ISSN 1818-8346

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

20 лет Федеральному научно-клиническому центру детской гематологии, онкологии и иммунологии

Острый миелоидный лейкоз с t(8;21) у детей

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при ювенильном миеломоноцитарном лейкозе

Биологические свойства гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови

1

2011

Энплейт
ромиплостим

ПРЕПАРАТ НОВОГО ТИПА!

Новый подход к лечению хронической ИТП у взрослых

Уверенность в оптимальном уровне тромбоцитов

- Энплейт — это первый препарат, благодаря которому контролируется уровень тромбоцитов[1–2].
- Энплейт эффективен у 83 % больных в исследованиях 3-й фазы в сравнении с 7% пациентов в контрольной группе[3].
- Стойкий ответ со снижением потребности в иммунодепрессантах.

Краткая информация о препарате ЭНПЛЕЙТ (NPLATE)

ромиплостим (romiplostim)

Порошок для приготовления раствора для подкожного введения 250 мкг, 500 мкг (500 мкг/мл).

ПОЖАЛУЙСТА, ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ПОЛНОЙ ИНСТРУКЦИЕЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ ПРЕПАРАТА.

Регистрационный номер: ЛСР-007739/09 от 01.10.2009 г.

● **Фармакологические свойства.** Ромиплостим производится путем рекомбинантной ДНК-технологии с использованием штамма Escherichia coli (E. coli). Ромиплостим представляет собой Fc-пептидилированный белок (пептидное антитело), участвующий в проведении сигнала и активации внутриклеточной транскрипции посредством связывания с рецепторами тромбопоэтина и индуцирующий увеличение образования тромбоцитов. ● **Показания к применению.** Хроническая идиопатическая (иммунная) тромбоцитопеническая пурпура у взрослых пациентов после спленэктомии, резистентных к другим видам лечения (например, глюкокортикостероидам, иммуноглобулинам). Энплейт может применяться в качестве терапии второй линии у пациентов с сохраненной селезенкой при противопоказаниях к спленэктомии. ● **Противопоказания.** Гиперчувствительность к действующему веществу препарата, к любому из вспомогательных веществ или к белкам E. coli. ● **Способ применения.** После разведения порошка раствор для инъекций Энплейт следует вводить подкожно. Объем инъекции может быть очень небольшим. Следует использовать шприц с делениями по 0,01 мл. ● **Начальная доза.** Начальная доза ромиплостима составляет 1 мкг/кг фактической массы тела. При расчете дозы ромиплостима в начале лечения всегда следует использовать расчет относительно массы тела. При последующей коррекции дозы следует основываться исключительно на изменениях количества тромбоцитов и увеличивать дозировку на 1 мкг. ● **Подбор дозы.** Еженедельную дозу ромиплостима следует повышать с шагом 1 мкг/кг массы тела до тех пор, пока количество тромбоцитов у пациента не достигнет $\geq 50\times10^9$/л. Количество тромбоцитов следует оценивать еженедельно до тех пор, пока не будет достигнуто стабильное количество ($\geq 50\times10^9$/л по крайней мере в течение 4 недель без коррекции дозы). В дальнейшем следует оценивать количество тромбоцитов ежемесячно. Не следует превышать максимальную еженедельную дозу 10 мкг/кг. ● **Прекращение лечения**. Лечение ромиплостимом следует прекратить, если количество тромбоцитов не увеличивается до уровня, достаточного для предотвращения клинически значимого кровотечения после 4 недель терапии ромиплостимом в максимальной дозе 10 мкг/кг. Необходимо периодическое клиническое обследование пациента, и на индивидуальной основе врач должен принимать решение о продолжении лечения. После отмены лечения возможен рецидив тромбоцитопении. Подробная информация о режиме дозирования приведена в инструкции по применению препарата. ● **Побочное действие.** Очень часто (≥1/10) отмечалась головная боль; часто (>1/100 — <1/10) — изменения костного мозга, тромбоцитопения, бессонница, головокружение, парестезии, мигрень, гиперемия, легочная эмболия, тошнота, диарея, боль в животе, диспепсия, запор, зуд, экхимозы, сыпь, артралгия, миалгия, боль в конечностях, мышечный спазм, боль в спине, боль в костях, утомляемость, покраснение в месте инъекции, боль в месте инъекции, периферический отек, гриппоподобный синдром, боль, астения, лихорадка, озноб, гематома в месте инъекции, уплотнение в месте инъекции, ушиб. Также поступали отдельные сообщения о развитии следующих реакций: тромбоцитоз, тромбоцитопения после прекращения лечения, повышение концентрации ретикулина в костном мозге. ● **Особые указания.** Как и все терапевтические протеины, ромиплостим обладает потенциальной иммуногенностью. В случае подозрения на образование нейтрализующих антител следует связаться с официальным представителем компании в Российской Федерации для проведения анализа на антитела. После отмены ромиплостима возможен рецидив тромбоцитопении. В случае если отмена ромиплостима происходит на фоне применения антикоагулянтов или антиагрегантов, повышается риск кровотечения. Перед началом и во время лечения ромиплостимом рекомендуется проводить исследования мазка периферической крови и подсчет количества клеток крови, в т. ч. для своевременного определения повышения концентрации ретикулина. В случае потери эффективности, или обнаружения патологии в мазке периферической крови у пациента следует отменить ромиплостим, провести физикальное обследование и рассмотреть вопрос о проведении биопсии костного мозга с окрашиванием на ретикулин. Стимуляторы рецепторов ТПО являются факторами роста, которые приводят к росту клеток — предшественников гемопоэза, дифференцировке и выработке тромбоцитов. Рецепторы ТПО преимущественно располагаются на поверхности клеток миелоидного ряда. Существует теоретический риск, что стимуляторы рецепторов ТПО могут стимулировать прогрессирование имеющихся злокачественных заболеваний системы кроветворения или МДС. При потере ответа на лечение или невозможности поддержания стабильного количества тромбоцитов при лечении ромиплостимом в рекомендованных дозах необходимо установить причинные факторы, включая иммуногенность и увеличение концентрации ретикулина в костном мозге.

Ссылки: 1. Инструкция по препарату Энплейт. **2.** Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. J. Clin. Invest. 2005; 115: 3339—3347. **3.** Kuter D. J., Bussel J. B., Lyons R. M., et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double–blind randomised controlled trial. Lancet. 2008; 371: 395—403.

AMGEN
ООО «Амджен»
123317, Москва, Пресненская набережная, дом 10, блок С, 4-й этаж.
Тел.: +7 (495) 641–18–68 • Факс: +7 (495) 641–18–72
AMG-RU-NPL-013-2010

Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOHEMATOLOGY

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР
проф., д.м.н. **Е.В. Самочатова**
Заместители главного редактора
д.м.н. **В.В. Птушкин,**
проф., д.м.н. **Б.В. Афанасьев**
Ответственный секретарь
к.м.н. **Ю.В. Румянцева**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ
проф., д.м.н. **О.В. Алейникова** *(Минск)*
проф., д.м.н. **А.К. Голенков** *(Москва)*
проф., д.м.н. **А.И. Карачунский** *(Москва)*
д.м.н. **Е.Н. Паровичникова** *(Москва)*
проф., д.м.н. **Ю.А. Криволапов** *(С.-Петербург)*
доц., д.м.н. **М.Л. Минков** *(Австрия)*
д.м.н. **Н.В. Мякова** *(Москва)*
к.м.н. **Е.А. Никитин** *(Москва)*
проф., д.м.н. **О.А. Рукавицын** *(Москва)*
проф., д.м.н. **С.А. Румянцев** *(Москва)*
д.м.н. **Г.И. Сидорович** *(Москва)*
к.м.н. **Л.Г. Фечина** *(Екатеринбург)*
д.м.н. **А.Л. Усс** *(Минск)*

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
проф., д.м.н. **Е.А. Лукина** *(Москва)*
чл.-корр. РАМН **И.В. Поддубная** *(Москва)*
чл.-корр. РАМН **А.Г. Румянцев** *(Москва)*
к.м.н. **В.А. Россиев** *(Самара)*
проф., д.м.н. **А.Г. Талалаев** *(Москва)*

EDITOR-IN-CHIEF
Prof. **Ye.V. Samochatova**
Deputy Editor
D. Sci. **V.V. Ptushkin,**
Prof. **B.V. Afanasiev**
Executive Secretary
PhD **Yu.V. Rumyantseva**

