується тільки підвищенням абсолютного вмісту лімфоцитів і зниженням концентрації Т-клітин. На стадії атаки ГЛЛ виявляється підвищення величини індексу активації Т-лімфоцитів та зниженням рівня імунорегуляторного індексу [28, 53]. Підвищення величини індексу активації Т-лімфоцитів у хворих не залежить від стадії захворювання й характеризує присутність у периферійній крові високого вмісту активованих Т-клітин. Водночас рівень лімфоцитів, що експресують маркер HLA-DR, є значущим тільки під час атаки та ремісії гострої лімфобластної лейкемії.

При рецидиві ГЛЛ стан клітинного імунітету характеризується зниженням абсолютної кількості лейкоцитів та лімфоцитів у крові, зниженням відносного й абсолютного вмісту Т-, CD4+, NK-клітин, зниженням абсолютної кількості цитотоксичних лімфоцитів та клітин, що експресують маркер HLA-DR.

При дослідженні стану гуморальної ланки імунітету виявлено, що на стадії першої атаки ГЛЛ відхилення від норми не є характерними. При ремісії захворювання виявлено зниження концентрації IgG в крові. Під час рецидиву знижуються концентрації IgA, IgM та IgG.

Ми встановили, що під час вибору тактики лікування та прогнозу хвороби виділення морфологічних типів лімфобластів суттєвої ролі не відіграє. Однак імунофенотипування бластних клітин після проведення курсу хіміотерапії ALLIC-BFM 2009 може мати важливе значення для виявлення ранніх рецидивів

захворювання, бо в пацієнтів із рецидивом захворювання за ступенем вираження трапляються імунофенотипові аберації, не властиві нормальним гемопоетичним клітинам. Асинхронна експресія маркерів диференціювання простежується у більшості дітей з рецидивом ГЛЛ, що необхідно враховувати при моніторингу хворих під час та після проведення цитостатичної хіміотерапії.

Після застосування цитостатичної терапії за схемою ALLIC BFM 2009 спостерігаються зміни в спектрі хромосомних транлокацій та експресії химерних генів, які можна пов'язати з розвитком рецидивів або настанням повної ремісії [115, 124]. Зокрема, проведенні наші дослідження свідчать, що під час ремісії ГЛЛ у дітей не експресується онкоген *AF4/MLL*, а експресія всіх інших досліджуваних онкогенів перебуває на низькому рівні. Водночас за умови рецидиву захворювання відсутня експресія онкогена *TEL/AML* та виявлена висока експресія химерного гена *BCR/ABL*. Під час встановлення діагнозу ГЛЛ та розвитку рецидивів у пацієнтів спостерігаємо найвищу експресію химерного гена *BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)*, то, очевидно, цей показник має найбільше прогностичне значення для виявлення ранніх рецидивів у пацієнтів після проведення курсу хіміотерапії. Так, химерний онкоген *BCR-ABL* кодує онкобілок *BCR-ABL*-тирозинкіназу, яка каталізує реакцію фосфорилування клітинних білків. При цьому змінюється інтенсивність процесів проліферації у клітинах лейкемічного клону, які переважають над процесами диференціювання. У результаті таких порушень бластні клітини витісняють пул нормальних гемопоетичних клітин у кістковому мозку. Контроль за мінімальною резидуальною хворобою дозволить виділити пацієнтів з найвищим ризиком розвитку раннього рецидиву ГЛЛ, притаманного пацієнтам із *BCR/ABL* та *TEL/AML* транслокаціями. Розуміння напрямку цитогенетичних змін при ГЛЛ дасть можливість стверджувати не тільки про ступінь злоякісності новоутворення, але й дозволить ідентифікувати несприятливий прогноз рецидивів в онкохворих після проведення курсу хіміотерапії, а також простежити відсоток безрецидивного виживання.

Перші 2 роки після операції є для пацієнта найбільш важливими й важкими щодо післялікувальної реабілітації або реалізації продовженого пухлинного росту. На основі дослідження безрецидивного виживання хворих на ГЛЛ як критерію віддалених результатів лікування встановили, що безрецидивне виживання залежить від наявності або відсутності хромосомних аберацій у пацієнтів. Для більшості хворих виявлений летальний результат за умови наявності *AF4/MLL* та *BCR/ABL* химерних генів, що характерно саме протягом двох-п'яти років після проведення хірургічного лікування. Окрім того, на низькому рівні перебуває безрецидивне виживання хворих за наявності потрійного сигналу на хромосомі 17 та змін на хромосомі 21. Із цього випливає, що для оцінки результатів лікування необхідно оцінювати виживання як один із найбільш значущих критеріїв.

Отже, встановлені взаємозв'язки між цитогенетичними та молекулярно-генетичними ознаками пухлинного клону допоможуть визначити ступінь злоякісності процесу, а також групу ризику щодо перебігу хвороби, розвитку рецидивів та виживання хворих. Встановлення залежності перебігу гострих лейкемій від молекулярно-генетичних транслокацій дасть можливість у подальшому виявляти ранні рецидиви та модифікувати програму лікування.

