

*А.М. Попов^{1,2,3}, Е.В. Шорилов^{1,2}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, А.Е. Друй^{1,2},
А.Г. Солодовников², Л.И. Савельев^{1,2,3}, Л.Г. Фечина^{1,2}*

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ С НЕЙРОБЛАСТОМой МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

¹ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург,

²ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург,

³ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург

Цель исследования — оценить прогностическое значение выявления опухолевых клеток в костном мозге (КМ) у детей с нейробластомой (НБ) методом проточной цитометрии. Определение опухолевых клеток проводили в КМ 51 пациента с нейробластомой (24 мальчиков и 27 девочек) в возрасте от 6 суток до 15 лет (медиана 1 год 3 месяца). Проточная цитометрия позволила определить клетки НБ в КМ в значительно большем количестве случаев, чем цитоморфология (49,0 % и 29,4 % пациентов соответственно, $p=0,043$). Больные, у которых клетки НБ не были обнаружены в КМ методом проточной цитометрии, имели существенно лучшие показатели бессобытийной и общей выживаемости, а также выживаемости без прогрессии ($83,5 \pm 7,6$ %, $87,7 \pm 6,7$ % и $86,8 \pm 7,1$ % соответственно) по сравнению с теми, у которых иммунофенотипирование выявило опухолевые клетки ($28,0 \pm 9,0$ %, $35,8 \pm 10,7$ % и $34,3 \pm 10,4$ % соответственно, $p < 0,001$ во всех случаях). Прогностическое значение определения поражения КМ методом проточной цитометрии было подтверждено и в отдельных группах пациентов, выделенных по другим критериям стратификации. В многовариантном анализе, иммунофенотипирование осталось значимым прогностическим фактором на фоне других традиционных параметров, таких как стадия опухоли, возраст и амплификация гена MYCN. Выявление опухолевых клеток в КМ методом проточной цитометрии потенциально может учитываться совместно с другими факторами при выборе стратегии лечения пациентов с НБ.

Ключевые слова: дети, костный мозг, нейробластома, проточная цитометрия

Нейробластома (НБ) — наиболее часто встречающаяся у детей солидная опухоль экс-

тракраниальной локализации [11]. Современные схемы стратификации больных нейробластомой на группы риска основаны на совокупности клинических и молекулярно-биологических данных и позволяют проводить риск-адаптированную терапию. Однако, они не дают полной возможности контролировать эффективность терапии, а также прогнозировать вероятность развития рецидива и исход заболевания [8, 14, 17, 25]. Этим продиктована необходимость дальнейшего поиска прогностических маркеров, использование которых позволило бы более точно определять степень риска у пациентов с нейробластомой, проводить индивидуализированное противоопухолевое лечение, добиваясь высокой эффективности и избегая избыточной токсичности.

Известно, что диссеминация опухоли в организме негативно влияет на течение заболевания и увеличивает риск неудачи терапии [15, 18, 19]. При этом значение имеют не только визуализируемые метастатические очаги, но и пул циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови и инфильтрация ими костного мозга (КМ). В настоящее время для выявления опухолевых клеток в КМ наиболее широко применяется цитологическое и гистологическое исследование аспиратов и трепанобиоптатов КМ. В рутинной практике чувствительность морфологического исследования редко превышает 1×10^{-2} [2, 6, 7]. Поэтому во многих случаях необходимо использование более чувствительных методов, таких как иммуноцитологическое исследование препаратов КМ, проточная цитофлуориметрия, ПЦР. Аналитическая чувствительность при использовании данных методов может достигать 1×10^{-4} – 1×10^{-5} [1, 6, 7, 20].

Проточная цитометрия является весьма доступным, быстрым и легко выполнимым методом обнаружения клеток НБ в КМ [1, 4, 10, 12, 16, 20, 22, 23,]. Применение проточной цитометрии основано на определении опухолеассоции-

рованного иммунофенотипа, то есть сочетания экспрессии антигенов, позволяющего точно отличать клетки НБ от нормальных клеток КМ. Чаще всего выявляются клетки, экспрессирующие CD81, CD56, CD9, но, в отличие от гемопозитических клеток, неэкспрессирующие CD45 [12–19]. Также к этим маркерам некоторые исследователи добавляют НБ-ассоциированные NB84 и GD2 [1, 10, 12, 20, 23, 24]. В настоящее время прогностическая значимость определения поражения КМ при НБ методом проточной цитометрии показана в очень небольшом количестве работ [1,4] и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования — оценить прогностическое значение выявления опухолевых клеток в костном мозге у детей с НБ методом проточной цитометрии.