EDITORIAL BOARD
Prof. **O.V. Aleynikova** *(Minsk)*
Prof. **A.K. Golenkov** *(Moscow)*
Prof. **A.I. Karachunskiy** *(Moscow)*
D. Sci. **Ye.N. Parovichnikova** *(Moscow)*
Prof. **Yu.A. Krivolapov** *(St.-Petersburg)*
D. Sci. **M.L. Minkov** *(Austria)*
D. Sci. **N.V. Myakova** *(Moscow)*
PhD **Ye.A. Nikitin** *(Moscow)*
Prof. **O.A. Rukavitsyn** *(Moscow)*
Prof. **S.A. Rumyantsev** *(Moscow)*
D. Sci. **G.I. Sidorovich** *(Moscow)*
PhD **L.G. Fechina** *(Yekaterinburg)*
D. Sci. **A.L. Uss** *(Minsk)*

EDITORIAL COUNCIL
Prof. **Ye.A. Lukina** *(Moscow)*
Prof. **I.V. Poddubnaya** *(Moscow)*
Prof. **A.G. Rumyantsev** *(Moscow)*
PhD **V.A. Rossiyev** *(Samara)*
Prof. **A.G. Talalayev** *(Moscow)*

Основан в 2005 г.

Адрес редакции:
Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр.15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
www.abvpress.ru
e-mail: abv@abvpress.ru

Заведующая редакцией **Т.В. Клюковкина**
Корректор **В.В. Калинина**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **А.Р. Комлев**
Служба подписки и распространения
В.Ю. Тимохина, +7 (499) 929-96-19
e-mail: baza@abvpress.ru
Служба рекламы
В.А. Клюковкин, +7 (499) 929-96-19
e-mail: gm@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) ПИ №ФС77-36928 от 21 июля 2009 г.

При полной или частичной перепечатке материалов ссылка на журнал «Онкогематология» обязательна.

Редакция не несет ответственности за содержание публикуемых рекламных материалов.

В статьях представлена точка зрения авторов, которая может не совпадать с мнением редакции.

ISSN 1818-8346
Онкогематология. 2011. № 1. 1–86
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2011

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — 42167

Отпечатано в типографии
ООО «Графика»

Тираж 3000 экз.

1
2011

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции 4

К 20-ЛЕТИЮ ФЕДЕРАЛЬНОГО НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКОГО ЦЕНТРА ДЕТСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

А.Г. Румянцев
Научно-практическая деятельность Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России (1991–2011 гг.) 5

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

И.И. Калинина, М.М. Шнейдер, Н.П. Кирсанова, Д.Д. Байдильдина, Е.В. Сунцова, О.В. Горонкова, Л.А. Хачатрян, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан, Р.И. Юцкевич, Е.В. Волочник, Т.В. Савицкая, Н.В. Минаковская, И.В. Пролесковская, И.В. Емельянова, О.В. Карась, Н.В. Мигаль, Ю.Е. Марейко, А.Г. Дреков, Ю.В. Румянцева, Е.В. Флейшман, Т.В. Наседкина, О.В. Алейникова, А.А. Масчан
Клинические и генетические особенности острого миелоидного лейкоза с t(8;21) у детей и результаты терапии по протоколу ОМЛ-ММ-2000 11

А.Г. Румянцев, В.В. Птушкин, С.В. Семочкин
Пути улучшения результатов лечения злокачественных опухолей у подростков и молодых взрослых 20

Е.В. Самочатова, Л.Н. Шелихова
Лечение неходжкинских лимфом и острого лейкоза из зрелых В-клеток у детей и подростков по данным региональных российских клиник 30

Р.И. Феоктистов, Ю.Г. Абугова, Ю.Ю. Дьяконова, О.В. Макарова, Н.В. Мякова
Функция щитовидной железы после комбинированной терапии болезни Ходжкина у детей и подростков 35

И.И. Калинина, Д.В. Литвинов, И.В. Веселова, Н.И. Пономарева, Л.Н. Шелихова, В.В. Фоминых, Г.А. Клясова, А.А. Масчан
Эпидемическая вспышка кандидемий, вызванных необычными видами *Candida non-albicans*: закономерности клинического течения и поиски источника 39

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

М.А. Масчан, Л.А. Хачатрян, Ю.В. Скворцова, Е.Е. Курникова, Д.А. Шашелева, В.О. Бобрынина, Д.Н. Балашов, Е.В. Скоробогатова, Д.Д. Байдильдина, Г.А. Новичкова, А.А. Масчан
Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при ювенильном миеломоноцитарном лейкозе: анализ опыта одного центра и обзор литературы 45

ФАРМАКОТЕРАПИЯ

В.В. Птушкин, С.В. Миненко, Э.Р. Биячуев, А.В. Пшонкин, А.В. Шубина
Лечение больных с резистентной иммунной тромбоцитопенией: обзор литературы и клинические наблюдения 56

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

С.А. Румянцев, Е.Ю. Осипова, С.Е. Ипатов, Т.В. Шаманская, О.А. Майорова, А.Г. Румянцев
Биологические свойства гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови 64

ЛЕКЦИИ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Д.А. Домнинский
Молекулярные механизмы лейкозогенеза. Механизмы реализации сигнальной трансдукции 76

ПРЕСС-РЕЛИЗ

Спрайсел одобрен в России для взрослых пациентов с впервые выявленным хроническим миелоидным лейкозом 85

CONTENTS

From edition 4

20th ANNIVERSARY OF RESEARCH CENTER OF PEDIATRIC HEMATOLOGY, ONCOLOGY AND IMMUNOLOGY

A.G. Rumyantsev
Research and clinical activities of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (1991–2011) 5

HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

I.I. Kalinina, M.M. Shneyder, N.P. Kirsanova, D.D. Baydildina, E.V. Suntsova, O.V. Goronkova, L.A. Khachatryan, G.A. Novichkova, M.A. Maschan, R.I. Yutskevich, E.V. Volochnik, T.V. Savitskaya, N.V. Minakovskaya, I.V. Proleskovskaya, I.V. Emelyanova, O.V. Karas, N.V. Migal, Yu.E. Mareyko, A.G. Drekov, J.V. Rumyantseva, E.V. Fleyshman, T.V. Nasedkina, O.V. Aleynikova, A.A. Maschan
Clinical and genetic characteristics of acute myeloid leukemia with t (8;21) in children and results of therapy according to protocol AML-MM-2000 11

A.G. Rumyantsev, V.V. Ptushkin, S.V. Semochkin
Approaches to improvement of treatment results of malignant tumors in adolescents and young adults 20

Ye.V. Samochatova, L.N. Shelikhova
Treatment of non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute leukemia in children and adolescents: data of Russian regional hospital 30

R.I. Feoktistov, Y.G. Abugova, Y.Y. Dyakonova, O.V. Makarova, N.V. Myakova
Thyroid function in children and adolescents after combined therapy of Hodgkin disease 35

I.I. Kalinina, D.V. Litvinov, I.V. Veselova, N.I. Ponomareva, L.N. Shelikhova, V.V. Fominykh, G.A. Klyasova, A.A. Maschan
Epidemic outbreak of candidemia caused by unusual types of *Candida non-albicans*: clinical course patterns and search for the source 39

HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

M.A. Maschan, L.A. Khachatryan, Yu.V. Skvortsova, E.E. Kurnikova, D.A. Shasheleva, V.O. Bobrynina, D.N. Balashov, E.V. Skorobogatova, D.D. Baydildina, G.A. Novichkova, A.A. Maschan
Hematopoietic stem cell transplantation in juvenile myelomonocytic leukemia: analyse of one center experience and literature review 45

PHARMACOTHERAPY

V.V. Ptushkin, S.V. Minenko, E.R. Biyachuev, A.V. Pshonkin, A.V. Shubina
Treatment of patients with refractory immune thrombocytopenia: literature review and case report 56

BASIC RESEARCH

S.A. Rumyantsev, E.Yu. Osipova, S.E. Ipatov, T.V. Shamanskaya, O.A. Mayorova, A.G. Rumyantsev
Biological properties of cord blood hematopoietic stem cells 64

LECTURES

D.A. Domninskiy
Molecular mechanisms of leukaemogenesis. Mechanisms of signal transduction 76

PRESS RELEASE

Spraysel is approved in Russia for adult patients with primary chronic myeloid leukemia 85

Дорогие коллеги и друзья!

