



Пролесковская И.В.¹✉, Пахомова И.В.¹, Вашкевич Е.П.¹, Конопля Н.Е.²

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Методы диагностики и прогностическое значение минимальной метастатической и минимальной остаточной болезни при нейробластоме группы высокого риска у детей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Пролесковская И.В., Конопля Н.Е.; сбор материала – Пролесковская И.В.; обработка материала и выполнение лабораторных тестов – Вашкевич Е.П., Пахомова И.В.; написание текста – Пролесковская И.В.; редактирование – Конопля Н.Е., Пролесковская И.В.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Подана: 09.04.2024

Принята: 10.05.2024

Контакты: proleskai@mail.ru, Pachomova.Irina@gmail.com, katsiaryna.vashkevich@gmail.com, n.konoplya@mail.ru

Резюме

Цель. Выбор методов оценки минимальной метастатической (ММБ) и минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с нейробластомой на момент постановки диагноза и на этапах терапии с последующей оценкой их прогностического значения.

Материалы и методы. В исследование включено 60 пациентов с первично диагностируемой нейробластомой группы высокого риска, проходивших лечение в ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» в период с октября 2007 по август 2016 года. Материалом для исследования послужили образцы костного мозга (КМ) и аутологичной периферической стволовой клетки (ПСК) пациентов. Поражение КМ оценивалось на момент постановки диагноза с помощью 4 методов: световая микроскопия, проточная цитометрия, иммуноцитохимия, ПЦР в режиме реального времени (определение экспрессии генов ТН и РНОХ2В). Этапы терапии для оценки МОБ были выбраны следующие: ПСК, КМ на момент завершения индукционной фазы и момент завершения специального лечения.

Результаты. При проведении мультивариантного анализа было выявлено, что наличие ММБ в КМ на момент постановки диагноза, определяемой по уровню экспрессии гена РНОХ2В, выше предела отсечения в 0,366 HR 1,57 отрицательно влияет на показатели общей выживаемости пациентов с нейробластомой группы высокого риска. Для бессобытийной выживаемости значимым является наличие ММБ, определяемой морфологическим методом в КМ, выше предела отсечения в 20% нейробластов HR 3,1. На точку определения МОБ в ПСК наиболее информативным методом является проточная цитометрия, при этом наличие МОБ в ПСК является противопоказанием к ее использованию. Наличие МОБ в КМ момент окончания индукции, выявляемой по экспрессии генов ТН и РНОХ2В, отрицательно влияет на исход заболевания.



Выводы. Рекомендуемые методы для определения ММБ на момент постановки диагноза следующие: проточная цитометрия (определение опухолеспецифического фенотипа), иммуноцитохимия (экспрессия GD2 антигена), ПЦР в режиме реального времени (экспрессия ТН и РНОХ2В). Для определения МОБ в ПСК предпочтительно использовать метод проточной цитометрии. Обнаружение клеток с опухолеспецифическим фенотипом в ПСК является противопоказанием к его использованию. На момент окончания индукционной терапии и завершения лечения МОБ оценивается с помощью ПЦР в режиме реального времени по уровню экспрессии генов ТН и РНОХ2В, а также иммуноцитохимии. Необходимо исследование как минимум двумя методами для исключения ложноположительных/ложноотрицательных результатов.

Ключевые слова: нейробластома, дети, минимальная метастатическая болезнь, минимальная остаточная болезнь, прогноз

Proleskovskaya I.¹, Pakhomava I.¹, Vashkevich E.¹, Konoplya N.²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

² N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus

Diagnostic Methods and Prognostic Value of Minimal Metastatic and Minimal Residual Disease in High-Risk Neuroblastoma in Children

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – Proleskovskaya I., Konoplya N.; collection material – Proleskovskaya I.; processing of material and performing laboratory tests – Vashkevich E., Pakhomava I.; writing the text – Proleskovskaya I.; editing – Konoplya N., Proleskovskaya I.

Submitted: 09.04.2024

Accepted: 10.05.2024

Contacts: proleskai@mail.ru, Pakhomova.Irina@gmail.com, katsiaryna.vashkevich@gmail.com, n.konoplya@mail.ru

Abstract

Purpose. To select methods for assessing minimal metastatic disease (MMD) and minimal residual disease (MRD) in patients with neuroblastoma at the time of diagnosis and during the times of therapy. Assessing the prognostic value of the presence of MMB and MRD in patients with neuroblastoma.

Materials and methods. In the process of work, to evaluate data on MMB and MRD, we used data on 60 patients with primary diagnosed high-risk neuroblastoma who were treated at the State Institution "Belorussian Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology" from October 2007 to August 2016. The material for the study was bone marrow (BM) and autologous peripheral stem cells (PBSC) from patients. Bone marrow (BM) involvement was assessed at the time of diagnosis using the following methods: light microscopy, flow cytometry, immunocytochemistry, real-time PCR (determining relative expression levels (REL) of the TH and PHOX2B genes). The following stages of therapy were selected to evaluate MRD: in the PBSC, in the BM at the time of completion of the induction phase and the time of completion of special treatment.

Results. At the time of diagnosis of the disease, MMD is determined by all 4 methods. When conducting a multivariate analysis, it was revealed that the presence of MMD, determined by the molecular biological method by the REL of the PHOX2B gene in the bone marrow, above the cut-off limit of 0.366 HR 1.57 negatively affects the OS of patients with high-risk neuroblastoma. For BM of patients with neuroblastoma, the presence of MMD, determined by morphological method in the bone marrow, is above the cutoff limit of 20% of neuroblasts HR 3.1. For the determination of MRD in PBSC, the most informative method is flow cytometry; the presence of MRD in PBSC positive by this method is a contraindication to its use. The presence of MRD in the bone marrow, detected by the REL of the TH and PHOX2B genes using a molecular biological method in the bone marrow of high-risk patients at the end of induction, negatively affects the outcome of the disease.