Пациенты и методы исследования

Исследование проводилось в лаборатории иммунофенотипирования опухолей Областной детской клинической больницы №1 (г. Екатеринбург) с октября 2005 по декабрь 2011 г. В исследование был включен 51 пациент с нейробластомой (24 мальчика и 27 девочек) в возрасте от 6 суток до 15 лет (медиана 1 год 3 месяца), у которых производилось определение опухолевых клеток в КМ методом проточной цитометрии. Распределение больных по стадиям опухоли и по наличию/отсутствию амплификации гена MYCN представлено в табл. 1. Все пациенты получали терапию по протоколу NB-2004. Учитывая возможность мозаичного поражения КМ, у каждого пациента исследовали от 1 до 5 образцов (медиана — 3 образца) КМ, взятых из разных локализаций.

Иммунофенотипирование опухолевых клеток в костном мозге производилось методом 2–6-цветной проточной цитометрии на двухлазерных проточных цитометрах «FACS Canto» и «FACS Canto II» (Becton & Dickinson (BD), США). Настройка приборов производилась с использова-

нием калибровочной системы «7-color Setup Beads» (BD). Мониторинг стабильности работы приборов осуществлялся при помощи калибровочных частиц «Cytometer Setup and Tracking» (BD). Использовались моноклональные антитела (MkAT), меченные флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), R-фикоэритрином (PE), перидинилхлорофилл-протеином (PerCP), аллофикоцианином (APC), а также тандемными конъюгатами PE и APC с цианином 7 (Cy7). Для определения клеток НБ применялись моноклональные антитела, представленные в табл. 2. Окрашивание первичномеченными MkAT производилось согласно инструкции производителя. После инкубации суспензии костномозговых клеток с MkAT взвесь обрабатывалась лизирующим раствором («FACS Lysing solution» BD), а затем отмывалась фосфатно-солевым буфером («Cell Wash», BD). Результаты иммунофенотипирования оценивались при помощи программного обеспечения FACS Diva 4.0-6.1 (BD). Анализировали не менее 100000 ядросодержащих клеток. Опухолевые клетки выделяли на точечных графиках по отсутствию экспрессии CD45 (в качестве отличия от гемопозитических клеток), экспрессии остальных маркеров (NB84, GD2, CD81, CD56, CD9), а также значениям параметров прямого и бокового светорассеяния (FSC и SSC), соответствующим клеткам НБ (рис. 1) [1,4,10,12,16,20,22,23,24]. Образцы считали позитивными при обнаружении не менее 0,01% опухолевых клеток среди всех ядросодержащих клеток КМ.

Пример экспрессии применяемых маркеров опухолевыми клетками в КМ представлен на рис. 1.

Определение опухолевых клеток в КМ также проводили при помощи стандартного цитоморфологического исследования. Мазки КМ фиксировали, а затем окрашивали по методу Романовского-Гимзы. При световой микроскопии (увеличение $\times 1000$) оценивали наличие в цитопрепарате клеток НБ, просматривая весь препарат.

Для оценки результатов терапии рассчитывали 5-летние (для ряда групп пациентов 3- и 4-летние) бессобытийную, общую выживаемость, а также выживаемость без прогрессии/рецидива (БСВ, ОВ и ВБП соответственно). Период наблюдения определялся от момента постановки диагноза. Негативным событием считались смерть от любой причины, прогрессия заболевания, рецидив опухоли. Выживаемость оценивалась по кривым, построенным по методу Каплана-Майера [13], а стандартная ошибка (CO) рассчитывалась по формуле Гринвуда. Для сравнения кривых выживаемости использовался непараметрический log-rank критерий. Медиана наблюдения составила 4,1 года (диапазон от 1,3 до 7,5 лет). Многофакторный анализ проводился методом множественной регрессии по методу Кокса [9] с расчетом отношения опасности и 95 % доверительного интервала (ДИ). Параметры сравнивались при помощи теста Вальда. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ «STATISTICA 8.0» и SPSS 18.0.

Таблица 1.

Распределение пациентов по стадиям заболевания и в зависимости от амплификации гена MYCN

Амплификация MYCN	Стадия					Всего
	I	II	III	IV	IVS	
Нет	13	1	8	13	5	40
Есть	1	1	4	5	0	11
Всего	14	2	12	18	5	51

Таблица 2.