Создание в 1991 г. Научно-исследовательского института детской гематологии МЗ РФ (постановление СМ РФ № 20 от 14.01.1991) явилось важной вехой в развитии детской гематологии и онкологии. В России до 90-х годов прошлого века результаты лечения практически всех онкологических заболеваний у детей значительно отставали от результатов в ведущих странах Европы и США. В этот период времени в мировую практику были внедрены современные протоколы терапии, основанные на комплексном и программном применении различных химиотерапевтических препаратов и лучевой терапии. Это позволило добиться выдающихся результатов — выживаемость пациентов при ряде состояний достигла 70–80%. В нашей стране острые лейкозы, лимфомы, тяжелая форма апластической анемии, ряд наследственных заболеваний кроветворной ткани и солидные опухоли оставались основной причиной неудач терапии пациентов детского возраста, а их диагноз рассматривался только в контексте продления жизни, но не излечения.

Институт был открыт в сложное для страны время, экономический кризис обострил существующие проблемы: отсутствие современных клиник, диагностических возможностей, лекарственных препаратов, подготовленных для решения сложных задач специалистов детских гематологов/онкологов. Наряду с трудностями этот период открыл большие возможности для международного сотрудничества российских и западных специалистов, что позволило во многом восполнить имеющиеся пробелы и объединить гематологов/онкологов в рамках единых программ терапии.

За последние 20 лет НИИ детской гематологии МЗ РФ, с 2005 г. — Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России (ФНКЦ ДГОИ), стал лидером в детской гематологии и онкологии в РФ. Большая заслуга в создании и дальнейшем развитии института принадлежит директору, чл.-корр. РАМН, профессору А.Г. Румянцеву и его соратникам — профессору Е.Б. Владимирской, профессору Е.В. Самочатовой, профессору А.А. Масчану, профессору Г.А. Новичковой, профессору А.И. Карачунскому и др. Энтузиазм и подвижнический труд отличает сотрудников института. Под руководством А.Г. Румянцева в РФ создана система организации детской гематологической службы, позволяющая в любых, даже самых отдаленных уголках страны, проводить современную диагностику и терапию детям с различными заболеваниями системы крови.

Внедрение современных протоколов и адекватное лечение привели к существенному улучшению результатов терапии детей в России, увеличению продолжительности жизни, а во многих случаях — к полному излечению считавшихся ранее фатальными гематологических заболеваний.

Основные научные направления центра — проведение фундаментальных и прикладных исследований в области возрастной гематологии, онкологии, иммунологии и трансфузиологии, научно-методическое руководство республиканскими и региональными центрами детской гематологии/онкологии РФ.

Среди достижений института необходимо отметить создание на международном уровне кооперированных программ по химиотерапии острого лимфобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза, лимфом, опухолей мозга, современных методов терапии депрессий кроветворения различного генеза, врожденных и наследственных заболеваний с помощью трансплантации костного мозга.

Сотрудниками ФНКЦ ДГОИ выполнены фундаментальные исследования в области изучения стволовых гемопоэтических и мезенхимальных клеток, полученных из различных источников (костный мозг, пуповинная кровь), патологии эритрона.

Неотъемлемой частью работы центра является педагогическая деятельность — организация семинаров, симпозиумов, ежегодных рабочих совещаний руководителей центров, выездных циклов для педиатров, гематологов, онкологов. В течение многих лет ФНКЦ ДГОИ остается ведущим учреждением в подготовке врачей для практического здравоохранения — клинических ординаторов, а также научных кадров — аспирантов, докторантов по педиатрии, гематологии, детской онкологии.

В преддверии открытия нового клинико-лабораторного комплекса зданий ФНКЦ ДГОИ желаю дальнейшего развития, свершений в области клинической и фундаментальной медицины, сотрудникам — здоровья и личного счастья.

В Международный день защиты детей это событие будет лучшим подарком нашим маленьким пациентам и их родителям!

Директор Института детской гематологии
и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова,
профессор **Б.В. Афанасьев**

Научно-практическая деятельность Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России (1991–2011 гг.)

Согласно Распоряжению Правительства Российской Федерации № 1256-р от 19 августа 2005 г. Научно-исследовательский институт детской гематологии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (НИИДГ), который был организован в 1991 г. на основании Постановления Совета Министров РСФСР за № 20, был переименован в Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России (ФНКЦ ДГОИ). И в этом году нам исполняется 20 лет.

Это не слишком большой возраст, однако эти годы пришлись на очень сложное, переломное время, что отложило свой отпечаток на нашу судьбу. Институт был создан на рубеже не только веков и тысячелетий, но целых эпох. В этот краткий по продолжительности, но очень емкий по событиям отрезок времени произошел разлом в жизни нашей страны — распад СССР и выделение России как самостоятельного государства. Это было великое время, стремительно рушились создаваемые 10-летиями жизненные рамки — с устаревшей и непродуктивной материально-технической базой, несовершенными косными законами, психологическими установками населения. В один краткий миг развалилась казавшаяся незыблемой исполнительная власть, исчезли все и всякие границы. Появились новые друзья — на помощь нашей стране пришло все мировое сообщество, интенсивно развивались международные контакты, появилось ощущение свободы, уверенность в том, что возможны совершенно новые организационные решения, отчетливое осознание того, что «...нет национальной науки, как нет национальной таблицы умножения» (А.П. Чехов). Как в калейдоскопе менялись правительства, принимались и не исполнялись решения, очевидным было только одно — надо что-то делать с нашей медициной, но непонятно, как и какие задачи решать в первую очередь.

Как любая юбилейная, наша дата заставляет осмыслить успехи и неудачи проделанного пути, подвести некоторые итоги и определить грядущие рубежи развития. Ведь создание института продиктовано запросом времени — необходимостью преодоления резкого отставания страны в области лечения гематологических и онкологических заболеваний у детей и подростков, которые, несмотря на относительно редкую встречаемость, вносят существенный вклад в структуру детской инвалидности и смертности и влияют на состояние здоровья нации. Важным фактором было то, что в этой области медицины сложилась уникальная среда единомышленников и профессионалов, воспитанных на кафедре детских болезней РГМУ им. Н.И. Пирогова под руководством удивительно талантливого человека — профессора Натальи Сергеевны Кисляк, рядом с которой были сотрудники первого в СССР отделения детской гематологии (организовано в 1964 г.) старейшей в Москве Морозовской детской клинической больницы — профессор Л.А. Махонова и замечательные клиницисты Е.А. Морозова и А.А. Мазо.

Важным событием, обратившим внимание государства на проблемы детской гематологии/онкологии, стала авария на Чернобыльской АЭС в связи с ожиданием увеличения заболеваемости детей лейкемиями и другими онкологическими заболеваниями. Правительственная медицинская комиссия по выяснению последствий аварии на загрязненных территориях, в составе которой были ведущие специалисты СССР, приступила к работе спустя 7 месяцев после аварии. Мне, как главному гематологу Минздрава, была поручена организация отделения гематологии для детей загрязненных радионуклидами областей РСФСР в строящейся в Москве Республиканской больнице. Оно начало работу осенью 1987 г., научное и клинико-лабораторное руководство осуществляли я (зав. кафедрой поликлинической педиатрии РГМУ) и научный сотрудник лаборатории гематологии при кафедре педиатрии № 1 Е.В. Самочатова (ныне заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор, руководитель отдела гематологии и ТКМ ФНКЦ ДГОИ). В 1988 г. на базе отделения была организована научная группа детской гематологии Гематологического научного центра (бывший ЦОЛИПК) Минздрава СССР, в состав которой были приглашены также д.м.н. Е.Б. Владимирская (ныне заслуженный деятель науки РФ, профессор, с 1991 по 2006 г. — заместитель директора по науке НИИДГ), к.м.н. Л.В. Байдун (ныне заведующая гематологической лабораторией РДКБ Минздравсоцразвития), к.м.н. Н.В. Замараева (ныне д.м.н., руководитель лаборатории клеточных культур РДКБ Минздравсоцразвития) и два молодых врача А.А. Масчан (ныне д.м.н., профессор, заместитель директора ФНКЦ ДГОИ)

и О.И. Крыжановский (ныне к.м.н., руководитель отдела гематологии и трансплантации костного мозга Университета Беркли, Калифорния, США). В последующие 3 года эта группа врачей и исследователей вела работу по оптимизации методов диагностики и протоколов лечения гемобластозов, организации службы крови в педиатрии, изучению влияния инкорпорированных радионуклидов на гемопоэз и иммунную систему детей различных возрастных групп — от новорожденных до подростков. Мы также принимали участие в ликвидации последствий землетрясения в Армении (лечение краш-синдрома у пострадавших детей).