Conclusion. Methods for determining MRD at the time of diagnosis are as follows: flow cytometry (detecting a tumor-specific phenotype), immunocytochemistry (determining the expression of the GD2 antigen) in BM, real-time PCR (determining REL TH and PHOX2B indicators). To determine MRD in the harvested autograft (PBSC), it is preferable to use the flow cytometry method. The detection of cells with a tumor-specific phenotype in PSC is a contraindication to its use. MRD in BM at the end of induction therapy and completion of treatment is assessed using the REL of the TH and PHOX2B genes using real-time PCR, as well as immunocytochemistry. It is necessary to study at least two methods to exclude both false positive and false negative results.

Keywords: neuroblastoma, children, minimal metastatic disease, minimal residual disease, prognosis

■ ВВЕДЕНИЕ

Нейробластома составляет 10% от детских онкологических заболеваний. Более 40% пациентов на момент постановки диагноза имеют метастазы в костный мозг (КМ), кости, лимфоузлы, печень и другие органы. Для пациентов старше 1 года наличие поражения КМ означает отнесение их в группу высокого риска, в которой, несмотря на применение комплексного метода лечения, прогноз остается неудовлетворительным [1, 2].

Существующие в настоящее время методы оценки степени поражения КМ при нейробластоме имеют ряд недостатков. Так, чувствительность цитологических методов не превышает 0,1% [3, 4], определение экспрессии анти-GD2, несмотря на высокую чувствительность (одна позитивная клетка на 10^6 мононуклеарных клеток), не является опухолеспецифичным тестом, так как экспрессия GD2 характерна для клеток КМ и периферической крови (ПК) [5–7]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени характеризуется высокой чувствительностью (одна позитивная клетка на 10^4 – 10^5 мононуклеарных клеток) и, следовательно, может являться методом выбора для оценки степени поражения КМ и мониторинга минимальной метастатической (ММБ) и минимальной остаточной болезни (МОБ) при нейробластоме [8–11].

Одной из наиболее важных характеристик маркера для указанной цели является его высокая специфичность для клеток нейробластомы: отсутствие экспрессии в нормальных компартментах (КМ и ПК) и высокая экспрессия в опухолевой ткани.



Количественная ПЦР-диагностика таких наиболее часто используемых мишеней, как тирозингидроксилаза (TH) [8, 10, 12, 13] и дисиалоганглиозид GD2, также демонстрируют слабую экспрессию в значительном количестве нормальных тканей [8, 10, 11, 15, 16]. Для других таргетов, таких как GAGE [17, 18], MAGE [19], PGP9.5 [20, 21], DDC [22], Cyclin D1 [23], ELVAL4 [8], фоновая экспрессия также была описана. Наличие экспрессии гена-мишени в нормальном КМ лимитирует чувствительность определения МОБ. Поэтому выявление специфических опухолевых маркеров является важным для более эффективной оценки поражения КМ и отслеживания МОБ.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе проведения исследования использовались данные о 60 пациентах с первично диагностируемой нейробластомой группы высокого риска, проходивших лечение в ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» в период с октября 2007 по август 2016 года. Постановка диагноза и терапия пациентов проводилась согласно клиническому протоколу NB 2004М. Распределение по полу: мальчики – 31 (51,6%), девочки – 29 (48,4%). Возраст пациентов варьировал от 0,46 до 10,34 года, медиана возраста составила 2,79 года. Распределение по стадиям: 1-я стадия – 3 пациента (5% от исследуемой группы), 3-я стадия – 5 пациентов (8,3%), 4-я стадия – 52 пациента (86,7%). Диагноз был верифицирован морфологически. Критериями включения пациентов в группу высокого риска были следующие показатели: наличие у пациента MYC-N-амплификации в опухоли, независимо от стадии болезни; 4-я стадия заболевания у пациентов старше 1 года на момент первичной диагностики.

Материалом для исследования послужили КМ и ПСК пациентов. Для оценки ММБ забор материала был осуществлен путем проведения пункции КМ из 4 точек (для детей старше 6 месяцев проводились 2 трепанобиопсии и 2 пункции КМ). На момент постановки диагноза поражение КМ оценивалось с помощью следующих методов: световая микроскопия, проточная цитометрия, иммуноцитохимия, ПЦР в режиме реального времени (определение показателей экспрессии генов TH и PNOX2B). При оценке уровня экспрессии генов PNOX2B и TH в образцах КМ, полученных из нескольких костей, учитывалось наибольшее значение исследуемого показателя. Наличие МОБ в образцах ПСК было исследовано с использованием указанных методов. Забор материала проводился после 2–4-го блока полихимиотерапии (ПХТ). Второй этап определения МОБ осуществлялся на момент окончания индукционного этапа лечения (после 6 циклов ПХТ), третий – на момент окончания лечения.

Оценка экспрессии генов TH и PNOX2B с использованием ПЦР в режиме реального времени. Выделение КМ осуществлялось путем лизиса эритроцитов с последующей экстракцией тотальной РНК с использованием TRI-reagent в соответствии с инструкциями производителя. Для реакции обратной транскрипции был использован набор реагентов SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). Определение показателей экспрессии генов TH и PNOX2B осуществлялось методом полуколичественной ПЦР в режиме реального времени с использованием CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, USA) [23].