Моноклональные антитела, применявшиеся для выявления клеток НБ

Флуорохром	Моноклональные антитела
FITC	CD81, NB84*
PE	GD2, CD45, CD81
PerCP	CD9, CD45
PE-Cy7	CD56
APC	CD81, CD56
APC-Cy7	CD45

Примечание:

* антитела производства Novocastra (США);

остальные антитела произведены Becton & Dickinson (США).

Результаты исследования

Среди 51 исследованного пациента у 15 (29,4 %) на момент первичной диагностики в КМ при цитоморфологическом исследовании были обнаружены клетки НБ. У 13 из этих больных (25,5 %) поражение КМ было диагностировано также при проведении иммунофенотипирования. Всего же методом проточной цитометрии клетки НБ были обнаружены у 25 (49,0 %) пациентов. Еще у двоих (3,9 %) опухолевые клетки были выявлены только цитологически. Таким образом, проточная цитометрия позволила определить клетки НБ в КМ значитель-

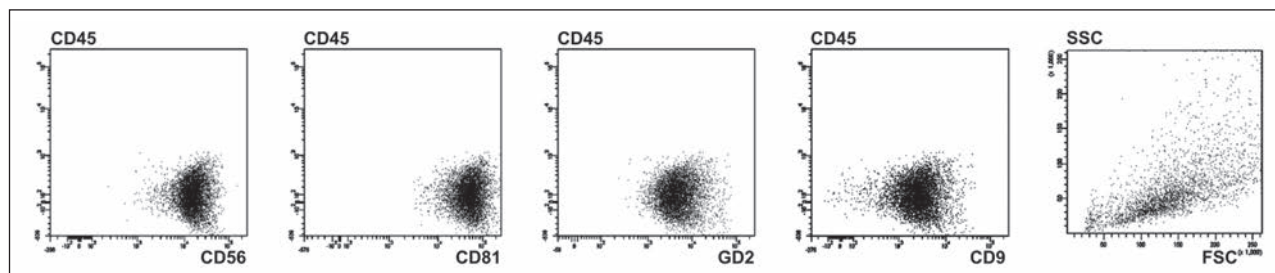


Рис. 1. Пример экспрессии CD45, CD56, CD81, GD2 и CD9 клетками нейробластомы в костном мозге, а также расположение этих клеток на скатерограмме. Клетки НБ экспрессируют CD56, CD81, GD2 и CD9. Отсутствие экспрессии CD45 отличает опухолевые клетки от гемопоэтических клеток КМ

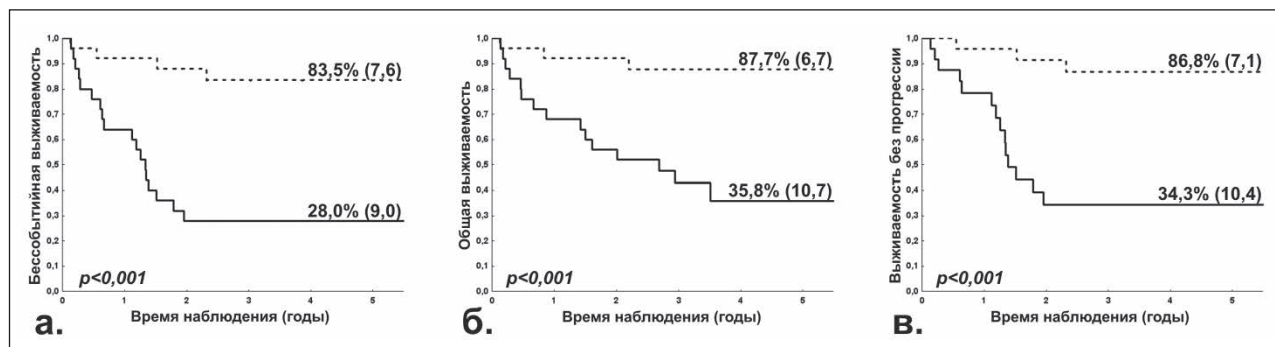


Рис. 2. БСВ (а), ОВ (б) и ВБП (в) пациентов с нейробластомой, у которых поражение КМ было (n = 25, сплошная линия) и не было (n = 26, пунктирная линия) выявлено методом проточной цитометрии