ВИСНОВКИ

- Дисертаційна робота містить теоретичне обґрунтування та практичне розв'язання актуального наукового завдання в педіатрії – удосконалення моніторингу перебігу ГЛЛ у дітей на підставі вивчення молекулярно-генетичних змін у клітинах крові, пов'язаних з хворобою.
- Застосування ALLIC-BFM 2009 терапії було ефективне у 88 % дітей з повною ремісією. При цьому безрецидивне виживання в загальній вибірці дітей складало 85 %, а безподійне виживання становило 78,7 % ($p < 0,05$). У 12 % дітей простежували часткову резистентність до хіміопрепаратів, що проявлялося рецидивом захворювання ($p < 0,05$).
- Незалежним несприятливим прогностичним фактором розвитку рецидиву після хімотерапії є MRD. Встановлено, що розвиток рецидиву вищий у тих дітей з ГЛЛ, у яких після завершення цитостатичної терапії рівень MRD на 15 день захворювання складав 1 % і більше, порівняно з пацієнтами, у яких показник MRD становив менше 1 % ($p < 0,05$).
- У дітей з рецидивом ГЛЛ простежуються імунофенотипові аберації, не властиві нормальним гемопоетичним клітинам. Так, бластні клітини у пацієнтів з рецидивом експресували лінійно-незалежні антигени HLA – 93 %, Anti-TdT – 91 %, CD10 – 78 %, CD38 – 91 % і CD34 – 57 % та B-лінійних антигенів – CD19, CD22, CD58, CD79a, серед яких найвища експресія виявлена для антигена CD19 ($p < 0,05$). Низький рівень експресії CD45 зафіксовано у 28 % дітей з рецидивом ГЛЛ та високий – у 89 % дітей при повній ремісії захворювання ($p < 0,05$).
- Найвища стійкість до хімотерапії спостерігається у дітей, хворих на ГЛЛ, у яких виявлено BCR/ABL1 та E2A/PBX1 молекулярно-генетичні транслокації. Меншою резистентністю до хімотерапії відзначались пацієнти з AF4/MLL та TEL/AML генетичними особливостями ($p < 0,05$).
- Несприятливим прогностичними маркерами виникнення рецидиву ГЛЛ у дітей є наявність онкогенів BCR/ABL та E2A/PBX1 ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розширення панелі імунофенотипового дослідження бластних клітин у дітей з ГЛЛ, а також ідентифікація імунофенотипових аберацій та асинхронної експресії маркерів диференціювання, які виявлені в більшості випадків рецидивів хвороби, дозволяє персоніфікувати цитостатичну хіміотерапію з метою попередження цих рецидивів.
2. MRD є незалежним прогностичним фактором розвитку рецидиву. Його кореляційний зв'язок з імунофенотиповим профілем ГЛЛ, доцільно враховувати під час розробки комплексної цитостатичної терапії.
3. Дітям з ГЛЛ, в яких виявлено *BCR/ABL1* та *E2A/PBX1* молекулярно-генетичні транслокації з високою стійкістю до хіміотерапії, пропонується до розгляду необхідність в інтенсифікації протипухлинної терапії. Отже, наявність даних локусів може служити предикторами несприятливого перебігу цього захворювання.
4. На початковому етапі обстеження усім пацієнтам з вперше виявленою лейкемією рекомендовано проводити цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку, що дозволить виділити групу пацієнтів зі складними порушеннями каріотипу, які потребують інтенсифікації терапії. Клонально генетичні порушення в пацієнтів з транслокаціями *BCR/ABL1*, *E2A/PBX1*, *AF4/MLL* і *TEL/AML* рекомендується використовувати як маркери пухлини при моніторингу відповіді на терапію.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Винницька ОА. Молекулярно-генетичні механізми розвитку гострої лімфобластної лейкемії у дітей та їх корекція ALLIC BFM 2009 цитостатичною терапією. *World Science*. 2021 Jan;1(62):10–18. DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws
2. Винницька ОА, Дубей ЛЯ, Дубей НВ, Дорош ОІ. Взаємозв'язок генетичних відхилень з лабораторними показниками периферичної крові та кісткового мозку в дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію. *Буковинський медичний вісник. Український науково-практичний журнал*. 2021;1 (97):11–18.
3. Винницька ОА, Дубей ЛЯ, Дубей НВ, Дорош ОІ. Роль молекулярно-генетичних транслокацій у первинній відповіді на лікування дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію, за програмою ALLIC BFM 2009. *Вісник проблем біології і медицини. Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021;3:17–22.
4. Винницька ОА, Дубей НВ, Дорош ОІ, Дубей ЛЯ. Перспективи розвитку дослідження мутаційного статусу в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями. *Український медичний часопис*. 2018; Т. 2-IX/X:5(127):1–4. <https://www.umj.com.ua/article/131015/perspektivi-rozvitku-doslidzhennya-mutatsijnogo-statusu-v-ditej-iz-gostrimi-limfoblastnimi-lejkemiyami>.
5. Глузман ДФ. Иммуноцитохимическая диагностика опухолей кровотворной и лимфоидной тканей у детей. Киев: ДИА. 2005; 216 с.
- 7 Дубова АВ, Митенкова АС. Аналіз причин пізньої діагностики гострого лейкозу у дітей. *Здоров'я дитини*. 2017;1(36):84–89.
- 8 Нагорная НВ, Вильчевская ЕВ, Марченко ЕН, Бордюгова ЕВ, Дудучак АП, Дубовая АВ, Митенкова АС. Анализ причин поздней диагностики острого лейкоза у детей. *Здоровье ребенка*. 2012;1 (36):84–89.
- 9 Руда ІВ, Мисько ЛВ, Юрчишена ЕВ, Юрчишен ОМ. Захворюваність дітей на лейкемії у Хмельницькій області. *Здоровье ребенка*. 2011;1(28): 84–85.

- 10 Ткаченко ИВ, Тесленко БВ, Рум'янців АГ. Комплексна реабілітація дітей з гострим лімфобластним лейкозом в стані тривалої ремісії. *Онкогематологія*. 2009;2:42–51.
- 11 Цурікова ОВ. Організаційно-економічне обґрунтування підходів до вдосконалення фармацевтичної допомоги хворим на гострі лейкози в умовах медичного страхування: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.01. Національний фармацевтичний університет. Харків; 2016. 26 с.
- 12 Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36:1720. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2.
- 13 Almanza-Huante E, Espinosa-Bautista K, Rangel-Patiño J, Demichelis-Gómez R. Comparison of two pediatric-inspired regimens to hyper-CVAD in Hispanic adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2021 Jan;21(1):55–62.e2. DOI: 10.1016/j.clml.2020.07.017
- 14 Alvarez EM, Malogolowkin M, Hoch JS, Li Q, Brunson A, Pollock BH, et al. Treatment Complications and Survival Among Children and Young Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia *JCO Oncol Pract*. 2020 Oct;16(10):e1120-e1133. doi: 10.1200/JOP.19.00572.
- 15 Alvarez E, Malogolowkin M, Pollock BH, Li Q, Johnston E, Marina N, et al. Impact of location of inpatient cancer care on patients with Ewing sarcoma and osteosarcoma-A population-based study. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 Jul;68(7):e28998. doi: 10.1002/pbc.28998.
- 16 Alvarez E, Spunt SL, Malogolowkin M, Li Q, Wun T, Brunson A, et al. Treatment at Specialized Cancer Centers Is Associated with Improved Survival in Adolescent and Young Adults with Soft Tissue Sarcoma. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2022 Aug;11(4):370-378. doi: 10.1089/jayao.2021.0110.
- 17 Amin MM, Kermani S, Talebi A, Oghli MG. Recognition of acute lymphoblastic leukemia cells in microscopic images using k-means clustering and support vector machine classifier. *J Med Signals Sens*. 2015;5(1):49–58. PMID: PMC4335145