Проточная цитометрия. Образец КМ (100–200 мкл) или ПСК (50 мкл) помещали в пробирки для проточной цитофлуориметрии и добавляли моноклональные антитела в следующей комбинации: Syto16 Green/ CD81 PE/ CD56 PE-Cy5/ CD45 PE-Cy7,

согласно инструкции производителя. Затем образцы перемешивали и инкубировали в течение 20 мин. при комнатной температуре в темноте. После инкубации проводили лизирование эритроцитов на автоматической станции Beckman Coulter TQ prep, США, с использованием растворов для лизирования и фиксации. Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) в программе CXP. Учитывали не менее 500 тыс. Syto16 Green позитивных (ядросодержащих) клеток. В ходе анализа ядросодержащие, жизнеспособные клетки выделяли на точечных графиках Syto16 Green/SSC и FSC/SSC, затем на графике CD45/CD56 выделяли регион CD45-CD56+ клеток, среди которых определяли CD81+ популяцию. Атипичные клетки преимущественно имели высокую экспрессию CD56 маркера. Таким образом, количество диссеминированных или остаточных опухолевых клеток с фенотипом Syto16+CD45-CD56+CD81+ выражали как процент от всех ядросодержащих клеток. Положительным считали результат $\geq 0,01\%$.

Иммуноцитохимия для определения GD2-позитивных клеток в костном мозге. При первичной обработке биоматериала выделяли мононуклеарные клетки (МНК) на градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Германия), согласно инструкции производителя. Из полученных таким способом МНК готовили 6 препаратов-цитоспинов диаметром 17 мм, содержащих 5×10^5 клеток. Для оценки полученных результатов использовали следующие морфологические критерии: клетки с круглыми ядрами, с зернистой структурой и небольшим количеством цитоплазмы рассматривались как положительные; клетки с незначительным показателем соотношения размеров ядра и цитоплазмы или имеющие типичные морфологические признаки кроветворных клеток, расценивались как отрицательные. Для оценки результатов также применялись иммуноцитологические критерии: клетки с выраженной красной окраской клеточной мембраны и цитоплазмы расценивались как положительные; слабая окраска, неравномерная окраска расценивалась как отрицательная.

В качестве контроля использовали нейробластомную клеточную линию IMR32. При окраске этой линии с использованием первичных анти-GD2 антител во всех клетках наблюдалось специфическое красное (положительное) окрашивание. При использовании первичных мышиных античеловеческих IgG2a антител (как отрицательный контроль) клетки данной линии давали только голубую (отрицательную) окраску.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA для Windows XP Professional. Для оценки достоверности различий был использован χ^2 -тест. Построение кривых выживаемости осуществлялось по методу Каплана – Майера, их сравнение – с использованием Log-rank test. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Для проведения мультивариантного анализа использовалось построение регрессии Кокса (модель пропорциональных рисков).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения ММБ в КМ у пациентов с нейробластомой группы высокого риска на точку постановки диагноза отражены в табл. 1.

Таким образом, наиболее чувствительными методами для определения ММБ в КМ у пациентов группы высокого риска с нейробластомой являются молекулярно-



Таблица 1
Результаты определения минимальной метастатической болезни в костном мозге пациентов с нейробластомой группы высокого риска
Table 1
Results of determining minimal metastatic disease in bone marrow of patients with high-risk neuroblastoma

Метод	Всего	ММБ+, n (%)	ММБ-, n (%)
Цитология	60	34 (56,7%)	26 (43,3%)
Проточная цитометрия	55	43 (78,2%)	12 (21,8%)
Иммуноцитология (GD2)	36	25 (69,4%)	11 (30,6%)
Экспрессия гена ТН	54	49 (90,7%)	5 (9,3%)
Экспрессия гена РНОХ2В	48	41 (85,4%)	7 (14,6%)

Примечание: ММБ – минимальная метастатическая болезнь.

биологические методы: определение относительного уровня экспрессии (ОУЭ) генов ТН и РНОХ2В в костном мозге.

Методом определения корреляционной зависимости Спирмена были определены коэффициенты корреляции между 4 методами определения ММБ в КМ и произведено их сопоставление с данными морфологического исследования. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2
Коэффициенты корреляции между методами определения минимальной метастатической болезни в костном мозге пациентов с нейробластомой группы высокого риска
Table 2
Correlation coefficients between methods for determining minimal metastatic disease in bone marrow of patients with high-risk neuroblastoma

Метод	Цитология	Экспрессия гена ТН	Экспрессия гена РНОХ2В	ИФТ	Иммуноцитология (GD2)
Цитология	1,000000	0,748032	0,799053	0,731233	0,597503
ИФТ		0,634357	0,747533	1,000000	0,508871
Иммуноцитология, экспрессия GD2			0,637849	0,508871	1,000000
Экспрессия гена ТН				0,634357	0,628966
Экспрессия гена РНОХ2В					0,637849

Примечание: ИФТ – иммунофенотипирование.

Таблица 3
Медианно-квартильное распределение показателей минимальной метастатической болезни для количественных методов определения
Table 3
Median quartile distribution of minimal metastatic disease for quantitative methods

Метод, единица измерения	Всего, n	Минимум	25%	50%	75%	Максимум
Цитология, % нейробластов	60	0	5	20	70	100
ИФТ, % клеток с опухолевым иммунофенотипом	55	0	0,020	0,740	2,645	45,000
Экспрессия гена ТН	54	0	0,008	0,124	1,654	32,150
Экспрессия гена РНОХ2В	48	0	0,016	0,089	0,366	8,037

Примечание: ИФТ – иммунофенотипирование.

Таблица 4
Влияние минимальной метастатической болезни на прогноз заболевания
Table 4
Impact of minimal metastatic disease on disease prognosis

Метод, единица измерения	Порог отсечения	n	Ме наблюдения, года	ОВ	p	БВ	Ме наблюдения, года	p
Морфология, % атипичных клеток	≤20%	n=32	2,62	69±9%	0,015	60±10%	2,62	0,003
	>20%	n=28	2,57	34±11%		16±7%	1,51	
ИФТ, % клеток с опухолевым фенотипом	≤2,645%	n=41	3,76	65±8%	0,032	41±9%	2,58	0,0016
	>2,645%	n=14	1,61	21±17%		0	1,19	
Экспрессия гена TH	≤1,8	n=41	3,50	67±8%	0,009	47±9%	2,53	0,0187
	>1,8	n=11	1,26	15±14%		14±13%	1,19	
Экспрессия гена PNOX2B	≤0,366	n=36	3,63	67±10%	0,001	47±10%	2,55	0,033
	>0,366	n=12	1,53	24±14%		24±15%	1,26	
Иммуноцитология, экспрессия GD2	GD2–	n=11	4,48	58±17%	0,718	55±15%	2,58	0,448
	GD2+	n=25	2,42	47±14%		0	1,82	

Примечания: ОВ – общая выживаемость; БВ – бессобытийная выживаемость; ИФТ – иммунофенотипирование.