Переломным моментом стала организация международного сотрудничества в области диагностики и лечения гемобластозов и солидных опухолей у детей. В феврале 1990 г. мы впервые собрали в исторической усадьбе Поленово Тульской области около 300 детских гематологов и онкологов СССР и провели международную обучающую школу, что имело удивительные последствия — с 1990 г. началось внедрение международных протоколов лечения детей, больных гемобластозами, в практику отечественного здравоохранения.

Начиная с осени 1990 г. врачи из России, Беларуси и Украины стали выезжать на учебу в разные клиники Германии (Университетские клиники Берлина, Мюнстера и других городов) и Австрии (Больница Св. Анны, Вена), а затем при поддержке различных организаций в США и Францию, в частности, в знаменитую Больницу Св. Иуды, известную как одна из лучших клиник детской гематологии/онкологии, — организуемые с помощью Методистской церкви г. Мемфиса. В 1990 г. был организован благотворительный фонд «Гематологи мира — детям», зарегистрированный как общественная организация под номером 24, опередив КПСС и ВЛКСМ. Фонд патронировала супруга первого президента СССР Р.М. Горбачева. В его руководящий состав кроме российских специалистов входили выдающиеся ученые и врачи, работающие в области детской гематологии/онкологии, профессора Г. Шеллонг, Г. Хенце (Германия), Х. Гаднер (Австрия), Ф. Розен, Р. О'Релли, Д. Натан (США), М. Казачкин, Э. Глюкман (Франция), Ш. Славин и Р. Зайцев (Израиль) и др. Основной задачей фонда была организация международного взаимодействия и обучения специалистов в области диагностики и лечения злокачественных заболеваний у детей.

Детская гематология и детская онкология — дисциплины, в свое время разделенные не без участия взрослых специалистов (гематология — терапевтическая, а онкология — хирургическая специальность), оказались настолько тесно связанными между собой, что разделить их в практике оказалось невозможным с позиции как смыслового содержания этих дисциплин, так и экономической целесообразности. В результате более 30 лет назад произошло слияние указанных специальностей в оказании помощи детям в США и Канаде. В 2003 г. официально это случилось в странах ЕС и в настоящее время, надеемся, состоится и в нашей стране. Принципиальным для улучшения помощи детям с гематологическими и онкологическими заболеваниями стала организация лечения этих пациентов в специализированных стационарах на базах многопрофильных детских больниц. В детской практике гемобластозы (острые и хронические лейкозы, лимфомы и гистиоцитозы) составляют половину онкологических заболеваний. Эти больные всегда получали помощь в гематологических стационарах детских больниц. Другая половина включает опухоли центральной и периферической нервной системы (25%), костей и мягких тканей (до 12%), почек (6%) и другие, более редкие, злокачественные новообразования. Такие больные получали помощь в нейрохирургических отделениях больниц и в онкологических диспансерах.

Приведенная структура онкологической заболеваемости, а также возрастные особенности течения опухолей у детей (мутационный инцидент и вероятное начало во внутриутробном периоде развития, становление опухолей на фоне генетических, биологических дефектов и иммунодефицитных состояний, развитие опухолей из эмбриональных зачатков, склонность к генерализации (метастазированию) на фоне становления иммунного и гормонального гомеостаза и т. д.) оказали влияние на выбор стратегии терапии. Ею стала высокодозная полихимиотерапия, повлекшая за собой расширение знаний онкологов в области гематологии, иммунологии, инфекционных болезней, интенсивной терапии, реанимации, сопровождающей и реабилитационной терапии и педиатрии в целом. Хирургическое лечение и лучевая терапия детских опухолей заняли вспомогательное, этапное положение.Новые технологии лечения в детской гематологии/онкологии стали опираться на знания генетики и биологии конкретной опухоли, учитывающие первично-генерализованный характер опухолевого процесса у детей и возможные ответы больных на более чем 100 жизнеопасных химиопрепаратов, колониестимулирующих факторов, цитокинов и новейших средств точечной и сопроводительной терапии. Все это потребовало новой системы организации лечебной работы на основе междисциплинарных протоколов, участниками выполнения которых является команда в составе гематолога/онколога, патолога, хирурга (нейрохирурга), радиолога, специалиста по лучевой терапии, анестезиолога-реаниматолога, врачей узких педиатрических специальностей.

Сначала НИИДГ начал свою деятельность на базах Республиканской детской клинической больницы (РДКБ) Минздрава РСФСР, Морозовской и Измайловской детских больниц. В его состав влились сотрудники кафедральных лабораторий и научных групп РГМУ им. Н.И. Пирогова и ГНЦ Минздрава СССР. Среди них были академики РАМН Ю.Ф. Исаков, Э.А. Степанов, В.А. Михельсон, члены-корреспонденты РАМН Н.С. Кисляк, А.В. Мазурин, А.Я. Фриденштейн,

засл. деятели науки РФ профессора В.А. Аграненко, Э.М. Коган, Ю.Н. Токарев, профессора Л.Г. Коркина, Р.В. Ленская, С.С. Лория, С.Г. Осипов, В.М. Чернов, Л.Н. Хахалин, Н.А. Финогенова, Л.В. Якунина и др. Постепенно клиническими базами института стали ГКБ им. С.П. Боткина, детское отделение Онкодиспансера Московской области, несколько поликлиник. Был открыт филиал НИИДГ в Рязани под руководством д.м.н., профессора Е.Ф. Морщаковой и чл.-корр. РАЕН, профессора А.Д. Павлова. Институт стал новатором в области организации НИР — это был первый в стране НИИ с набором сотрудников на контрактной, а не на конкурсной основе.

Уникальной моделью успешного внедрения новых технологий, точкой роста развития гематологии/онкологии является драматическая история лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. Достижения в лечении этого заболевания в полной мере продемонстрировали возможности современной высокодозной химиотерапии и роль адекватного сопровождения для ее успеха, а также ключевое значение многоцентровых рандомизированных исследований, исключающих селекцию пациентов и медицинского персонала, для доказательства эффективности и максимально быстрого внедрения в практику здравоохранения.

Основываясь на исследованиях DFCI (США) и ALLVI (Нидерланды), опыте группы BFM (Германия, Австрия), сотрудниками ФНКЦ ДГОИ был разработан и научно обоснован первый отечественный протокол лечения ОЛЛ-МБ-91. В отличие от ранее используемых протоколов, создававшихся эмпирически на основе предшествующего клинического опыта, основной научной идеей новой программы лечения стало представление о ключевой роли оккультной (скрытой) нейролейкемии в происхождении рецидивов и, следовательно, неудач лечения ОЛЛ у детей. Объективность исследования и обоснования его внедрения в практику потребовали создать кооперированную группу, куда первоначально вошли 6 клиник под руководством А.И. Карачунского, А.М. Тимакова, Л.Г. Фечиной, В.В. Лебедева, С.А. Дудкина, А.В. Шамардиной. Итоги этой работы показали, что эффективность данного протокола сопоставима с результатами лечения больных по германскому протоколу BFM-90 и составила 74% безрецидивной выживаемости (БРВ) больных. Вместе с тем токсичность и, следовательно, объем и стоимость сопроводительного лечения были значительно ниже, также как и длительность госпитализации больных. В 1999 г. была организована кооперированная группа, которая кроме 32 российских клиник включила белорусские и была способна рекрутировать до 500 больных в год. В 2001 г. проведена оценка факторов риска, позволяющих дифференцировать лечебную тактику на базе этих двух протоколов лечения ОЛЛ, у более чем 800 больных (А.М. Тимаков, Н.В. Мякова, Л.Г. Фечина), что позволило повысить выживаемость больных ОЛЛ до 80%. В 2002 г. начата 2-я, а в 2008 г. — 3-я версия российского протокола, каждая из которых добавляет от 3 до 5% к показателю БРВ больных (Ю.В. Румянцева, К.Л. Кондратчик).