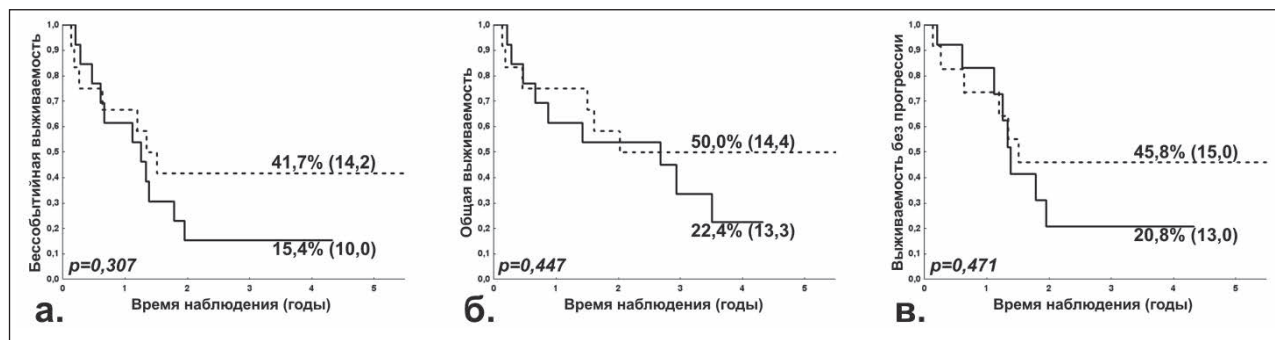


Рис. 3. БСВ (а), ОВ (б) и ВБП (в) пациентов с нейробластомой, у которых поражение КМ было выявлено только проточной цитометрией (n=12, пунктирная линия) и пациентов, у которых клетки НБ в КМ были выявлены также при цитологическом исследовании (n=13, сплошная линия)

но чаще, чем цитоморфология (49,0 % и 29,4 % соответственно, $p = 0,043$). Важно отметить, что у 9 (32,1 %) из 28 больных с локализованной опухолью (I, II и III стадии) иммунофенотипированием было определено поражение КМ.

Из 51 пациента, включенного в исследование, 29 (56,9%) находятся в полной продолжающейся ремиссии, у 17 (33,3 %) были зарегистрированы рецидив или прогрессия опухоли, а 5 (9,8 %) умерли от различных осложнений терапии. Кривые БСВ, ОВ и ВБП при разделении пациентов по результатам иммунофенотипирования, представлены на рис. 2. Таким образом, больные, у которых клетки НБ не были обнаружены в КМ методом проточной цитометрии, имели существенно лучший прогноз, по сравнению с теми, у которых иммунофенотипирование вы-

явило опухолевые клетки. Так, во второй группе неблагоприятные события были зафиксированы у 18 из 25 пациентов, в то время как в первой — только у 4 из 26.

Результаты анализа выживаемости в зависимости от данных иммунофенотипирования в разных группах пациентов представлены в табл. 3. Во всех выделенных группах больных было подтверждено прогностическое значение определения поражения КМ методом проточной цитометрии.

Пациенты, у которых поражение КМ было выявлено только методом проточной цитометрии, имели несколько лучший прогноз, по сравнению с теми, у кого клетки НБ были обнаружены также при проведении цитоморфологического исследования, однако различия в БСВ, ОВ и ВБП статистической значимости не достигли (рис. 3).

Таблица 3.

БСВ, ОВ и ВБП в различных группах пациентов в зависимости от результатов иммунофенотипирования КМ (ИФТ)