Как можно отметить из табл. 2, на точку постановки диагноза имеются сильные корреляционные связи между всеми методами определения ММБ в образцах КМ у пациентов с нейробластомой группы высокого риска. В табл. 3 отражено медианно-квартильное распределение количественных параметров определения ММБ на точку диагноза различными методами.

Для экспрессии GD2-ганглиозида такое представление данных невозможно, так как этот параметр оценивался качественно: наличие/отсутствие свечения на клетках.

Унивариантный анализ методом Каплана – Майера для каждого из методов, характеризующих ММБ на точку постановки диагноза. На точку постановки диагноза с помощью проведения унивариантного анализа методом Каплана – Майера для каждого из методов, характеризующих ММБ, были найдены пороги отсечения (cut-off), влияющие на общую выживаемость (ОВ) и бессобытийную выживаемость (БВ) пациентов с нейробластомой группы высокого риска.

Мультивариантный анализ параметров на точку постановки диагноза. Так как между методами, оценивающими ММБ на точку диагноза, выявлен высокий коэффициент корреляции, были построены мультифакторные модели, включающие возраст, стадию, наличие MYC-N амплификации и один из анализируемых параметров в точке отсечения, выявленной унивариантным анализом. При анализе, влияющем на ОВ, достоверной оказалась модель, представленная в табл. 5. Представленная модель достоверна, наибольшее влияние на ОВ при нейробластоме группы высокого риска оказывало наличие в КМ высоких показателей экспрессии гена PNOX2B (порог отсечения – выше 0,366).



Таблица 5
Мультифакторный анализ на точку диагноза для общей выживаемости
Table 5
Multivariate analysis at diagnosis for overall survival

Параметр	Порог отсечения	ОР	95% ДИ	p
Возраст	≤18 месяцев / >18 месяцев	0,65	0,1240–3,456	0,6178
Стадия	Локальные/метастатические	1,46	0,1451–14,788	0,7466
Амплификация MYCN	Нет/да	0,88	0,2882–2,686	0,8222
Экспрессия гена PNOX2B	≤0,366/>0,366	1,57	0,490–15,417	0,0086

Примечания: значение логрангового критерия = 10,95 on 4 df (p=0,0314); ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал.

Для БВ достоверной оказалась модель, отраженная в табл. 6. Таким образом, наличие на момент постановки диагноза более 20% нейробластов в КМ в мультифакторном анализе достоверно негативно сказывается на БВ HR 3.1.

Наличие МОБ в ПСК, используемых для проведения аутоТГСК, исследовалось следующими методами: проточная цитометрия (определение специфического фенотипа, иммуноцитохимия (определение GD2-позитивных клеток), ПЦР в режиме реального времени (оценка уровня экспрессии генов ТН и PNOX2B).

С помощью методов иммуноцитохимии было исследовано 30 образцов трансплантата. Позитивных образцов выявлено не было. Молекулярно-биологическим методом определения ОУЭ гена PNOX2B было исследовано 43 образца. Позитивных образцов выявлено не было.

С помощью метода проточной цитометрии исследовано 42 образца, 2 из которых были позитивными. Показатель ОБ в группе с негативными образцами составил 64,8±9%, в группе с позитивными образцами 0 (p=0,00096), медиана наблюдения в первой группе составила 2,79 года (от 0,65 до 8,68 года) во второй – 1,37 года (от 1,33 до 1,4 года). Показатель БВ в группе с негативными образцами составил 47±9%, во второй 0% (p=0,0125), медиана наблюдения в первой группе составила 1,91 года (от 0,45 до 8,68 года), во второй – 1,09 года (от 1,03 до 1,25 года).

С помощью молекулярно-биологического метода определения ОУЭ гена ТН было исследовано 47 образцов, 3 из них были позитивными. Общая выживаемость в группе с негативными образцами составила 61,4±9%, в группе с позитивными образцами –

Таблица 6
Мультифакторный анализ на точку диагноза для бессобытийной выживаемости
Table 6
Multivariate analysis at diagnosis for event-free survival

Параметр	Порог отсечения	ОР	95% ДИ	p
Возраст	≤18 месяцев / >18 месяцев	0,62	0,2518–1,556	0,3136
Стадия	Локальные/метастатические	0,81	0,1951–3,395	0,7747
Амплификация MYCN	Нет/да	0,93	0,4289–2,049	0,8713
Морфология, % нейробластов	≤20%/>20%	3,1	1,3604–7,077	0,0071

Примечания: значение логрангового критерия = 10,04 on 4 df (p=0,04); ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал.

33,3±2,7% (p=0,26), медиана наблюдения в первой группе составила 3,8 года (от 0,65 до 9,47 года), во второй – 2,42 года (от 1,79 до 5,9 года). Показатель БВ в группе с негативными образцами составил 45,1±9%, во второй – 33,3±2,7% (p=0,65), медиана наблюдения в первой группе составила 2,46 года (от 0,45 до 9,47 года), во второй – 1,86 года (от 1,46 до 5,95 года). Таким образом, экспрессия гена ТН в ПСК не имеет прогностического значения для ОВ и БВ для пациентов с нейробластомой группы высокого риска, что соответствует литературным данным [24].