- 18 Arber D, Orazi A, Hasserjian R. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391–2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- 19 Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka H-M. et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140:1200. doi: 10.1182/blood.2022015850.
- 20 Barbosa TC, Terra-Granado E, Magalhães IM. Q, Neves GR, Gadelh A, Filho GE. et al. Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. *Cancer Genet*. 2015;208(10):492–501. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.06.003
- 21 Bene MC, Castoldi G, Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9:1783–1786.
- 22 Biondi A, Conter V, Chandy M, Ewald P, de Martino Lee ML, Radhakrishnan VS. et al. Precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia-a global view. *Br J Haematol*. 2022 Feb;196(3):530–547. DOI: 10.1111/bjh.17959
- 23 Boer JM, Steeghs EM P, Marchante R. M, Boeree A, Beaudoin J, Beverloo HB. et al. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017;8 (3):4618–4628. DOI: 10.18632/oncotarget.13492
- 24 Brown P, Inaba H, Annesley C, Beck J, Colace S, Dallas M. et al Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 2. *NCCN* 2020;18(1) DOI: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0001>
- 25 Brown PA, Shah B, Fathi A, Wieduwilt M, Advani A, Aoun P. et al. NCCN guidelines insights: acute lymphoblastic leukemia, version 1. 2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15 (9):1091–1102. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0147
- 26 Carlos J, Gisela J-P, José G-A, Herrera-Garza L, Marfil-Rivera LJ, Gómez-Almaguer D. Revisiting the complete blood count and clinical findings at

- diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematol., Transfus. Cell Ther.* 2019;41(1):314-327
<https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.05.010>
- 27 Cernan M, Szotkowski T, Pikalova Z. Mixed-phenotype acute leukemia: state-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017. Sep;161(3):234–241. DOI: 10.5507/bp.2017.013
- 28 Chen L, Dai Y, Sun X, Li X, Wang Q, Daoxin M, Du D. et al. Aberrant expression of CD133 and CD82 in patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia and the clinical significance. *Oncol Lett.* 2017;14 (5):5811–5818. doi: 10.3892/ol.2017.6981
- 29 Cheng S, Pole JD, Sung L. Early deaths in pediatric acute leukemia: a population-based study. *Leuk Lymphoma.* 2014;55 (7):1518–1522. DOI: 10.3109/10428194.2013.850685
- 30 Clappier E, Grardel N, Bakkus M, Rapion J, De Moerloose B, Kastner P. et al. IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia.* 2015;29:2154–2161. DOI: 10.1038/leu.2015.134
- 31 Colunga-Pedraza PR, Colunga-Pedraza JE, Peña-Lozano SP, Gómez-De AL, Ruiz-Delgado GJ, Ribeirod RC. Diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in Latin America. *Hematology.* 2022;27(1):971-976, DOI: 10.1080/16078454.2022.2117119
- 32 Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2009;10(2):147–156. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70314-0
- 33 Dafflon C, Craig VJ, Méreau H, Gräsel J, Schacher Engstler B, Hoffman G. et al. Complementary activities of DOT1L and Menin inhibitors in MLL-rearranged

- leukemia. *Leukemia*. 2017;31(6):1269–1277.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.327>
- 34 de Smith AJ, Lavoie G, Walsh KM, Aujla S, Evans E, Hansen HM, et al. Predisposing germline mutations in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in children. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(10):723–730. DOI: 10.1002/gcc.22765
- 35 Demiröz AS, Demirkesen C., Salihoğlu A, Tüzüner N. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasia: a single center experience. *Turk J Haematol*. 2020;37(1):48–52. doi: 10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0195
- 36 Dworzak M., Buldini B., Gaipa G. et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytometry*. 2018;94(1):82–93. DOI: 10.1002/cyto.b.21518
- 37 Enshaei A, Schwab CJ, Konn ZJ, Mitchell CD, Kinsey SE, Wade R. et al. Long-term follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. *Leukemia*. 2013 Nov;27(11):2256–2259. DOI: 10.1038/leu.2013.136
- 38 Fang Q, Yuan T, Li Y, Feng J, Gong X, Li Q. et al. Prognostic significance of copy number alterations detected by multi-link probe amplification of multiple genes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*. 2018;15(4):5359–5367. DOI: 10.3892/ol.2018.7985
- 39 Fleury C, Passet M, Settegrana C, Simon L, Chapiro E, Trinquand A, et al. An unusual case of acute leukemia. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2017;75(3):339–347. DOI: 10.1684/abc.2017.1238
- 40 Gye A, Goodall S, De Abreu L. A systematic review of health technology assessments of chimeric antigen receptor T-cell therapies in young compared with older patients. *Value Health*. 2022;25(1):47–58. DOI: 10.1016/j.jval.2021.07.008
- 41 Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress *Haematologica* 2020;105(12)
<https://doi.org/10.3324/haematol.2019.245688>

- 42 Graux C, Stevens-Kroef M, Lafage M, Dastugue N, Harrison CJ, Mugneret F. et al. Heterogeneous patterns of amplification of the NUP214-ABL11 fusion gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009;23(1):125–133. DOI: 10.1038/leu.2008.278
- 43 Hakim H, Flynn PM, Knapp KM, Gaur AH. et al. Etiology and clinical course of febrile neutropenia in children with cancer. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2009;9:623–629. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181b1edc6
- 44 Hanley BP, Yebra-Fernandez E, Palanicawandar R, Olavarria E, Naresh KN et al. Lineage switch from acute myeloid leukemia to T cell/myeloid mixed phenotype acute leukemia: first report of an adult case. *Am J Hematol* 2018;93:E395–7. DOI: 10.1002/ajh.25283
- 45 Namjoshi NS, Keegan THM, Li QC, Chung JH, Rosenthal JL, Winestone LE et al. *Leuk Lymphoma*. 2022 Dec;63(13):3191-3199. doi: 10.1080/10428194.2022.2113533.
- 46 Harms DO, Janka-Shaub GE. Cooperative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia*. 2000;14(12):2234–2239. DOI: 10.1038/sj.leu.2401974
- 47 Heerema NA, Raimondi SC. Cytogenetics of acute leukemia. *Wiernik P. H., Dutcher J. P., Gertz M. A. eds. Neoplastic Diseases of the Blood*. 2018;23:281–306.
- 48 Hoelzer D. Personalized medicine in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(7):855–858. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.127837>
- 49 Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Engl J Med*. 2015;373:1541–1552. DOI: 10.1056/NEJMra1400972
- 50 Irving JA E, Enshaei A, Parker C, Sutton R, Kuiper RP, Erhorn A. et al. Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*. 2016;128(7):911–922. DOI: 10.1182/blood-2016-03-704973