	Количество пациентов	Бессобытийная выживаемость			Общая выживаемость			Выживаемость без прогрессии		
		БСВ (%)	СО (%)	p	ОВ (%)	СО (%)	p	ВБП (%)	СО (%)	p
Все пациенты										
ИФТ(-)	26	83,5	7,6	<0,001	87,7	6,7	<0,001	86,8	7,1	<0,001
ИФТ(+)	25	28,0	9,0		35,8	10,7		34,3	10,4	
Пациенты без амплификации MYCN										
ИФТ(-)	22	89,7	6,9	<0,001	94,7	5,1	0,004	89,7	6,9	0,003
ИФТ(+)	18	38,9	11,5		53,9	12,1		47,3	12,9	
Пациенты без поражения КМ по данным цитоморфологического исследования										
ИФТ(-)	24	82,0	8,2	0,011	86,6	7,3	0,014	85,5	7,8	0,010
ИФТ(+)	12	41,7	14,2		50,0	14,4		45,8	15,0	
Пациенты без амплификации MYCN и поражения КМ по данным цитоморфологического исследования										
ИФТ(-)	20	88,5	7,6	0,030	94,1	5,7	0,046	88,5	7,6	0,088
ИФТ(+)	9	55,6	16,6		66,7	15,7		62,5	17,1	
Пациенты с локализованными стадиями (стадии I, II, III)										
ИФТ(-)	19	88,0	8,1	0,011	94,7	5,1	0,015	88,0	8,1	0,011
ИФТ(+)	9	44,4	16,6		55,6	16,6		44,4	16,6	
Пациенты со стадиями I, II, III, IVS										
ИФТ(-)	20	88,7	7,6	0,006	95,0	4,9	0,007	88,7	7,6	0,014
ИФТ(+)	13	46,2	13,8		53,8	13,8		50,3	14,4	
Пациенты со стадией IV										
ИФТ(-)	6	66,7	19,2	0,022	66,7	19,2	0,121	80,0	17,9	0,012
ИФТ(+)	12	8,3	8,0		20,8	12,6		11,6	10,9	
Пациенты младше 12 месяцев										
ИФТ(-)	10	100	(-)	0,014	100	(-)	0,035	100	(-)	0,024
ИФТ(+)	10	50,0	15,8		58,3	16,1		55,6	16,6	
Пациенты старше 12 месяцев										
ИФТ(-)	16	74,5	11,0	<0,001	80,8	10,0	0,003	79,4	10,6	0,002
ИФТ(+)	15	13,3	8,8		16,7	13,3		18,0	11,4	

Результаты анализа влияния различных прогностических факторов на БСВ представлены в табл. 4. Как видно из представленных данных, положительный результат иммунофенотипирования и амплификация MYCN независимо от других параметров ухудшали прогноз пациентов с НБ.

Обсуждение

Прогрессия нейробластомы происходит путем гематогенной и лимфогенной диссеминации опухолевых клеток [3]. При этом наиболее частыми объектами метастазирования являются лимфатические узлы, КМ, кости скелета, печень, кожа, головной мозг. КМ, наряду с периферической кровью, является наиболее доступным материалом для обнаружения метастатических клеток [3, 15]. Таким образом, инициальное определение поражения КМ клетками нейробластомы необходимо для корректного стадирования заболевания и стратификации пациентов на группы риска [15].

Так как чувствительность стандартного цитоморфологического исследования редко превышает 1×10^{-2} , развитие получили методы, позволяющие определять одну опухолевую клетку среди 10000 и даже 100000 нормальных клеток КМ. Наиболее стандартизованным и широко применяющимся на сегодняшний день методом является иммуноцитологическое исследование [5, 21]. Для его проведения наиболее часто используются моноклональные антитела к дисаialogлиозиду GD2 [5, 12, 20, 21]. Данная методика позволяет проводить морфологическую оценку анализируемых клеток, при этом аналитическая чувствительность может достигать 1×10^{-5} [5, 21]. Метод иммуноцитологии стандартизован как для выявления поражения КМ при первичной диагностике НБ, так и для оценки наличия остаточных опухолевых клеток во время терапии. Однако специфичность анти-GD2 антител в некоторых случаях вызывает сомнения, чем может быть обусловлено появление ложно-по-

Таблица 4.

Влияние различных факторов на БСВ пациентов с нейробластомой. Результаты однофакторного и многофакторного анализа

Показатель	Количество пациентов	Количество событий	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
			Отношение опасности	95 % ДИ	p	Отношение опасности	95 % ДИ	p
Результаты иммунофенотипирования КМ (ИФТ)								
ИФТ (-)	26	4	1		<0,001	1		0,002
ИФТ (+)	25	18	7,221	2,423–21,522		6,309	1,964–20,264	
Стадия								
I, II, III, IVS	33	9	1		0,003	1		0,432
IV	18	13	3,429	1,458–8,066		1,481	0,555–3,953	
Возраст								
<12 мес.	20	5	1		0,059	1		0,154
>12 мес.	31	18	2,523	0,931–6,844		2,202	0,743–6,522	
Амплификация MYCN								
Нет	40	13	1		<0,001	1		0,032
Есть	11	9	4,506	1,896–10,710		2,723	1,090–6,798	

зитивных образцов [5, 21]. Кроме того, иммуноцитологическое исследование достаточно трудоемко и трудно воспроизводимо, что не позволяет ему быть повсеместно доступным. Это привело к тому, что все чаще для выявления клеток НБ в КМ применяются другие высокочувствительные методы: проточная цитометрия, определение экспрессии опухолеассоциированных генов, оценка статуса метилирования отдельных генов с помощью ПЦР [1, 4, 6, 7, 10, 12, 16, 20, 22, 23, 24].