Учитывая, что только один из методов (проточная цитометрия) определения МОБ в ПСК при проведении унивариантного анализа методом Каплана – Майера имел прогностическое значение, проведение многофакторного анализа в этой точке терапии нецелесообразно.

Таким образом, отрицательное значение МОБ в ПСК, определяемое методом иммунофенотипирования, по-видимому, не имеет прогностического значения. Наличие же МОБ в ПСК, определяемое данным методом, говорит о том, что такой материал не может быть использован для проведения аутоТГСК.

Оценка МОБ после окончания индукции. Наличие МОБ в КМ на этом этапе терапии исследовалось следующими методами: иммунофенотипирование (определение специфического фенотипа), иммуноцитохимия (определение GD2-позитивных клеток), молекулярно-биологический метод определения ОУЭ генов ТН и РНОХ2В.

Методом иммунофенотипирования КМ на эту точку был исследован у 36 пациентов, из них у 31 пациента результат отрицательный, у 5 – положительный. Методом иммуноцитохимии на эту точку КМ был исследован у 21 пациента, из них у 20 пациентов результат отрицательный, у 1 – положительный. В табл. 7 представлены данные по выживаемости с используемым пределом наличия либо отсутствия МОБ.

На рис. 1 отражена динамика снижения ОУЭ генов ТН и РНОХ2В в костном мозге от точки постановки диагноза к точке окончания индукции. Следует отметить значительное снижение ОУЭ обоих генов в костном мозге у пациентов группы высокого риска к моменту окончания индукционной терапии, примерно на 4–5 логарифмов у большинства пациентов.

При проведении унивариантного анализа влияния МОБ на ОВ и БВ пациентов с нейробластомой группы высокого риска был определен cut-off для ОУЭ генов ТН и РНОХ2В: 0,00018 и 0 соответственно. Результаты по ОВ и БВ пациентов группы высокого риска на точку окончания индукции в зависимости от наличия МОБ в КМ

Таблица 7
Результаты анализа выживаемости на точку окончания индукции методами проточной цитометрии и иммуноцитохимии
Table 7
The results of the analysis of survival at the end point of induction by methods of flow cytometry and immunocytochemistry

Метод, единица измерения	Порог отсечения	n	ОВ	p	БВ	p
ИФТ, % клеток с опухолевым фенотипом	0	31	52±11%	0,16	37±10%	0,40
	>0	5	100		50±25%	
Иммуноцитология, экспрессия GD2	0	20	86±9%	0,80	40±19%	0,34
	>0	1	100%		0	

Примечания: ОВ – общая выживаемость; БВ – бессобытийная выживаемость; ИФТ – иммунофенотипирование.

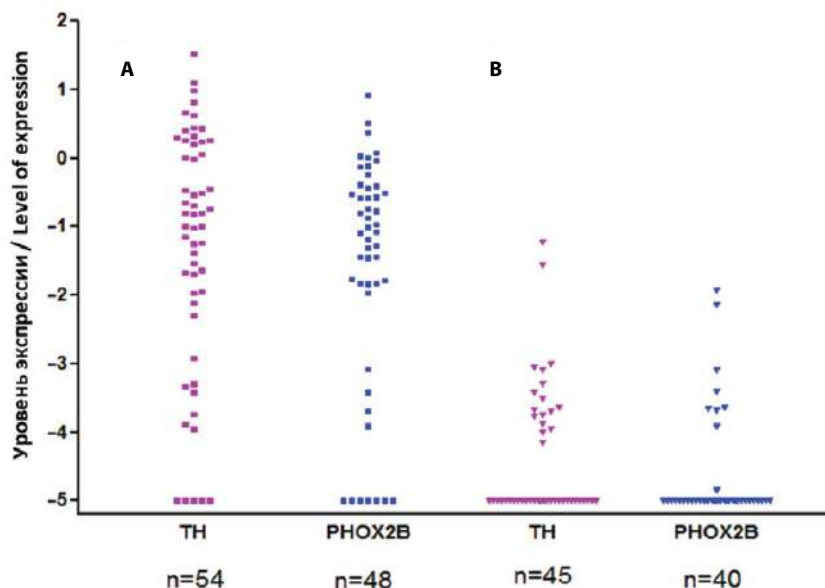


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии генов TH и PHOX2B в костном мозге пациентов с нейробластомой высокой группы риска: А – на момент постановки диагноза; В – на момент окончания индукции

Fig. 1. Relative expression levels of TH and PHOX2B genes in the bone marrow of patients with high-risk neuroblastoma: A – at the time of diagnosis; B – at the end of induction therapy

по данным молекулярно-биологического исследования ОУЭ гена TH представлены на рис. 2 (А и В). Различия по ОВ и БВ статистически высокодостоверны. Для ОВ медиана наблюдения в первой группе составила 3,95 года (от 0,79 до 8,89 года) во второй – 1,8 года (от 0,91 до 6,32 года). Для БС медиана наблюдения в первой группе составила 2,58 года (от 0,79 до 8,89 года), во второй – 1,32 года (от 0,76 до 5,95 года).

Результаты по ОВ и БВ пациентов группы высокого риска на точку окончания индукции в зависимости от наличия МОБ в КМ по данным молекулярно-биологического исследования ОУЭ гена PHOX2B представлены на рис. 3 (А и В). Различия по ОВ и БВ статистически высокодостоверны. Для ОВ медиана наблюдения в первой группе составила 2,71 года (от 0,79 до 8,68 года), во второй – 4,02 года (от 0,91 до 6,32 года). Для БС медиана наблюдения в первой группе составила 2,57 года (от 0,79 до 8,68 года), во второй – 4,42 года (от 0,76 до 8,72 года).

Таким образом, наличие МОБ в костном мозге, выявляемой по ОУЭ генов TH и PHOX2B, определяемой с помощью ПЦР в режиме реального времени в образцах КМ пациентов группы высокого риска на момент окончания индукции, резко отрицательно влияет на исход заболевания. По-видимому, для данной когорты пациентов следует изменять подходы к терапии, так как применяемая для них стандартная терапия группы высокого риска неэффективна.