- 51 Iwamoto S, Deguchi T, Ohta H, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Yamada T. et al. Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2018;94:185–192. DOI: 10.1007/s12185-011-0900-1
- 52 Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C. et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t (1; 19) / TCF3-PBX1. *Leukemia.* 2009;23(8):1406–1409. DOI: 10.1038/leu.2009.42
- 53 Kalina T, Flores-Montero J, Lecomte Q, Pedreira CE, van der Velden VH, Novakova M, et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010–2013) quality assurance rounds. *Cytometry.* 2015;87(2):145–156. DOI: 10.1002/cyto.a.22581
- 54 Kapoor G, Singh N. Role of apoptotic markers in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Indian J. Med. Res.* 2018;147(3):225–227. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_906_17
- 55 Kathiravan M, Singh M, Bhatia P, Trehan A, Varma, Sachdeva MS. et al. Deletion of CDKN2A/B is associated with inferior relapse free survival in pediatric B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(2):433–441. DOI: 10.1080/10428194.2018.1482542
- 56 Kentaro O, Nobutaka K, Yuya S, Hirabayashi S, Nakabayashi K, Ichikawa H. et al. Clinical and molecular characteristics of MEF2D fusion-positive precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in MEF2D-HNRNPH1 gene fusion. *Haematologica.* 2018;103:186–192. DOI: 10.3324/haematol.2017.186320
- 57 Khaddour K, Hana CK, Mewawalla P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation NCBI Bookshelf. National Library of Medicine, National Institutes of Health. June 27, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536951/?report=printable>
- 58 Khan M, Siddiqi R, Naqvi K. An update on classification, genetics, and clinical approach to mixed phenotype acute leukemia (MPAL) Ann. Hematol. 2018;97(6):945-953 DOI: 10.1007/s00277-018-3297-6

- 59 Kimura S, Charles G. Mullighan Molecular markers in ALL: Clinical implications
Best Pract Res Clin Haematol. 2020 Sep; 33(3):101193. doi:
10.1016/j.beha.2020.101193
- 60 Krawczyk J, Haslam K, Lynam P, Kelly J, Storey L, O'Marcaigh A. et al. No
prognostic impact of P2RY8CRLF2 fusion in intermediate cytogenetic risk
childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.*
2013;160(4):555–556. DOI: 10.1111/bjh.12130
- 61 Kwiecinska K, Strojny W, Pietrys D, Bik-Multanowski M, Siedlar M, Balwierz
W. et al. Late effects in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia in
the context of selected gene polymorphisms. *Ital J Pediatr.* 2018;44(1):92–93. doi:
10.1186/s13052-018-0526-5
- 62 Landmann E, Burkhardt B, Zimmermann M, Meyer U, Woessmann W, Klapper
W. et al. Results and conclusions of the European Intergroup EURO-LB02 trial in
children and adolescents with lymphoblastic lymphoma. *Haematologica.*
2017;102(12):2086–2096. DOI: 10.3324/haematol.2015.139162
- 63 Lay L, Mitchell C, Sue R, Harrison CJ, Tim E. Long-term follow-up of the United
Kingdom medical research council protocols for childhood acute lymphoblastic
leukaemia, 1980–2001. *Leukemia.* 2010;24(2):406–418. doi:
10.1038/leu.2009.256
- 64 Liu RB, Guo JG, Liu TZ, Guo C-C, Fan X-X, Zhanget X. al. Meta-analysis of the
clinical characteristics and prognostic relevance of NOTCH1 and FBXW7
mutation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(39):66360–
66370. doi: 10.18632/oncotarget.18576
- 65 Luczynski W, Krawczuk-Rybak M. Mechanisms of immunosuppression in
leukemia. *Postepy HigMed Dosw.* 2015;9:28–33. PMID: 15761383
- 66 Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M. et al. Rise
and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic
leukaemia. *Nat Commun.* 2015;6:6604–6609. DOI: 10.1038/ncomms7604

- 67 Madhusoodhan PP, Carroll WL, Bhatla T. Progress and prospects in pediatric leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2016;46 (7):229–241. DOI: 10.1016/j.cppeds.2016.04.003
- 68 Malbora B, Avci Z, Alioglu B, Tutar N, Ozbek N. A case with mature B-cell acute lymphoblastic leukemia and pancreatic involvement at the time of diagnosis. *J. Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30:87–89. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31815cc3fe
- 69 McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acutelymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol*. 2012;29 (1):2–11. DOI: 10.1053/j.semmdp.2011.07.004
- 70 McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:277–285. DOI: 10.1080/1042819031000151950
- 71 Meyer C, Kowartz E, Hoffmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J. et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009;23:1490–1499. DOI: 10.1038/leu.2009.33
- 72 Mi X, Griffin G, Lee W, Patel S, Ohgami R, Ok CY, Wang S et al. Genomic and clinical characterization of B/T mixed phenotype acute leukemia reveals recurrent features and T-ALL like mutations Am. J. Hematol. 2018;93(11):1358-1367 DOI: 10.1002/ajh.25256
- 73 Moericke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M. et al. Risk – adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: Treatment results of 2,169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008;111(9):4477–4489. DOI: 10.1182/blood-2007-09-112920
- 74 Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101:407–416. DOI: 10.3324/haematol.2015.141101

- 75 Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A. et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1434–1444. DOI: 10.1182/blood-2014-03-562918
- 76 Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR. et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;102(8):2756–2762. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1128
- 77 Moradi-Lakeh M, Yaghoubi M, Seitz P, Javanbakht M, Brock E. Affiliations expand et al. Cost-effectiveness of tisagenlecleucel in paediatric acute lymphoblastic leukaemia (pALL) and adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in Switzerland. *Adv Ther*. 2021;38(6):3427–3443. DOI: 10.1007/s12325-021-01767-x
- 78 Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloidleukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*. 2008;35:365–377. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2008.04.007
- 79 Mrozek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23 (5):1–20. DOI: 10.1016/j.hoc.2009.07.001
- 80 Mulatsih S, Dwiprahasto I, Sutaryo. Implementation of medication safety practice in childhood acute lymphoblastic leukemia treatment Asian Pac. *J Cancer Prev*. 2018;19(5):1251–1257. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.5.1251
- 81 Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J. et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453(7191):110–114. DOI: 10.1038/nature06866
- 82 Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Engl J Med*. 2009;360(5):470–480. DOI: 10.1056/NEJMoa0808253
- 83 Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillipset LA. et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2018;471 (7337):235–239. DOI: 10.1038/nature09727