Применение проточной цитометрии для верификации поражения КМ при НБ основано на одновременном определении экспрессии нескольких антигенов и отсутствии экспрессии пан-лейкоцитарного антигена CD45. Таким образом, по сравнению с иммуноцитологическим исследованием, существенно снижается вероятность появления ложно-положительных результатов. Было неоднократно показано, что выявляемые при иммунофенотипировании клетки действительно являются клетками НБ [1, 10, 16, 20, 22, 23]. В то же время, по сравнению с применяемыми для решения данных задач вариантами ПЦР, результаты цитометрического исследования адекватнее соотносятся с количеством клеток НБ в КМ, а, следовательно, позволяют более точно оценить степень поражения КМ и в дальнейшем проводить более точный мониторинг ответа опухоли на терапию.

В доступной нам литературе встретилось относительно небольшое количество работ о прогностическом значении обнаружения клеток НБ в КМ именно при помощи иммунофенотипирования [1, 4]. При этом все результаты касались только пациентов с IV стадией НБ, но не оценки исхода терапии у всех больных НБ или у детей в других группах [1, 4].

В нашем исследовании данные проточной цитометрии разделили всех пациентов на две практически равные группы (26 и 25 человек соответственно). При этом те больные, у которых иммунофенотипирование дало положительный результат имели существенно худший прогноз, по сравнению с теми, у кого результат был отрицательным (рис. 2, табл. 3). Свое прогностическое значение иммунофенотипирование сохранило и в многовариантном анализе, оставшись значимым прогностическим фактором на фоне других традиционных параметров, таких как стадия опухоли, возраст и амплификация гена MYCN. Кроме того, прогностическое значение результатов проточной цитометрии было отмечено и в различных группах пациентов, проанализированных по отдельности. Так, иммунофенотипирование четко разделяло пациентов на две группы с существенно разным прогнозом среди больных, у которых при стандартном цитологическом исследовании поражение КМ выявлено не было. Это, а также более частое обнаружение клеток НБ в КМ при проведении иммунофенотипирования, в сравнении со стандартной цитоморфологией, подтверждает важное значение проточной цитометрии как метода определения поражения КМ. Так как амплификация гена MYCN является важнейшим неблагоприятным прогностическим фактором, значимым представляется также то, что иммунофенотипирование позволило четко разделить пациентов с разным прогнозом и в группе больных, у которых амплификация MYCN выявлена не была. Сходные тенденции были получены также у пациентов без амплификации MYCN, у которых поражение КМ не было выявлено цитологически. Пациенты со стадией IV имеют худший прогноз по сравнению с больными, у которых диагно-

стирована опухоль в стадии I, II, III, или IVS. Однако, и внутри этих групп больных при помощи проточной цитометрии удалось выделить детей с лучшим и худшим прогнозом. Наконец, методом проточной цитометрии клетки НБ были обнаружены в КМ почти у трети больных, у которых не было выявлено никаких других очагов метастазирования, т.е. пациентов с локализованной НБ (стадии I, II, III). И в этой группе при позитивном результате иммунофенотипирования прогноз был существенно хуже. Исход терапии у пациентов младше 12 месяцев значительно лучше, по сравнению с более старшими детьми. Однако, в обеих группах больных (младше и старше 1 года) выявление опухолевых клеток в КМ при помощи иммунофенотипирования определяло худший прогноз. Таким образом, можно заключить, что проточная цитометрия позволяет точно выявлять пациентов с разным прогнозом не только среди всех пациентов, но и в отдельных группах, выделенных по другим критериям стратификации.

Существенно более частое выявление поражения КМ методом проточной цитометрии по сравнению со стандартным цитологическим исследованием достаточно просто объяснить более высокой чувствительностью иммунофенотипирования. В то же время, у двух пациентов опухолевые клетки в КМ были обнаружены только цитологически. Вероятным объяснением такого расхождения может быть то, что у обоих больных иммунофенотипирование проводилось только для одной точки пункции КМ, в то время как цитологически исследовался КМ, взятый из другой локализации. Поэтому причиной получения разных результатов может быть в данном случае мозаичность поражения КМ при НБ. Интересно отметить, что выявление опухолевых клеток при цитологическом исследовании ухудшало прогноз у пациентов с позитивным результатом иммунофенотипирования, однако статистической значимости эти различия не достигли.