В табл. 8 и 9 приведена регрессионная модель Кокса для БС в зависимости от уровня экспрессии генов PHOX2B и TH.

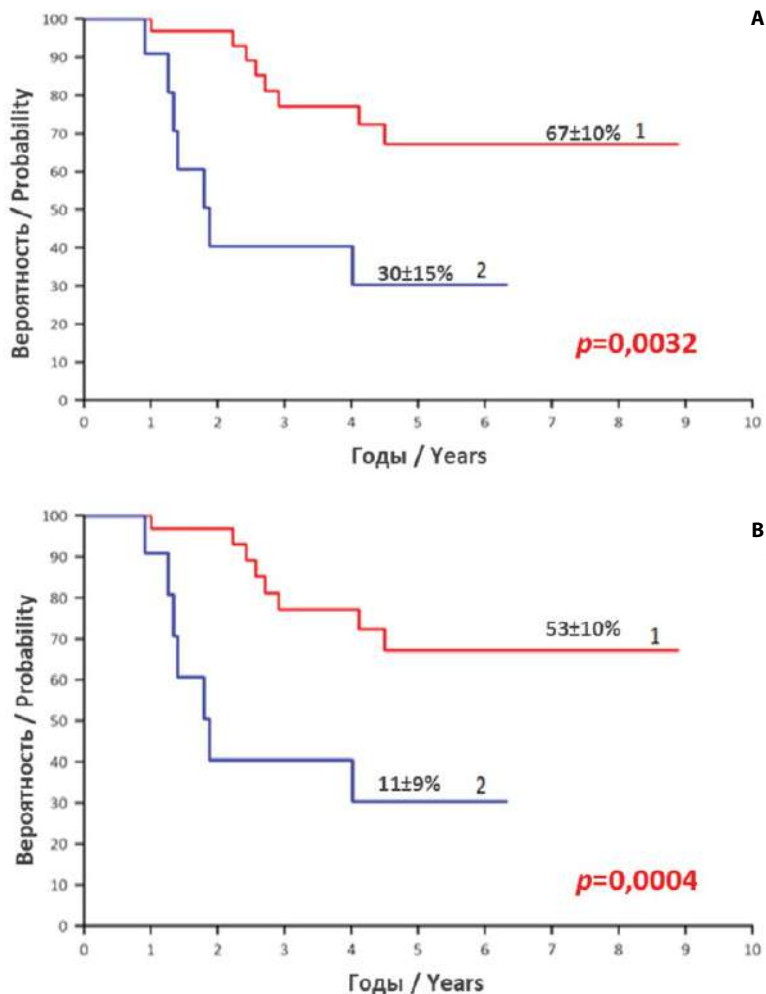


Рис. 2. Выживаемость пациентов с нейробластомой высокой группы риска в зависимости от уровня экспрессии гена TH: А – общая выживаемость; В – бессобытийная выживаемость; 1 – уровень экспрессии гена TH $\leq 0,00018$ (n=34); 2 – уровень экспрессии гена TH $> 0,00018$ (n=11)
Fig. 2. Survival of patients with high-risk neuroblastoma depending on the level of TH gene expression: А – overall survival; В – event-free survival; 1 – TH gene expression ≤ 0.00018 (n=34); 2 – TH gene expression > 0.00018 (n=11)

Таким образом, в многофакторной модели относительно БС и уровней экспрессии генов PNOX2B и TH являются наиболее мощными факторами прогнозирования события и единственно статистически значимыми в рамках рассматриваемых моделей. Так как статистическая значимость модели с ОУЭ гена PNOX2B ($p=0,006$) выше, чем с ОУЭ гена TH ($p=0,03$), то показатель ОУЭ PNOX2B лучше прогнозирует наступление события (рецидива/прогрессии заболевания).

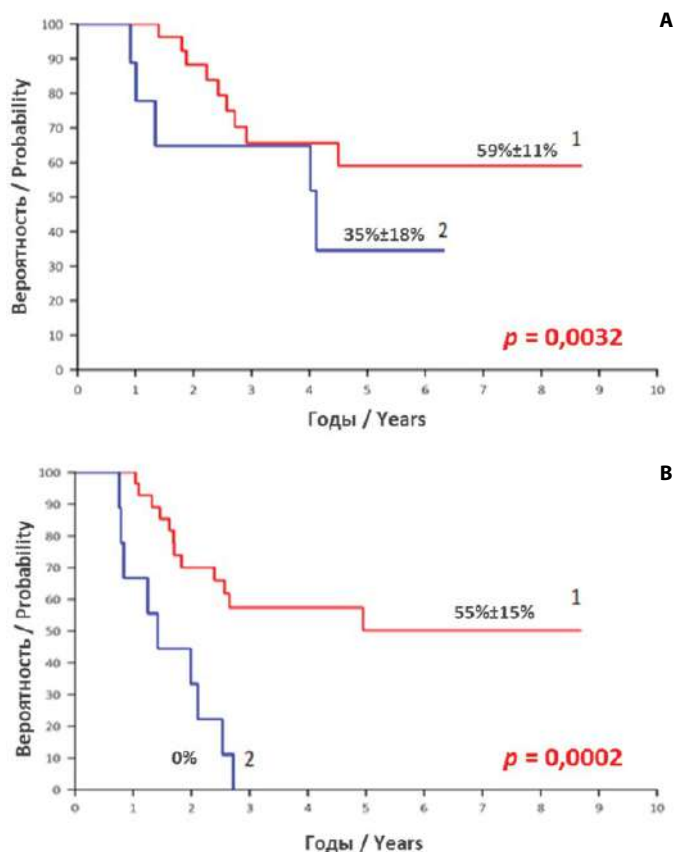


Рис. 3. Выживаемость пациентов с нейробластомой высокой группы риска в зависимости от уровня экспрессии гена PHOX2B: А – общая выживаемость; В – бессобытийная выживаемость; 1 – уровень экспрессии гена PHOX2B ≤ 0 (n=31); 2 – уровень экспрессии гена PHOX2B > 0 (n=9)
Fig. 3. Survival of patients with high-risk neuroblastoma depending on the level of TH gene expression: А – overall survival; В – event-free survival; 1 – PHOX2B gene expression ≤ 0 (n=31); 2 – PHOX2B gene expression > 0 (n=9)