- 84 Muñoz-Aguirre P, Huerta-Gutierrez R, Zamora S, Mohar A, Vega-Vega L, Hernández-Ávila EJ. et al. Acute lymphoblastic leukaemia survival in children covered by Seguro popular in Mexico: a national comprehensive analysis 2005–2017. *Health Systems & Reform.* 2021;7:1. doi: 10.1080/23288604.2021.1914897.
- 85 Murray CJ, Aravkin AY, Zheng P et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet* 2020;396:1223–1249 DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30752-2
- 86 Namjoshi NS, Keegan THM, Li QC, Chung JH, Rosenthal JL, Winestone LE, et al. Treatment-related toxicities associated with hospitalization in children, adolescents, and young adults with acute lymphoblastic leukemia: population level analysis. *Lymphoma.* 2022 Dec;63(13):3191-3199. doi: 10.1080/10428194.2022.2113533.
- 87 Nomburg J, Bullman S, Chung SS, Togami K, Walker MA, Griffin GK. et al. Comprehensive metagenomic analysis of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Blood Adv.* 2020;4(6):1006–1011. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019001260
- 88 O'Connor D., Enshaei A, Bartram J, Hancock J, Harrison CJ, Hough R. et al. Genotype-specific minimal residual disease interpretation improves stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2018;36(1):34–43. DOI: 10.1200/JCO.2017.74.0449
- 89 Oetjen KA, Lindblad KE, Goswami M, Gui G, Dagur PK, Lai C. et al. Human bone marrow assessment by single-cell RNA sequencing, mass cytometry, and flow cytometry. *JCI Insight.* 2018;3(23). e124928. DOI: 10.1172/jci.insight.124928
- 90 Okuku P, Kwenda G, Samutela M, Nkhoma P, Mantina H. Molecular detection of fusion oncogenes in zambian patients with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Appl Basic Med Res.* 2020;10 (4):234-239. DOI: 10.4103/ijabmr.IJABMR_179_19

- 91 Oskarsson T, Söderhäll S, Arvidson J, Forestier E, Montgomery S, Bottai M. et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica*. 2016;101 (1):68–76. DOI: 10.3324/haematol.2015.131680
- 92 Pan L, Liu G, Lin F, Zhong S, Xia H, Sun X. et al. Machine learning applications for prediction of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep*. 2017;7A:7402. DOI: 10.1038/s41598-017-07408-0
- 93 Patel BJ, Przychodzen B, Thota S, Radivoyevitch T, Visconte V, Kuzmanovic T. et al. Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(12):2815–2823.
- 94 Pavithra P, Lakshmi S, Laxminarayana K, Manohar C, Belurkar S, Kairanna NV. Transition from morphologic diagnosis to immunophenotypic diagnosis of acute leukemia-experience of establishing a new flow cytometry laboratory. *Journal of Hematopathology*. 2020;12:246-256. DOI: 10.1007/s12308-019-00368-6
- 95 Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromos Cancer*. 2009;48(8):637–660. DOI: 10.1002/gcc.20671
- 96 Pels EJ. Oral mucositis and saliva IgA, IgG and IgM concentration during anti-tumor treatment in children suffering from acute lymphoblastic leukemia. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26 (9):1351–1358. DOI: 10.17219/acem/64940
- 97 Pennella CL, Deu MA, Rossi JG, Baialardo EM, Alonso CN, Rubio P. et al. No benefit of Interfant protocols compared to BFM-based protocols for infants with acute lymphoblastic leukemia. Results from an institution in Argentina. *Pediatr Blood Cancer*. 2020;67(10):e28624. DOI: 10.1002/pbc.28624
- 98 Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, Fiocco M, van den Berg H, de Bont E. et al. Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: study ALL10 from the dutch childhood oncology group. *J Clin Oncol*. 2016;34 (22):2591–2601. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.6364
- 99 Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic

- leukaemia (Interfant – 99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2017;370(9583):240–250. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61126-X
- 100 Porwit A, Béné MC. Multiparameter flow cytometry applications in the diagnosis of mixed phenotype acute leukemia *Cytometry B Clin. Cytom.* 2019;96(3):183-194 DOI: 10.1002/cyto.b.21783
- 101 Pui CH, Robison LL, Look TA. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*. 2008;371:1030–1043. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60457-2
- 102 Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC. et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *Engl J Med*. 2009;360(26):2730–2741. DOI: 10.1056/NEJMoa0900386
- 103 Pui C-H, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM. et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. 2003. 17 (4). P. 700–706. DOI: 10.1038/sj.leu.2402883
- 104 Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ, Forman JS, Appelbaumet FR. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood*. 2008;111(5):2563–2572. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116186
- 105 Purnomo A, Bintoro UY, Sedana MP, Ashariati A. Association between Hasford Scoring System and Hematologic Response in Chronic and Accelerated Phase of Chronic Myelocytic Leukemia Patient with Imatinib for Three Months *Mol Cell Biomed Sci*. 2019; 3(2): 88-94 DOI: <https://doi.org/10.21705/mcbs.v3i2.56>
- 106 Quintas-Cardama A, Tong W, Manshour T, Vega F, Lennon P A, Cools J. et al. Activity of tyrosine kinase inhibitors against human NUP214-ABL11-positive T cell malignancies. *Leukemia*. 2008;22 (6):1117–1124. DOI: 10.1038/leu.2008.80
- 107 Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML. et al. Heterogeneity of hyperdiploid (51–67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996. 10 (2). P. 213–224.

- 108 Rodwin RL, Ma X, Ness KK, Kadan-Lottick NS, Wang R. Physical Therapy Utilization Among Hospitalized Patients With Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO Oncol Pract.* 2022 Jul;18(7):e1060-e1068. doi: 10.1200/OP.21.00796.
- 109 Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J. et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2018;26(13):2186–2191. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.3552
- 110 Sandhya DG, Faiq A, Manasi CM, Rachna K, Lavanya N, Krishnamohan M. et al. Retrospective Study of B Lymphoblastic Leukemia to Assess the Prevalence of TEL/AML1 in South India: A Study of 214 Cases and Review of Literature *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* 2022. DOI: 10.1055/s-0042-1742611
- 111 Sanjeev KG, Sameer B, Lalit K, Vineet KK, Rajive K. Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017;58 (2): 333–342. doi: 10.18632/oncotarget.19271
- 112 Santasusana R, Saldaña A, García-Muñoz N, Llinàs DM, Díaz de Heredia C. Cost-effectiveness analysis of tisagenlecleucel in the treatment of relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults in Spain. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2020;12:253–264. doi: 10.2147/CEOR.S241880
- 113 Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, McKenna RW. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of b acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2009;132 (6):940–949. DOI: 10.1309/AJCP8G5RMTWUEMUU
- 114 Sharma R, Chinmay J. Mapping incidence and mortality of leukemia and its subtypes in 21 world regions in last three decades and projections to 2030 Mapping incidence and mortality of leukemia and its subtypes in 21 world regions in last three decades and projections to 2030 *Annals of Hematology.*