В целом, можно говорить о том, что выявление опухолевых клеток в КМ методом проточной цитометрии потенциально может учитываться совместно с другими факторами при выборе стратегии лечения пациентов с НБ. Тем не менее, необходимо уточнение прогностического значения полученных результатов иммунофенотипирования на большем количестве пациентов в рамках крупных кооперативных исследований.

Выводы.

1. Выявление опухолевых клеток методом проточной цитометрии в костном мозге паци-

ентов с нейробластомой является независимым неблагоприятным прогностическим фактором.

2. Результаты проточной цитометрии сохраняют свое прогностическое значение в группах пациентов, выделенных по другим стратификационным критериям.
3. Для исключения ложнонегативных результатов, вызванных мозаичностью поражения, иммунофенотипирование костного мозга пациентам с нейробластомой необходимо проводить в образцах, взятых одновременно из нескольких локализаций при проведении аспирационной пункции КМ.
4. Необходимо продолжить исследование применения проточной цитометрии в рамках крупных кооперативных многоцентровых исследований по терапии нейробластомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bozzi, F. Detecting CD56+/NB84+/CD45—immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry / F. Bozzi, F. Gambirasio, R. Luksch et al // *Anticancer Res.* — 2006. — Vol. 26. — P. 3281–3288.
2. Brodeur, G.M. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment / G.M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold et al // *J. Clin. Oncol.* — 1993. — Vol. 11. — P. 1466–1477.
3. Brodeur, G.M. Neuroblastoma. / G.M. Brodeur, T. Sawada, Y. Tsuchida. — New York: Elsevier Science, 2000. — P. 21.
4. Cai, J.Y. Minimal residual disease is a prognostic marker for neuroblastoma with bone marrow infiltration / J.Y. Cai, C. Pan, Y.J. Tang et al. // *Am. J. Clin. Oncol.* — 2012. — Vol. 35. — P. 275–278.
5. Cheung, N.K. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies / N.K. Cheung, D.D. Von Hoff, S.E. Strandjord, P.F. Coccia // *J. Clin. Oncol.* -1986. — Vol. 3. — P. 363–369.
6. Cheung, I.Y. Detection of microscopic neuroblastoma in marrow by histology, immunocytology, and reverse transcription-PCR of multiple molecular markers / I.Y. Cheung, D. Barber, N.K. Cheung // *Clin. Cancer Res.* — 1998. — Vol. 4. — P. 2801–2805.
7. Cheung, I.Y. Quantification of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR / I.Y. Cheung, N.K.V. Cheung // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 1698–1705.
8. Cohn, S.L. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report / S.L. Cohn, A.D. Pearson, W.B. London et al // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 2. — P. 289–297.
9. Cox, D.R. Regression models and life-tables / D.R. Cox // *J. R. Stat. Soc. B.* — 1972. — Vol. 34. — P. 187–220.
10. Esser, R. Detection of neuroblastoma cells during clinical follow up: advanced flow cytometry and rt-PCR for tyrosine hydroxylase using both conventional and real-time PCR / R. Esser, W. Glienne, K. Bochennek et al // *Klin. Padiatr.* — 2011. — Vol. 6. — P. 326–331.
11. Grovas, A. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States /