Таблица 8
Регрессионная модель Кокса для бессобытийной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии гена PHOX2B
Table 8
Cox regression model for event-free survival depending on the level of PHOX2B gene expression

Параметр	Порог отсечения	ОР	95% ДИ	р
Возраст	≤18 месяцев / >18 месяцев	1,32	0,3773–4,630	0,6628
Стадия	Локальные/метастатические	1,75	0,3173–9,592	0,5221
Амплификация MYCN	Нет/да	0,89	0,2537–3,087	0,8479
Экспрессия гена PHOX2B	0,00001/>0,00001	4,15	1,4679–11,706	0,0072

Примечания: значение логрангового критерия = 14,62 on 4 df (p=0,006); ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал.

Таблица 9
Регрессионная модель Кокса для бессобытийной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии гена TH
Table 9
Cox regression model for event-free survival depending on the level of TH gene expression

Параметр	Порог отсечения	ОР	95% ДИ	p
Возраст	≤18 месяцев / >18 месяцев	1,39	0,4055–4,783	0,5988
Стадия	Локальные/метастатические	1,43	0,2580–7,9800	0,6801
Амплификация MYCN	Нет/да	0,73	0,2293–2,307	0,5886
Экспрессия гена TH	≤0,00018/>0,00018	3,42	1,3912–8,4230	0,0074

Примечания: значение логрангового критерия = 10,66 on 4 df (p=0,03); ОР – отношение рисков; ДИ – доверительный интервал.

Точка завершения специфической терапии. На точку завершения терапии КМ был исследован следующими методами: проточная цитометрия, иммуноцитохимия, ПЦР в режиме реального времени по ОУЭ генов TH и PNOX2B. Использовался cut-off 0 и больше 0 для тех методов, где имелись позитивные результаты. Результаты обследования и их связь с ОБ и ББВ представлены в табл. 10.

Таким образом, на данную точку выявлено достоверное ухудшение БВ при наличии МОБ в КМ по данным иммуноцитохимии. Влияния наличия или отсутствия МОБ на прогноз заболевания для пациентов высокой группы риска, определяемого другими методами детекции, не обнаружено. Вероятнее всего, это связано с небольшим количеством обследованных пациентов. Регрессионный анализ на данном этапе терапии проводить нецелесообразно, учитывая то, что только ММБ, выявляемая иммуноцитологически, влияла на БВ пациентов с нейробластомой группы высокого риска.

Таблица 10
Влияние минимальной остаточной болезни в костном мозге пациентов с нейробластомой в период окончания специфического лечения на выживаемость
Table 10
Impact of minimal residual disease in the bone marrow of patients with neuroblastoma at the end of specific treatment on survival

Метод, единица измерения	Порог отсечения	n	ОВ/ОС	p	БВ/EFS	p
ИФТ, % клеток с опухолевым фенотипом	0	5	80±18%		60±21%	
Иммуноцитология, экспрессия GD2	0 >0	14 2	79±14% 50±35%	0,57	77±12% 0	0,04
Экспрессия гена TH	0 >0	11 2	100% 100%		90±9% 50±35%	0,27
Экспрессия гена PNOX2B	0	12	100		80±13%	

Примечания: ОБ – общая выживаемость; БВ – бессобытийная выживаемость; ИФТ – иммунофенотипирование.



■ ВЫВОДЫ

1. Были разработаны методы оценки определения ММБ и МОБ в образцах КМ и ПСК на этапах терапии пациентов с нейробластомой группы высокого риска.
2. На точку постановки диагноза имеются сильные корреляционные связи между всеми методами определения ММБ в КМ у пациентов с нейробластомой группы высокого риска. На эту точку с помощью проведения унивариантного анализа методом Каплана – Майера для каждого из методов, характеризующих ММБ, были найдены пороги отсеечения (cut-off), влияющие на ОБ и БВ пациентов с нейробластомой группы высокого риска. Для морфологического метода порог отсеечения составил 20% нейробластов в КМ, для проточной цитометрии – наличие клеток в костном мозге со специфическим фенотипом 2,645%, для молекулярно-биологического исследования уровня экспрессии гена TH в –1,8, для молекулярно-биологического исследования уровня экспрессии гена PNOX2B в –0,366.
3. Наиболее значимым фактором риска среди анализируемых (возраст – ≤18 месяцев / более 18 месяцев; стадия – локальная/метастатическая; MYC-N амплификация – нет/да; наличие ММБ вышеперечисленными методами), влияющим на ОБ пациентов с нейробластомой группы высокого риска, явилось наличие ММБ, определяемой молекулярно-биологическим методом по ОУЭ гена PNOX2B, выше предела отсеечения в 0,366 HR 3,08. На БВ пациентов с нейробластомой среди тех же параметров влияет наличие ММБ, определяемой морфологическим методом, выше предела отсеечения в 20% нейробластов HR 3,1.
4. Отрицательное значение МОБ в ПСК, определяемое методом проточной цитометрии, не имеет прогностического значения. Наличие же МОБ в ПСК, определяемой данным методом, говорит о том, что такой материал не может быть использован для проведения аутоТГСК.
5. На момент окончания индукции наличие МОБ в КМ, выявляемой по ОУЭ генов TH и PNOX2B с помощью молекулярно-биологического метода в КМ у пациентов группы высокого риска, отрицательно влияет на исход заболевания. По-видимому, у данной когорты пациентов следует изменять подходы к терапии, так как применяемая для них стандартная терапия группы высокого риска неэффективна. По данным регрессионного анализа Кокса на момент окончания индукции среди анализируемых параметров (возраст пациента, стадия заболевания, наличие MYC-N амплификации, ОУЭ генов TH и PNOX2B в КМ) на БС пациентов наибольшее влияние оказывает наличие экспрессии гена PNOX2B HR 4,15, данные статистически достоверны ($p=0,0072$).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Cotterill S.J., Pearson D.J., Pritchard J. et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: Results of the European Neuroblastoma Study Group "Survey" 1982–1992. *J. Eur. Cancer.* 2000;36:901–08. doi: 10.1016/S0959-8049(00)00058-7.
2. Hartmann O., Valteau-Couanet D., Vassal G. et al. Prognostic factors in metastatic neuroblastoma in patients over 1 year age treated with high dose chemotherapy and stem cells transplantation: a multivariate analysis in 218 patients treated in single institution. *Bone marrow transplantation.* 1999;23:789–95. doi: 10.1038/sj.bmt.1701737.
3. Cheung N.K., Heller G., Kushner B.H., Liu C. et al. Detection on metastatic neuroblastoma in bone marrow: When is routine marrow histology insensitive? *J. Clin. Oncol.* 1997;15:2807–17. doi: 10.1200/JCO.1997.15.8.2807.
4. Méhes G., Luegmayr A., Körn Müller R. et al. Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIFP) analysis compared with classical bone marrow cytology. *Am. J. Pathol.* 2003;163:393–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63669-3.