Острые нелимфобластные (миелобластные) лейкозы у детей (ОМЛ) — группа заболеваний с различными характеристиками субстрата опухоли и преимущественно плохим прогнозом. Понадобилось 20 лет для того, чтобы по аналогии с ОЛЛ последовательно пройти путь по изучению биологии опухоли, иммунологических маркеров дифференцировки (Р.В. Ленская, Л.В. Байдун), цитогенетических (Е.В. Флейшман, О.В. Алейникова) и молекулярно-генетических маркеров опухоли (В.С. Жаринов, А.Г. Сергеев, Е.А. Исаева, Т.В. Наседкина и др.). Внедрение в практику полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило контролировать минимальную резидуальную болезнь, т. е. решать вопрос об интенсификации терапии (М.М. Шнейдер). Дальнейшее развитие диагностической технологии предполагало упростить и автоматизировать процедуру анализа, которая по мере увеличения числа анализируемых транслокаций стала немыслимо трудоемкой и дорогостоящей. Это позволило нам совместно с сотрудниками НИИ молекулярной биологии РАН реализовать первый в стране проект комбинированного использования мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на микрочипах для проведения анализа одновременно на множество различных транслокаций, включающих основные типы ОМЛ, ОЛЛ и ХМЛ, используя каплю крови, полученную из пальца. Использование аллогенной и аутологичной ТГСК в 1-й ремиссии ОМЛ с факторами риска (отсутствие цитогенетической и молекулярной ремиссии) позволило в течение последних 7 лет в 2 раза увеличить выживаемость детей с ОМЛ (до 70%) (А.А. Масчан, О.В. Алейникова).

Демонстрацией выдающегося успеха молекулярной медицины и следующих за этим новых технологий лечения является современная терапия острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), одного из самых тяжелых вариантов ОМЛ со специфической транслокацией t(15,17) (q22; ql2) и образованием химерного гена *PML-RAR*; полностью трансретиноевая кислота (ATRA) способна подавлять транскрипцию *PML-RAR*, обрывая тем самым путь лейкомогенеза. Мы впервые с успехом использовали ATRA для лечения ОПЛ у детей в России одновременно с первым Европейским протоколом в 1993 г. (ОПЛ-93), затем последовал путь развития технологии дифференцировочной терапии ОПЛ (ATRA+химиотерапия +/– ТГСК) с разработкой специальных методов сопроводительной терапии в многоцентровом кооперированном исследовании с российскими и белорусскими коллегами, результатом которого стал полный охват всех детей, больных ОПЛ в России и Белоруссии с показателем общей выживаемости (ОВ), достигающим 85% (Е.В. Самочатова, А.А. Масчан, Д.Д. Байдильдина, О.В. Алейникова). С 2006 г. впер-

вые в России мы включаем триоксид мышьяка в лечение рецидивов ОПЛ.

Первый успешный протокол лечения В-НХЛ у детей с использованием химиопрепаратов в комбинации с ритуксимабом (препарат антител к рецептору В-клеток CD20) был создан в 2004 г. и стал предметом многоцентровых клинических исследований в группе из 8 российских клиник (Е.В. Самочатова, Л.Н. Шелихова, М.Б. Белогурова, Е.В. Башарова, Л.Г. Фечина, А.В. Шамардина, А.А. Масчан, Н.В. Мякова). Показатели долгосрочной бессобытийной (БСВ) и ОВ больных зрелоклеточными В-НХЛ/-ОЛЛ составили 89,4±0,04 при умеренной токсичности и хорошей выполняемости программы лечения, что позволяет использовать этот метод лечения в профильных онкогематологических стационарах регионарных педиатрических клиник.

Успехи лечения болезни Ходжкина (БХ) у детей в РФ связаны с внедрением в практику российских клиник протоколов лечения, разработанных немецкими специалистами. По нашим данным, БСВ у детей до 14 лет в течение 10 лет составила 81%, ОВ — 94% (Н.Р. Тюкалова, Н.В. Мякова). Использование этого протокола у подростков в возрасте 15–21 года и молодых взрослых (до 29 лет) показало аналогичные результаты — БСВ во всей группе составила 79%, ОВ — 90% (Е.П. Иванова, С.В. Семочкин).

К 2002 г. в стране подведены итоги работы группы специалистов, организованной под руководством профессоров А.Ф. Бухны и О.Г. Желудковой и объединяющей 17 клиник в 10 субъектах Федерации для лечения опухолей головного мозга (ОГМ) у детей. Кооперированная группа использовала новые модификации протоколов, разработанные SIOP и в нашем центре, РО/02 и РО/04 (с увеличенными дозами циклофосфана и карбоплатины) для медуллобластом с 5-летней выживаемостью — 60% и 51% соответственно (О.Г. Желудкова, М.Б. Белогурова, А.Г. Притыко и др.). Дальнейший прогресс в лечении ОГМ связан с выделением молекулярных дефектов, обуславливающих развитие отдельных опухолей, и поиском точечных (таргетных) препаратов. Международное сотрудничество в выборе новых биологически обоснованных методов лечения позволило разработать и провести клинические исследования первого препарата этого ряда — моноклонального антитела нимотузумаба для лечения глиом мозга, методом лечения которых на сегодняшний день является только паллиативная операция.

В ФНКЦ ДГОИ начаты исследования в области лечения опухолей у детей первого года жизни и опухолей мягких тканей (С.Р. Варфоломеева). Основной проблемой этих исследований служит перевод их из формата моноцентровых в многоцентровые, что сопровождается наиболее эффективной подготовкой специалистов и быстрым внедрением в практику здравоохранения высокотехнологичных методов лечения детей с онкологическими заболеваниями.

Дальнейший поиск новых механизмов биологически опосредованной терапии рака, прежде всего как альтернатива токсичной химиотерапии, привел к разработке методов адоптивной иммунотерапии (АИТ), основанной на введении в организм больного аутологичных или аллогенных клеток иммунной системы, способных специфически распознавать и убивать опухолевые клетки. Одним из вариантов АИТ стала трансплантация костного мозга или, как теперь принято называть эту терапевтическую опцию, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Опыт проведения ТГСК более чем 550 больным и гигантский объем информации, получаемый из международных источников, привел нас к выводу, что трансплантируемый пул мононуклеарной фракции клеток периферической крови или костного мозга содержит не только ГСК, но и другие стволовые клетки, например эндотелиальные клетки-предшественники, клетки-предшественники нервной ткани, мышц и т. д. Это свидетельствует о том, что именно костный мозг является закрытым от регулирующих гомеостатических механизмов убежищем пула стволовых клеток всех тканей организма, а кровь — транспортной системой, обеспечивающей ежесекундное восстановление погибших клеток из депо, а не на местном уровне. Ясно, что эти знания при их детальной проверке и подтверждении повлекут за собой революционные технологические решения в медицине, в том числе и научно-обоснованную клеточную терапию.

Что касается «чистой» гематологии, большой заслугой Института стало внедрение в стране эффективной терапии апластических анемий (АА). В течение 20 лет наши сотрудники (А.А. Масчан, Н.Ю. Богачева, Д.В. Литвинов, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан и др.) проводили исследования сравнительной эффективности вариантов лечения приобретенных АА (пАА), включающих циклоспорин А, антитимоцитарный глобулин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и, наконец, аллогенную ТГСК с щадящими режимами кондиционирования. Использование современных протоколов лечения больных пАА в региональных клиниках детской гематологии/онкологии субъектов РФ позволило достичь 80–94% выживаемости больных тяжелыми и сверхтяжелыми АА, получившими ТГСК от HLA-совместимого донора, у 40–60% — при неродственной ТГСК; комбинированная терапия АТГ+циклоспорин дает сравнимые результаты. Всероссийская программа была осуществлена вследствие создания целевой программы Минздрава (Минздравсоцразвития) РФ «Детская гематология/онкология» в 1996–2006 гг. по целевому лекарственному обеспечению больных и реализации ряда зарубежных благотворительных грантов, поддержавших проведение трансплантации детям с АА в России. Были внедрены методы генетической диагностики наследственных аплазий кроветворения, впервые в стране стали выполняться родственные и неродствен-

ные ТГСК больным анемией Фанкони с использованием оригинальных режимов кондиционирования.