- 2022;101:1523–1534 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-022-04843-6>
- 115 Shawahna R, Mosleh S, Odeh Y, Halawa R, Al-Ghoul M. Clinical characteristics and outcomes of patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia after induction of chemotherapy: a pilot descriptive correlational study from Palestine Shawahna et al. *BMC Res Notes* 2021;14:259 <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05678-6>
- 116 Silverman L, McLean T, Gelber R. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer*. 1997;80:2285–2295.
- 117 Skhoun H, Khattab M, Chebihi ZT, Belkhayat A, Dakka N, Jamila EL Baghdadi a B/T mixed phenotype acute leukemia with high hyperdiploidy and lineage switch to B-cell acute leukemia *Leukemia Research Reports* 17. 2022;100289 <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2022.100289>
- 118 Soliman R, Heneghan C, Bolous NS, Sidhom I, Ahmed S, Roberts N. Systematic review of costs and cost-effectiveness of treatment for relapsed/refractory acute leukemia in children and young adults. 2022: 345-357 <https://doi.org/10.1080/17474086.2022.2069096>
- 119 Soverini S, Bassan R, Lion T. Treatment and monitoring of Philadelphia chromosome-positive leukemia patients: recent advances and remaining challenges. *J Hematol Oncol*. 2019;12 (1):39-44. DOI: 10.1186/s13045-019-0729-2
- 120 Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR. et al. High concordance from independent studies by the Children’s Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorABL1e prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children’s Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia*. 2015;19 (5):734–740. DOI: 10.1038/sj.leu.2403673
- 121 Sutton R, Venn NC, Law T, Boer JM, Trahair TN, Boer AM. et al. A risk score including microdeletions improves relapse prediction for standard and

- medium risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia in children. *Brit J Haematol.* 2018.;180 (4):550–562. DOI: 10.1111/bjh.15056
- 122 Tai EW, Ward KC, Bonaventure A, David A Siegel, Coleman MP. Survival among children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in the United States, by race and age, 2001 to 2009: Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer.* 2017;123 (Suppl. 24):5178–5189. DOI: 10.1002/cncr.30899
- 123 Thielen FW, van Dongen-leunis A, Arons AMM, et al. Cost-effectiveness of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-Cell therapy in pediatric relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. A societal view. *Eur J Haematol.* 2020;105(2):203–215. doi: 10.1111/ejh.13427.
- 124 Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M, Ladestein JR, Hoogerbrugge PM, Uyl-de Groot CA. Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood.* 2020;117 (14):3858–3868. DOI: 10.1182/blood-2010-11-320515
- 125 Van Dongen JM, Orfao A. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia.* 2012;26 (9):1899–1907. doi: 10.1038/leu.2012.121
- 126 Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H, Van der Meulen J, Castillo M, Van Roy N. et al. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2010;42 (4):338–342. DOI: 10.1038/ng.542
- 127 Vardiman J, Thiele J, Arber D, Richard D, Brunning M, Borowitz J, Porwit A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937–951. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262
- 128 Venugopal S, Zhou S, El Jamal SM, Lane AA, Mascarenhas J. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm-current insights. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019. Sep;19 (9):545–554. DOI: 10.1016/j.clml.2019.06.002
- 129 Volejnikova J, Jarosova M, Pospisilova D, Novak Z, Vrbkova J, Hajduch M, Mihal V. Treatment and prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia on protocols ALL-BFM 90, 95 and ALL IC-BFM 2002: a retrospective single-center

- study from Olomouc, Czech Republic. *Neoplasma*. 2016;63(3):456–461. DOI: 10.4149/316_150910N482
- 130 Vora A, Goulden N, Mitchell C, Hancock J, Hough R, Rowntree C. et al. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):809–818. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70243-8
- 131 Vrooman LM, Blonquist TM, Harris MH, Stevenson KE, Place A, Hunt SK. et al. Refining risk classification in childhood B acute lymphoblastic leukemia: results of DFCI ALL Consortium Protocol 05-001. *Blood Adv*. 2018;2 (12):1449–1458. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018016584
- 132 Vrooman LM, Silverman LB. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic factors and clinical advances. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11(5):385–394 DOI: 10.1007/s11899-016-0337-y
- 133 Vynnytska OA, Dorosh OI, Dubey LY, Dubey NV. Immunophenotypic Profile of Blast Cells as a Marker for Diagnosis of Relapsed Children Acute Lymphoblastic Leukemia. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021;6(1):56–64. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.01.056>
- 134 Vynnytska O. Forecast value of separate clinical and laboratory indicators acute lymphoblastic leukemia in children received cytostatic therapy ALLICB FM 2009. *Biopolymers and Cell*. 11(1-2):41-42. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.41-1.28120
- 135 Wang H, Abbas KM, Abbasifard M et al (2020) Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet* 396:1160–1203 DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30977-6
- 136 Wang J, Mi JQ, Debernardi A, Vitte AL, Emadali A, Meyer JA, et al. A six gene expression signature defines aggressive subtypes and predicts outcome in

- childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017;6(18):16527–16542. DOI: 10.18632/oncotarget.4113
- 137 Wang WJ, Zhao J, He P, Wang XN. Characteristics and diagnostic values of bone marrow cell morphology and immunophenotyping in lymphoma cell leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2018;26(2):459–463. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.02.026
- 138 Wang W, Khoury JD, Miranda RN, Jorgensen JL, Xu J, Loghavi S. et al. Immunophenotypic characterization of reactive and neoplastic plasmacytoid dendritic cells permits establishment of a 10-color flow cytometric panel for initial workup and residual disease evaluation of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica*. 2020;2:219-227. doi: 10.3324/haematol.2020.247569.
- 139 Weeda V, Mestrum SG, Math PG. Leers. Flow Cytometric Identification of Hematopoietic and Leukemic Blast Cells for Tailored Clinical Follow-Up of Acute Myeloid Leukemia Int. J. Mol. Sci. 2022;23:10529. <https://doi.org/10.3390/ijms231810529>
- 140 Wetzler M, Dodge RK, Mrozek K. et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience. *Blood*. 1999;93(11);3983–3993.
- 141 Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Exper Hematol Oncol*. 2014;3(1):16-19. DOI: 10.1186/2162-3619-3-16
- 142 Wu C, Li W. Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;126:100–111. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.04.002
- 143 Wu J, Pi XL, Ye ZB. Pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19) in an adult initially presenting as hematuria and bilateral renal enlargement: a case report and literature review. *Clin. Nephrol. Case. Stud*. 2017;5:60–65. DOI: 10.5414/CNCS109113