5. Cheung I.Y., Cheung N.K. Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7:1698–705.
6. Hoon D.S., Kuo C.T., Wen S. et al. Ganglioside GM2/GD2 synthetase mRNA is a marker for detection of infrequent neuroblastoma cells in bone marrow. *Am. J. Pathol.* 2001;159:493–500. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61721-X.
7. Martinez C., Hofmann T.J., Marino R. et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: A novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood.* 2007;109:4245–8. doi: 10.1182/blood-2006-08-039347.
8. Viprey V.F., Corrias M.V., Kagedal B. et al. Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: Quality assurance on behalf of SIOPEN-R-NET. *Eur. J. Cancer.* 2007;43:341–50. doi: 10.1016/j.ejca.2006.08.007.
9. Méhes G., Luegmayr A., Ambros I.M. et al. Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumor cells in the bone marrow. *Clin. Cancer Res.* 2001;7:1969–75.
10. Lambooy L.J., Gidding C.M., Heuvel L.P. et al. Real-time analysis of tyrosine hydroxylase gene expression: A sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma. *Clin. Cancer.* 2003;9:812–9.
11. Swerts K., De Moerloose B., Benoit Y. Potential application of ELAVL4 real-time quantitative reverse transcription-PCR for detection of disseminated neuroblastoma cells. *Clin. Chem.* 2006;52:438–45. doi: 10.1373/clinchem.2005.059485.
12. Horibe K., Fukuda M., Miyajima Y. et al. Outcome prediction by molecular detection of minimal residual disease in bone marrow for advanced neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 2001;36:203–4. doi: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<203::AID-MPO1049>3.0.CO;2-T.
13. Parareda A., Gallego S., Roma J. et al. Prognostic impact of the detection of microcirculating tumor cells by a real-time RT-PCR assay of tyrosine hydroxylase in patients with advanced neuroblastoma. *Oncol. Rep.* 2005;14:1021–7.
14. Iversen M.S., Kågedal B., Christensen L. et al. Comparison of immunocytochemistry, real-time quantitative RT-PCR and flow cytometry for detection of minimal residual disease in neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* 2005;27:121–9.
15. Kuçi Z., Seitz G., Kuçi S. et al. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Res.* 2006;26:2075–80.
16. Träger C., Kogner P., Lindskog M. et al. Quantitative analysis of tyrosine hydroxylase mRNA for sensitive detection of neuroblastoma cells in blood and bone marrow. *Clin. Chem.* 2003;49:104–12. doi: 10.1373/49.1.104.
17. Cheung I.Y., Cheung N.K. Molecular detection of GAGE expression in peripheral blood and bone marrow: Utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 1997;3:821–826.
18. Oltra S., Martinez F., Orellana C. et al. Minimal residual disease in neuroblastoma: To GAGE or not to GAGE. *Oncol. Res.* 2004;14:291–5. doi: 10.3727/096504003773994824.
19. Cheung I.Y., Barber D., Cheung N.K. et al. Detection of microscopic neuroblastoma in marrow by histology, immunocytology, and reverse transcription PCR of multiple molecular markers. *Clin. Cancer Res.* 1998;4:2801–5.
20. Gilbert J., Norris M.D., Marshall G.M. et al. Low specificity of PGP9.5 expression for detection of micrometastatic neuroblastoma. *Br. J. Cancer.* 1997;75:1779–81.
21. Mattano L.A., Moss T.J., Emerson S.G. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1992;52:4701–5.
22. Bozzi F., Luksch R., Collini P. et al. Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone marrow and peripheral blood: Utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Diagn. Mol. Pathol.* 2004;13:135–143. doi: 10.1097/01.pdm.0000128699.14504.06.
23. Kushnerova E., Pahomova I., Proleskovskaya I. Evaluation of TH and PHOX2B gene expression using real-time PCR to diagnose metastatic bone marrow damage in neuroblastoma. *Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. A series of biological sciences.* 2019;64:216–21. doi: 10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221.
24. Viprey V.F., Gregory W.M., Corrias M.V. et al. Neuroblastoma mRNAs predict outcome in children with stage 4 neuroblastoma: A European HR-NBL1/SIOPEN study. *J. Clin. Oncol.* 2014;32:1074–83.