Многолетние эпидемиологические исследования болезней крови у детей и подростков в субъектах Федерации (В.М. Чернов, Г.И. Сидорович, И.С. Тарасова), в том числе и пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС (Р.В. Ленская, С.С. Лория, И.С. Тарасова и др.), показали, что ведущей проблемой народонаселения и здравоохранения являются анемии, что было подтверждено данными Всероссийской диспансеризации детского населения 2002 г. Многочисленные рекомендации по антенатальной, интранатальной и постнатальной профилактике железодефицитных анемий, которые составляют до 90% анемических состояний у детей и подростков, исследования сравнительной эффективности зарегистрированных в РФ препаратов железа, обучающие программы для врачей, издание специального журнала «Анемия» для врачей-акушеров, педиатров, терапевтов, нефрологов, организация общероссийской «Рабочей группы по анемии» позволили установить контроль за этой патологией.

Научные исследования в области обмена железа и его регуляции в онтогенезе коснулись, прежде всего, изучения роли эритропоэтина (ЭПО), играющего центральную роль в клинике первичных и вторичных нарушений эритрона, выяснения патогенеза эритропоэтин-дефицитных состояний, таких как ранняя анемия недоношенных детей, анемия пубертатного периода, анемия беременных и др. (Рязанский филиал, профессора Е.Ф. Морщакова, А.Д. Павлов, В.Г. Демихов и др.).

Успехи отечественной гематологии в изучении физиологии и патологии эритрона представлены сотрудниками ФНКЦ ДГОИ. Под руководством Ю.Н. Токарева ими были описаны ранее неизвестные заболевания, такие как наследственная полицитемия Средне-Волжского региона России, российские варианты гемоглобинопатии и дефекты фермента Г-6-ФД (Н.С. Сметанина, Н.А. Карамян, Е.Г. Казанец, Е.С. Ковригина и др.). В результате этой работы открыт новый нестабильный гемоглобин «Алеша», приводящий к тяжелой гемолитической анемии.

Принципиально важным направлением научных исследований в детской гематологии и медицине в целом является гемостазиология, изучающая генетически детерминированные и приобретенные заболевания системы гемостаза, сопровождающиеся геморрагическим синдромом и/или развитием тромбозов, часто определяющими неблагоприятные исходы в клинике хирургических и внутренних болезней.

Сотрудники ФНКЦ ДГОИ разработали дифференцированную тактику ведения больных, основанную на фармакоэкономических расчетах (В.М. Чернов, Л.Н. Якунина, В.В. Вдовин), для детей с тяжелой и среднетяжелой формой гемофилии — профилактический метод, для детей с легкой формой А — использование десмопрессина, обеспечивающего освобождение FVIII и фактора Виллебранда из депо эндотелиальных клеток при ингибиторной гемофилии, активированных факторов протромбинового комплекса и/или активированного рекомбинантного фактора VII.

Большая работа проведена в области клинической иммунологии. Для изучения иммунодефицитных состояний на базе РДКБ Росздрава в рамках сотрудничества с ESID был организован персонифицированный регистр первичных иммунодефицитных состояний, включающий пациентов с достаточной полной оценкой иммунного и гематологического статуса, мутационного анализа и секвенирования комплементарной ДНК. Он объединил информацию о 30 формах иммунодефицитов (ИДС), наиболее частые из которых — общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН), гипер IgM-синдром, синдром Вискотт–Олдрича, синдром Ниймеген и аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), дефицит С-ингибитора комплемента — подверглись углубленному научному анализу в сотрудничестве с кафедрой и отделом иммунологии РГМУ, лабораториями ИБХ РАМН, Медико-генетического научного центра РАМН, Центра исследований крови Гарвардского Университета (США), лабораторией INSERM 429 (Франция), Университетскими клиниками Лондона (Великобритания) и Брешия (Италия) (А.Ю. Щербина, А.П. Продеус, Е.Д. Пашанов, И.Б. Резник). Обоснованы, разработаны и внедрены в практику современные эффективные технологии лечения ювенильного ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний у детей. Разработан молекулярно-генетический алгоритм дифференциальной диагностики и дифференцированной терапии больных с дефектами фагоцитоза и гранулоцитарными синдромами костно-мозговой недостаточности (Н.А. Финогенова, Е.А. Мамедова, А.Ю. Усачева, М.А. Кузнецова, А.Ю. Щербина). Особую группу ИДС представляют дефекты, являющиеся следствием иммунной дисрегуляции, ранее описанные в группе гистиоцитозов, включая первичный (в том числе семейный) гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ) (М.Л. Минков, Г.А. Новичкова). В клинике ФНКЦ ДГОИ проведена сравнительная оценка эффективности международных протоколов химиоиммунотерапии и аллогенной ТГСК при ГЛГ, показан 50% эффект химио-, иммуно- и сопроводительной терапии и абсолютный эффект ТГСК — все 14 больных выжили, в том числе 3 больных после неродственной ТГСК. Гистиоцитоз из клеток Лангерганса подлежит программному лечению химиопрепаратами (протоколы лечения группы DAL, Германия). После их внедрения в лечебную практику при наиболее тяжелых полисистемных заболеваниях ОВ и БРВ больных составили соответственно 80% и 60% (М.Л. Минков, М.А. Масчан).

Радикальным методом терапии, применимым к большинству ИДС, стала ТГСК, позволяющая в слу-

чае ее успешного выполнения добиться полной коррекции иммунологического дефекта. Первая трансплантация больному с ИДС в нашей стране была проведена нашими сотрудниками (А.А. Масчан, Е.В. Скоробогатова, И.Б. Резник) в 1995 г. В течение последующих лет было налажено международное сотрудничество с профессором Аланом Фишером (Госпиталь Некер, Париж, Франция), разработаны режимы кондиционирования и профилактики инфекционных осложнений.

Наш Институт с самого начала создания ведет большую образовательную деятельность как в структуре кафедры ФУВ РГМУ, так и в результате непосредственных контактов с коллегами из региональных подразделений гематологии/онкологии крупных детских больниц. Регулярно проводимые циклы лекций и клинической подготовки специалистов привлекли врачей из всех регионов РФ высоким уровнем представления практического и научного материала. Ведущие сотрудники Института были во многих городах страны, работали в тесном содружестве не только с узкими специалистами, но, что очень важно, и с педиатрами, хирургами и реаниматологами, встречались с организаторами здравоохранения. В результате было создано профессиональное сообщество, что завершилось образованием Национального общества детских гематологов и онкологов, зарегистрированное в 2010 г. За 20 лет написано немало книг, руководств и научных статей, многие наши сотрудники стали докторами и кандидатами наук, заслуженными врачами и деятелями науки, лидерами научных направлений. Но главным достижением этих лет мы считаем реальное создание содружества единомышленников, которые независимо от места жительства делают общее дело. Этому помогают очень много людей, которые объединились и создали благотворительные фонды. Первым из них стал фонд «Подари жизнь», созданный замечательными актрисами Чулпан Хаматовой и Диной Корзун, вокруг которых объединились удивительные люди — профессионалы, волонтеры, спонсоры. Все вместе мы остаемся единым сообществом, которое проводит в жизнь идеи и достижения нового времени.

На наш взгляд, первичная функция медицинской науки, прикладные задачи которой органически переплетены с фундаментальными, — это производство новых знаний, расширяющих наши представления о человеке, его развитии, регуляторных механизмах гомеостаза, принципах и условиях поддержания постоянства многоклеточной внутренней среды и т. д. Функция производства инновационных технологий, безусловно, важна, но вторична. Этот этап отдален от этапа получения знаний по времени и их участникам и, наконец, имеет прямое отношение к социальному заказу.

Мы как специалисты, работающие на стыках четырех фундаментально-прикладных специальностей, таких как педиатрия, гематология, онкология и иммунология, обречены на глубокое проникновение в клиническую биологию человека; каждое добытое тяжелым трудом знание или тонкое понимание биологического процесса не всегда приносит пользу обществу сегодня — но служит дальнейшему прогрессу нашей специальности. С момента идеи создать фундаментально-клиническую базу до принятия обществом решения о ее строительстве в 2005 г. прошло более четверти века. Последние 6 лет мы заняты строительством и организацией уникального комплекса высоких технологий для лечения детей. Все свои знания и опыт работы мы хотим перенести на новую почву, в новый Центр, где условия для претворения нашего дела в жизнь будут неизмеримо лучше, где будет пансионат для иногородних пациентов, современный комплекс лучевой диагностики и терапии и самые современные возможности диагностики и лечения.Уникальность нового Центра для лечения детей с гематологическими и онкологическими заболеваниями заключается в том, что создаются уникальные ресурсы для годовой производительности до 250–300 трансплантаций, специализированной химиотерапии более чем у 1700 пациентов, конвенциональной радиотерапии в комплексном радикальном лечении более чем 3000 детей. В лечебный процесс включаются современные технологии (методы генной диагностики остаточной опухоли, методы точечной, молекулярной терапии), не используемые в России в настоящее время. В ФНКЦ ДГОИ запланирована система профильных отделений и научно-лабораторного комплекса: для специализированной диагностики и вылечивания тяжелых наследственных и приобретенных заболеваний в гематологии, онкологии и иммунологии у детей, определяющих снижение смертности детей старше 1 года; создается научно-организационная структура для подготовки медицинских и научных кадров (гематологов, онкологов, иммунологов); для научно-методического руководства и информационного обмена и участия в специализированных международных научных программах развития гематологии, онкологии и иммунологии детского возраста. Работать в этом замечательном Центре будет коллектив, сложившийся за эти 20 лет, доказавший своим трудом и преданностью выбранному делу право продолжить это служение на самом высоком уровне.