- 144 Yanada M, Matsuo K, Suzuki T. et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a metaanalysis. *Leukemia*. 2005. 19 (8). P. 1345–1349.
- 145 Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2015;4(3):460–478. DOI: 10.3390/jcm4030460
- 146 Zawitkowska J, Lejman M, Zaucha-Prażmo A, Drabko K, Płonowski M. Clinical characteristics and analysis of treatment result in children with Ph-positive acute lymphoblastic leukaemia in Poland between 2005 and 2017. *Eur J Haematol*. 2018;10:542–548. DOI: 10.1111/ejh.13142
- 147 Zerbini MC N, Soares FA, Velloso ED, Drabko K, Płonowski M, Bulsa J. et al. World Health Organization classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 2008: major changes from the 3rd edition. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2011;57(1):6–73. DOI: 10.1111/ejh.13142
- 148 Zhu Y, Liu H, Zhang S, Liang Y, Xiao M, Hao Y, Guan Y. A case report of lineage switch from T-cell acute leukemia to B-cell acute leukemia *Medicine (Baltimore)*. 2020 Oct 30; 99(44): e22490. doi: 10.1097/MD.00000000000022490

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

Праці, які відображають основні наукові результати дисертації

1. Винницька О. А., Дубей Н. В., Дорош О. І., Дубей Л. Я. Перспективи розвитку дослідження мутаційного статусу в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями. *Український медичний часопис*. 2018; Т. 2 – IX/X. 5(127):24-27. <https://www.umj.com.ua/article/131015/perspektivi-rozvitku-doslidzhennya-mutatsijnogo-statusu-v-ditej-iz-gostrimi-limfoblastnimi-lejkemiyami>. (Здобувачу належить проведення аналізу науково-фахової літератури, опрацювання та узагальнення отриманих

даних, формулювання основних висновків роботи та написання статті. Співавтори надавали консультативну допомогу).

2. Винницька О. А., Дубей Л. Я. Експресія химерних генів у клітинах кісткового мозку дітей з гострою лімфобластною лейкемією за умов застосування цитостатичної терапії. Винницька О. А., Дубей Л. Я. *Biopolymers and Cell*. 2022; Vol; 38(1): 17-25. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A70> (Здобувач проводив збір матеріалу, брав участь у клінічних дослідженнях, статистичному аналізі, опрацюванні та узагальненні отриманих даних, сформулював висновки роботи та підготував статтю до друку. Співавтор надавав консультативну допомогу).

3. Vynnytska O. A., Dorosh O. I., Dubey L. Ya., Dubey N. V. Immunophenotypic Profile of Blast Cells as a Marker for Diagnosis of Relapsed Children Acute Lymphoblastic Leukemia. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021; 6(1): 56-64. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.01.056> (Здобувач проводив збір матеріалу, брав участь у клінічних дослідженнях, статистичному аналізі, опрацюванні та узагальненні отриманих даних, сформулював висновки роботи та підготував статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).

4. Винницька О. А. Молекулярно-генетичні механізми розвитку гострої лімфобластної лейкемії у дітей та їх корекція ALLIC BFM 2009 цитостатичною терапією. *World Science*. 2021; 1(62): 10-18. DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws (Здобувач проводив збір матеріалу, його аналіз, підготував статтю до друку).

5. Винницька О. А., Дубей Л. Я., Дубей Н. В., Дорош О. І. Роль молекулярно-генетичних транслокацій у первинній відповіді на лікування дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію, за програмою ALLIC BFM 2009. *Вісник проблем біології і медицини. Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021; Т. 6 (3): 162-169. DOI: 10.26693/jmbs06.03.162. (Здобувач проводив збір матеріалу, його аналіз, підготував статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).

6. Винницька О. А., Дубей Л. Я., Дубей Н. В., Дорош О. І. Взаємозв'язок генетичних відхилень з лабораторними показниками периферичної крові та кісткового мозку в дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію. *Буковинський медичний вісник. Український науково-практичний журнал*. 2021;

Т. 25; 1(97):11-18. (Здобувач проводив збір матеріалу, брав участь у клінічних дослідженнях, статистичному аналізі, опрацюванні та узагальненні отриманих даних, сформулював висновки роботи та підготував статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).

7. Винницька О.А. Прогнозування окремих клінічних і лабораторних показників лімфобластної лейкемії у дітей, що отримали цитостатичну терапію ALLIC BFM 2009. Клінічна Онкологія .2021; Т.11№1-2:33-40. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.41-1. (Здобувачу належить проведення аналізу науково-фахової літератури, опрацювання та узагальнення отриманих даних, формулювання основних висновків роботи та написання статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Винницька О. А. Сучасний стан проблеми та особливості прогностичних критеріїв гострих лейкемій у дітей. *Науково-практична конференція «Інноваційні пріоритети розвитку наукових знань»*. Київ, 29–30 березня 2019 року. С. 84–87. (abstract).

2. Дорош О. І., Винницька О. А., Дубей Л. Я, Іваненко А. Л., Вовк З. В., Гнатюк М., Дубей Н. В. Молекулярно-генетичні особливості гострої лімфобластної лейкемії у дітей та їхнє прогностичне значення. *XVIII Конгрес СФУЛТ*. Львів, 1–3 жовтня 2020 року. С. 136. (abstract).

3. Винницька О. А. Перспективи дослідження мутаційного статусу в дітей з гострими лімфобластними лейкеміями. *XXIII Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених*. Тернопіль, 15–17 квітня 2019 року. С. 164–165. (abstract).