- A. Grovas, A. Fremgen, A. Rauck et al // *Cancer*. — 1997. — Vol. 12. — P. 2321–2332.
 12. Ifversen, M.R.S. Comparison of immunocytochemistry, real-time quantitative RT-PCR and flow cytometry for detection of minimal residual disease in neuroblastoma / M.R.S. Ifversen, B. Kagedal, L.D. Christensen et al. // *Int. J. Oncol.* — 2005. — Vol. 27. — P. 121–129.
 13. Kaplan, E. Non-parametric estimation from incomplete observations / E. Kaplan, P. Meier // *J. Am. Stat. Assoc.* — 1958. — Vol. 53. — P. 457–481.
 14. Ladenstein, R. Randomized trial of prophylactic granulocyte colony-stimulating factor during rapid COJEC induction in pediatric patients with high-risk neuroblastoma: the European HR-NBL1/SIOPEN study // R. Ladenstein, D. Valteau-Couanet, P. Brock et al // *J. Clin. Oncol.* — 2010. — Vol. 28. — P. 3516–3524.
 15. Monclair, T. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report / T. Monclair, G.M. Brodeur, P.F. Ambros et al // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27. — P. 298–303.
 16. Okcu, M.F. Flow cytometry and fluorescence in situ hybridization to detect residual neuroblastoma cells in bone marrow / M.F. Okcu, R.Y. Wang, C. Bueso-Ramos et al. // *Pediatr. Blood Cancer*. — 2005. — Vol. 45. — P. 787–795.
 17. Schmidt, M. Is there a benefit of 131 I-MIBG therapy in the treatment of children with stage 4 neuroblastoma? A retrospective evaluation of The German Neuroblastoma Trial NB97 and implications for The German Neuroblastoma Trial NB2004 / M. Schmidt, T. Simon, B. Hero et al // *Nuklearmedizin*. — 2006. — Vol. 45. — P. 145–151.
 18. Stutterheim, J. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma / J. Stutterheim, A. Gerritsen, L. Zappeij-Kannegieter et al // *J. Clin. Oncol.* — 2008. — Vol. 26. — P. 5443–5449.
 19. Stutterheim, J. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers / J. Stutterheim, A. Gerritsen, L. Zappeij-Kannegieter et al // *Clin. Chem.* — 2009. — Vol. 55. — P. 1316–1326.
 20. Swerts, K. Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: comparison of flow cytometry with immunocytochemistry / K. Swerts, B. De Moerloose, C. Dhooze et al. // *Cytometry B Clin Cytometry*. — 2004. — Vol. 61B. — P. 9–19.
 21. Swerts, K. Standardization of the immunocytochemical detection of neuroblastoma cells in bone marrow / K. Swerts, P.F. Ambros, C. Brouzes et al // *J. Histochem. Cytochem.* — 2005. — Vol. 53. — P. 1433–1440.
 22. Tsang, K.S. Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction / K.S. Tsang, C.K. Li, W.C. Tsoi et al. // *Cancer*. — 2003. — Vol. 97. — P. 2887–2897.
 23. Warzynski, M.J. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients / M.J. Warzynski, D.M. Graham, R.A. Axtell et al. // *Cytometry B Clin Cytometry*. — 2002. — Vol. 50. — P. 298–304.
 24. Warzynski, M.F. Availability of conjugated ganglioside GD2 monoclonal antibody / M.J. Warzynski, J.L. Roys, J.W. Peterson, H. DeLa Vega // *Cytometry B Clin Cytometry*. — 2005. — Vol. 65B. — P. 42–43.
 25. Yanik, G.A. Semiquantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children's oncology group / G.A. Yanik, M.T. Parisi, B.L. Shulkin et al // *J. Nucl. Med.* — 2013. — Vol. 54. — P. 541–548.
- A.M. Popov^{1,2,3}, E.V. Shorikov^{1,2}, T.Yu. Verzhbitskaya^{1,2},
G.A. Tsaur^{1,2}, A.E. Druy^{1,2}, A.G. Solodovnikov²,
L.I. Saveliev^{1,2,3}, L.G. Fechina^{1,2}*

THE PROGNOSTIC VALUE OF THE DETECTION OF BONE MARROW LESION IN CHILDREN WITH NEUROBLASTOMA BY FLOW CYTOMETRY

¹Regional Children's Clinical Hospital № 1
²Institute of Medical Cell Technologies
³Ural State Medical University Ekaterinburg

The purpose of the study was to evaluate the prognostic value of the detection of tumor cells in the bone marrow (BM) in children with neuroblastoma (NB) by flow cytometry. The detection of tumor cells was performed in BM of 51 patients with NB (24 boys and 27 girls) aged from 6 days to 15 years (median — 1 year 3 months). Flow cytometry allowed determining NB cells in BM in a much larger number of cases than cytomorphology (49.0 % and 29.4 % of patients, respectively). Patients, in whom NB cells were not detected in BM by flow cytometry, had significantly better event-free and overall survival rates as well as progression free survival (83,5 %, 87,7 % and 86,8 %, respectively) compared with those in whom immunophenotyping revealed the tumor cells (28,0 %, 35,87 % and 34,3 %, respectively). The prognostic value of the detection of BM lesion by flow cytometry was also confirmed in selected groups of patients with other criteria of stratification. Therefore the detection of tumor cells in BM by flow cytometry could potentially be considered in conjunction with other factors in choosing treatment strategy in patients with NB.

Key words: children, bone marrow, neuroblastoma, flow cytometry

Поступила в редакцию 29.01.2014 г.