Открытие клиники планируется в Международный день защиты детей — 1 июня 2011 г.

Директор Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, академик РАЕН

А.Г. Румянцев

Клинические и генетические особенности острого миелоидного лейкоза с t(8;21) у детей и результаты терапии по протоколу ОМЛ-ММ-2000

И.И. Калинина[1], М.М. Шнейдер[1], Н.П. Кирсанова[2], Д.Д. Байдильдина[1], Е.В. Сунцова[1], О.В. Горонкова[1], Л.А. Хачатрян[1], Г.А. Новичкова[1], М.А. Масчан[1], Р.И. Юцкевич[2], Е.В. Волочник[2], Т.В. Савицкая[2], Н.В. Минаковская[2], И.В. Пролесковская[2], И.В. Емельянова[2], О.В. Карась[2], Н.В. Мигаль[2], Ю.Е. Марейко[2], А.Г. Дреков[2], Ю.В. Румянцева[1], Е.В. Флейшман[3], Т.В. Наседкина[4], О.В. Алейникова[2], А.А. Масчан[1]

[1]Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва;
[2]Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь;
[3]НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;
[4]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Контакты: *Ирина Игоревна Калинина burbir@mail.ru*

У детей с ОМЛ транслокация t(8;21) встречается наиболее часто. Пациентов с данной генетической аномалией традиционно относят к группе благоприятного прогноза с вероятностью выздоровления до 80%. При ОМЛ с t(8;21) известны дополнительные цитогенетические аномалии, не влияющие на прогноз заболевания. К ним относят потерю одной из половых хромосом, del(9q). Роль дополнительных аномалий с вовлечением 7-й и 11-й хромосом у пациентов с t(8;21) неизвестна. Целью данного исследования служил цитогенетический анализ дополнительных аномалий, встречающихся у больных с t(8;21), и их влияния на прогноз заболевания.

За исследовательский период 173 ребенка с ОМЛ получили терапию по протоколу ОМЛ-ММ-2000 в России и Беларуси. Из них у 33 детей (11 девочек и 22 мальчика, медиана возраста 10,5 лет) обнаружена транслокация t(8;21) при проведении хромосомного или молекулярно-генетического исследования.

В группе пациентов с наличием t(8;21) нейролейкоз обнаружен у 8 детей, экстрамедуллярное поражение — у 8 пациентов. У 4 больных нейролейкоз сочетался с наличием экстрамедуллярных очагов. Данные характеристики не отразились на результатах терапии.

Общая выживаемость больных ОМЛ с t(8;21) составила 0,67 ± 0,08 по сравнению с 0,44 ± 0,04 пациентов с ОМЛ без данной аномалии (p = 0,04). Особую подгруппу составили 5 пациентов, у которых помимо t(8;21) были выявлены хромосомные аномалии, затрагивающие 7-ю и 11-ю хромосомы, что явилось неблагоприятным прогностическим фактором. Бессобытийная выживаемость в этой подгруппе пациентов (n = 5) составила 0,0 ± 0,0, тогда как пациентов с t(8;21) без дополнительных аномалий (n = 28) — 0,34 ± 0,16 (p = 0,027).

Ключевые слова: *дети, острый миелоидный лейкоз, t(8;21), протокол ОМЛ-ММ-2000*

Clinical and genetic characteristics of acute myeloid leukemia with t(8;21) in children and results of therapy according to protocol AML-MM-2000

I.I. Kalinina[1], M.M. Shneyder[1], N.P. Kirsanova[2], D.D. Baydildina[1], E.V. Suntsova[1], O.V. Goronkova[1], L.A. Khachatryan[1], G.A. Novichkova[1], M.A. Maschan[1], R.I. Yutskevich[2], E.V. Volochnik[2], T.V. Savitskaya[2], N.V. Minakovskaya[2], I.V. Proleskovskaya[2], I.V. Emelyanova[2], O.V. Karas[2], N.V. Migal[2], Yu.E. Mareyko[2], A.G. Drekov[2], J.V. Rumyantseva[1], E.V. Fleyshman[3], T.V. Nasedkina[4], O.V. Aleynikova[2], A.A. Maschan[1]

[1]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;
[2]Republic Center of Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Belarus;
[3]Institute of Cancerogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;
[4]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

A t(8;21) is the most frequent abnormality in AML in children. Patients with this genetic abnormality are traditionally expected favorable prognosis with a probability of cure up to 80%. Known additional cytogenetic abnormalities in AML with t(8;21) not affecting prognosis. These include loss of one sex chromosome and del(9q-). Prognosis impact of additional abnormalities involving chromosomes 7 and 11 in patients with t(8;21) is unknown. The purpose of this study was to analyse of additional anomalies, that occur in patients with t(8;21), and their influence on prognosis.

During the study period 173 children with AML have received AML-MM-2000 treatment protocol in Russia and Belarus. Of these, in 33 patients (11 girls and 22 boys, median age — 10.5 years) t(8;21) was detected by chromosome banding or molecular-genetic analysis.

In group with t(8;21) CNS leukemia in 8 patients was detected, extramedullary lesion — in 8 patients. In 4 patients CNS leukemia combined with presence of extramedullary lesions. These factors did not influence on therapy outcome.

Overall survival of AML patients with t(8;21) was 0,67 ± 0,08 compared to 0,44 ± 0,04 in patients with AML without this translocation (p = 0,04). Special subgroup consist of 5 patients with t(8;21) and identified chromosomal abnormalities affecting chromosome 7 and 11, which were a poor prognostic factor: event-free survival in this subgroup of patients (n = 5) was 0,0 ± 0,0, compared to 0,34 ± 0,16 in patients with t(8;21) without additional anomalies (n = 28) (p = 0,027).

Key words: *children, acute myeloid leukemia, t(8;21), AML-MM-2000 protocol*

Острые лейкозы являются самыми частыми злокачественными заболеваниями у детей, и доля острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) составляет 15–20 % от всех детских гемобластозов. Современная интенсивная полихимиотерапия (ПХТ), основанная на применении высоких доз цитозин-арабинозида (Ara-C) и антрациклинов, позволяет достичь полной ремиссии у более 90 % пациентов и длительной выживаемости у 50–60 % детей с ОМЛ [1–3]. ОМЛ является гетерогенной группой заболеваний, прогноз которых при современном лечении определяется, главным образом, инициальными генетическими характеристиками лейкемических клеток. Группа благоприятного прогноза формируется лейкозами с транслокацией t(15;17)(p21;q11) и лейкозами с вовлечением CBF (core-binding factor), встречающимся при t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22) и t(16;16)(p13;q22), — вероятность выздоровления при таких характеристиках может составлять 80 % и больше. В группу промежуточного прогноза относят лейкозы с нормальным кариотипом, трисомией 8 и транслокацией t(9;11), в то время как лейкозы, характеризующиеся сложными нарушениями кариотипа, аномалиями 5-й, (-5;5q-), 7-й (-7) хромосом, inv (3), t(3;3) и аномалиями региона 11q23, относятся к группе плохого прогноза. Вероятность выздоровления в группе промежуточного прогноза составляет около 40 %, а в группе высокого риска не более 25 %, даже при применении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [1–4]. В результате молекулярно-генетических исследований, выполненных в последние 10 лет, стало очевидно, что помимо микроскопически видимых аномалий кариотипа прогноз при ОМЛ определяется и дополнительными факторами — мутациями генов, вовлеченных в регуляцию миелопоэза, а также эпигенетическими изменениями.