Акти впровадження

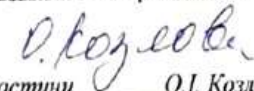


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Моніторинг імунотипових показників (MRD) на різних етапах лікування гострої лімфобластної лейкемії у дітей за протоколом DFM-ALLIC-2009
найменування пропозиції для впровадження
2. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
установа, що розробила її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69; Вишницька О.А., Дорош О.І., Дубей Л.Я., Дубей Н.В.
3. Джерело інформації: Український журнал медицини, біології та спорту (2021, 1: 56-60):
назва, рік видання методичних рекомендацій
«Імунотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої лімфобластної лейкемії у дітей»
інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.
4. Впроваджено: відділення гематології та інтенсивної хіміотерапії КНП ЛОР
найменування лікувально-профілактичної о закладу
«Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр» (м. Львів)
5. Термін впровадження: 03.2021 р. - 08.2021 р.
6. Загальна кількість спостережень⁴: 11
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації:
(п 3) Підвищення якості ранньої діагностики рецидивів при гострій лімфобластній лейкемії у дітей

Показники ⁵	За даними	
	авторів, які пропонують	організації, що впровадила
11	на 25 %	на 30%

8. Зауваження, пропозиції
«__» _____ 20__ р.

Відповідальний за впровадження

 Заст. директора з мед частини О.І. Козлова
 посада, підпис, ім'я, по батькові, прізвище



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ


1. Моніторинг імунофенотипових показників (MRD) на різних етапах лікування гострої лімфобластної лейкемії у дітей за протоколом DFM-ALLIC-2009
 найменування пропозиції для впровадження
2. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
 установа, що розробила її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів
 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69; Вишницька О.А., Дорош О.І., Дубей Л.Я., Дубей Н.В.
3. Джерело інформації: Український журнал медицини, біології та спорту (2021, 1: 56-60)
 назва, рік видання методичних рекомендацій
 «Імунофенотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої лімфобластної лейкемії у дітей»
 інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.
4. Впроваджено : онкогематологічне відділення КНП ООР
 найменування лікувально-профілактичної о. закладу
 «Одеська обласна дитяча клінічна лікарня»
5. Термін впровадження: 03.2021 р. - 08.2021 р.
6. Загальна кількість спостережень⁴: 17
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації:
 (п 3) Підвищення якості ранньої діагностики рецидивів при гострій лімфобластній лейкемії у дітей

Показники ⁵	За даними	
	авторів, які пропонують	організації, що впровадила
17	на 25 %	на 30%

8. Зауваження, пропозиції

«__» _____ 20__ р.

Відповідальний за впровадження

Зав. відділення  Наталія Молодцева
 посада, підпис, ім'я, по батькові, прізвище

«Затверджую»
 Директор комунального некомерційного підприємства
 Харківської обласної ради
 «Харківська обласна дитяча клінічна лікарня №1»
 Оксана Піонтковська
 _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Моніторинг імунотипових показників (MRD) на різних етапах лікування гострої лімфобластної лейкемії у дітей за протоколом DFM-ALLIC-2009
найменування пропозиції для впровадження
2. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
установа, що розробила її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69; Вишницька О.А., Дорош О.І., Дубей Л.Я., Дубей Н.В.
3. Джерело інформації: Український журнал медицини, біології та спорту (2021, 1: 56-60):
назва, рік видання методичних рекомендацій
«Імунотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої лімфобластної лейкемії у дітей»
інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.
4. Впроваджено : відділення дитячої гематології КНП ХОР
найменування лікувально-профілактичної о закладу
«Харківська обласна дитяча клінічна лікарня №1»
5. Термін впровадження: 03.2021 р. - 08.2021 р.
6. Загальна кількість спостережень⁴: 13
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації:
(п 3) Підвищення якості ранньої діагностики рецидивів при гострій лімфобластній лейкемії у дітей

Показники ⁵	За даними	
	авторів, які пропонують	організації, що впровадила
13	на 25 %	на 30%

8. Зауваження, пропозиції
«__» _____ 20__ р.

Відповідальний за впровадження

Зав. відділення _____ *Олена Стародубцева*
посада, підпис, ім'я, по батькові, прізвище

«Затверджую»
 Головний лікар комунального підприємства
 «Рівненська обласна дитяча лікарня»
 Рівненської обласної ради
 Віталій БОЙКО
 20/1 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Моніторинг імунофенотипових показників (MRD) на різних етапах лікування гострої лімфобластної лейкемії у дітей за протоколом BFM-ALLIC-2009
2. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
 установа, що розробила її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69; Винницька О.А., Дорош О.І., Дубей Л.Я., Дубей Н.В.
3. Джерело інформації: Український журнал медицини, біології та спорту (2021, 1: 56-60):
 назва, рік видання методичних рекомендацій
«Імунофенотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої лімфобластної лейкемії у дітей»
 інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.
4. Впроваджено : Онкологічний центр КП «РОДІЛ»
 найменування медичного закладу
КП «Рівненська обласна дитяча лікарня» Рівненської обласної ради
5. Термін впровадження: 03.2021 р. - 08.2021 р.
6. Загальна кількість спостережень⁴: 10
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації:
 (п 3) Підвищення якості ранньої діагностики рецидивів при гострій лімфобластній лейкемії у дітей

Показники ⁵	За даними	
	авторів, які пропонують	організації, що впровадила
10	на 25 %	на 30%

8. Зауваження, пропозиції
«Ні» 03 2021 р.

Відповідальний за впровадження
Завідувач Онкологічного центру Дана Бокій
 відповідає дана розробка

«Затверджую»
 В.о. директора комунального підприємства
 «Чернівецька обласна дитяча клінічна лікарня»
 І.В. Ташук
 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Моніторинг іммунофенотипових показників (MRD) на різних етапах лікування гострої лімфобластної лейкемії у дітей за протоколом DFM-ALLIC-2009
 найменування пропозиції для впровадження
2. Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
 установа, що розробила її: поштова адреса, прізвище, ім'я та батькові авторів
 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69; Вишницька О.А., Дорош О.І., Дубей Л.Я., Дубей Н.В.
3. Джерело інформації: Український журнал медицини, біології та спорту (2021, 1: 56-60)
 назва, рік видання методичних рекомендацій
 «Іммунофенотиповий профіль бластних клітин як маркер діагностики рецидивів гострої лімфобластної лейкемії у дітей»
 інформаційного листа, вкладні дані статт. № в.с. і т.п.
4. Впроваджено: кардіонкогематологічне відділення КНП ЧОР
 найменування лікувально-профілактичного закладу
 «Чернівецька обласна дитяча клінічна лікарня»
5. Термін впровадження: 03.2021 р. - 08.2021 р.
6. Загальна кількість спостережень⁴: 9
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації:

(п 3) Підвищення якості ранньої діагностики рецидивів при гострій лімфобластній лейкемії у дітей

Показники ⁴	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
9	на 25 %	на 30%

8. Зауваження, пропозиції
 « » 20__ р.

Відповідальний за впровадження

Зав. відділення М.Г. Гуцук

дповідає дана розробка