Аберрантный кариотип и/или соответствующие аномальные гены, образующиеся в результате слияний участков хромосом, замены и потери участков генов, выявляются в среднем у 70–80 % детей с ОМЛ [1]. Наиболее частой кариотипической аномалией при ОМЛ у детей является транслокация t(8;21)(q22;q22), впервые описанная Rowley в 1973 г. [5]. Эта аберрация встречается у 10–15 % детей и 4–5 % взрослых с ОМЛ [1, 6–9]. Суть этой транслокации в том, что в область гена *ETO* (Eight-Twenty-One), находящегося на длинном плече 8-й хромосомы, переносится ген *AML1* (Acute Myeloid Leukemia) с длинного плеча 21-й хромосомы. Ген *AML* (ныне *RUNX1*) кодирует транскрипционный регуляторный фактор CBFα, который в комплексе с CBFβ активирует транскрипцию генов, контролирующих миелоидную дифференцировку. В итоге образуется химерный ген *RUNX1/ETO* и его продукт — протеин CBFα-ETO, который ингибирует транскрипцию дифференцирующих факторов миелоидных клеток [10]. Химерный транскрипт *AML1/ETO* может встречаться также у пациентов с t(2;21;8)(p12;q22;q22), t(8;10;21)(q22;q26), t(6;8;21)(p22;q22;q22), которые рассматриваются как вариант t(8;21) и в некоторых случаях выявляются у пациентов с нормальным кариотипом [6].

Иммунофенотип лейкемических клеток при t(8;21) весьма специфичен — наряду с выявлением CD34, HLA-DR и миелоидных антигенов CD13 и CD33, характерна экспрессия лимфоидного антигена CD19 (около 80 % случаев) и молекулы адгезии NCAM — CD56 (около 60 %), причем коэкспрессия последних является практически патогномоничной для данного варианта ОМЛ [11–14]. Экспрессия других лимфоидных антигенов относительно часто встречающихся при ОМЛ — CD7 и CD2, — при t(8;21) не описана.

Яркой клинической характеристикой ОМЛ с t(8;21) являются хлоромы — «солидные» очаги экстрамедуллярного поражения лейкемическими клетками, которые встречаются у 20 % больных и часто располагаются не в коже, как это бывает при аномалиях региона 11q23, а в других органах и тканях. Наиболее характерным является поражение костей и мягких тканей орбиты, кроме того, могут быть поражены оболочки черепно-мозговых нервов, внутренние органы, кости. Спленомегалия встречается у 25 % больных, однако не все авторы относят данное поражение к хлоромам [15–18]. Прогностическая роль наличия хлором при t(8;21) не является очевидной. Исследователи Children's Cancer Group (США) показали, что локализация хлором вне кожи является независимым благоприятным фактором [15]. Есть данные, что наличие экстрамедуллярных проявлений ухудшает результаты терапии. Однако нужно заметить, что в этом исследовании в группу с экстрамедуллярным поражением включались также пациенты с нейролейкозом, являющимся фактором неблагоприятного прогноза [19].

Хотя наличие t(8;21) и является фактором благоприятного прогноза, хорошие результаты достигаются только при интенсивной химиотерапии (ХТ)

с включением нескольких циклов высоких доз Ara-C. Вероятность рецидива для пациентов с t(8;21), достигших ремиссии, составляет около 25%, а общая 4-летняя выживаемость — 60–70%. Есть данные, полученные в основном в исследованиях у взрослых пациентов, что у больных с t(8;21) общие результаты терапии хуже, чем у пациентов с inv(16) [1, 6, 9, 20, 21].

В клетках, несущих t(8;21), часто встречаются дополнительные аномалии кариотипа: к наиболее характерным из них относятся потеря половой хромосомы (у 70% больных мужского и 25% — женского пола), del(9q) (около 10%) и трисомия 8-й хромосомы [22, 23]. Данные о влиянии дополнительных аномалий на прогноз заболевания достаточно противоречивы: например, исследователи группы MRC (Соединенное королевство Великобритании и Северной Ирландии) показали, что наличие del(9q) не оказывает влияния на прогноз у детей с t(8;21) [20], в то же время у взрослых del(9q) считается фактором, ухудшающим прогноз при ОМЛ с t(8;21) [24, 25]. Кроме того, есть данные, что результаты терапии у больных с выявлением транскрипта *AML1/ETO*, но без цитогенетически выявляемой t(8;21), хуже, чем при наличии таковой [26].

Изменения генома миелоидных клеток, определяемые молекулярно-биологическими методами (мутации генов *Flt-3*, *c-kit*), также существенно влияют на прогноз, особенно у больных с благоприятными аномалиями кариотипа [1, 27–29]. У детей, особенно в возрасте до 10 лет, экспрессия ITD-*Flt-3* ассоциирована с высоким риском неудачи терапии ОМЛ [30–32]. Активирующая мутация рецептора *c-kit* встречается редко, но наиболее часто при так называемых «CBF-лейкозах» (CBF – corebinding factor): при inv(16) — в 20%, а при t(8;21) — в 6% случаев и существенно ухудшает прогноз больных, особенно с t(8;21) [1, 33–36].

Наличие химерных транскриптов, специфичных в отношении определенных хромосомных аберраций, является биологической основой, позволяющей мониторировать так называемую минимальную резидуальную болезнь (minimal residual disease, MRD), т. е. выявлять персистенцию лейкемических клеток, когда частота их встречаемости в костном мозге снижается до уровня менее 1%. Показано, что при использовании высокочувствительного качественного метода *AML1/ETO* может выявляться у больных в длительной клинико-гематологической ремиссии [37–39], которые в дальнейшем не рецидивировали. Применение менее чувствительных количественных методов больше подходит для оценки эффективности терапии и прогнозирования гематологического рецидива [40]. F. Morschhauser et al. показали, что пациенты с полной элиминацией транскрипта *AML1/ETO* перед началом консолидирующей терапии имели низкий риск развития рецидива и более продолжительную ремиссию, по сравнению с *AML1/ETO*-позитивными пациентами [41].

Таким образом, констатируя, что ОМЛ с t(8;21) в целом представляет собой заболевание с относительно благоприятным прогнозом, необходимо четко понимать, что ряд важных вопросов, касающихся этой формы ОМЛ, остаются открытыми. К этим вопросам относятся, прежде всего, прогностическое значение дополнительных хромосомных аномалий и существование других инициальных факторов, определяющих вероятность излечения с применением только ХТ или необходимость применения аллогенной ТГСК.

Целью данного исследования служит анализ результатов терапии детей с t(8;21) в рамках протокола ОМЛ-ММ-2000.

Пациенты и методы

С 01.05.1999 по 01.05.2006 в исследование ОМЛ-ММ-2000 были включены 173 ребенка с ОМЛ: 94 мальчика и 79 девочек, медиана возраста которых составила 10,6 (0,04–18,74) лет. В Москве получали терапию 80 больных, в Минске — 93 больных. Критериями включения в исследование являлись: диагноз *de novo* ОМЛ (кроме М3) и возраст до 18 лет включительно. Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом с t(15;17), вторичными формами ОМЛ и бифенотипическим лейкозом [42] исключались из исследования. Диагноз ОМЛ устанавливали на основании обнаружения 20% и более лейкемических миелоидных бластов в аспирате костного мозга или крови и классифицировали на основании критериев FAB [43]. Хромосомный анализ лейкемических клеток проводили в лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (руководитель научной группы — д.м.н. Е.В. Флейшман) и в лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела РНПЦ ДОГ, Минск, Беларусь (заведующая лабораторией — к.б.н. Т.В. Савицкая) на метафазных пластинках (не менее 20 метафаз). Молекулярно-генетическое исследование и мониторинг MRD проводили в Центре биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (руководитель — д.б.н. Т.В. Наседкина) и в лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела РНПЦ ДОГ методом мультиплексной ПЦР на биочипах. Диагноз нейролейкоз у больных ОМЛ устанавливали на основании обнаружения бластных клеток в препарате цереброспинальной жидкости, либо 5 и более мононуклеаров в 1 мкл препарата и/или при симптомах поражения черепно-мозговых или иных нервов. Хломами считались экстрамедуллярные очаги поражения (кроме селезенки и печени), доказанные данными биопсии, инструментального обследования и/или клинического течения (регрессия типичных очагов поражения на фоне терапии индукции).

Стратификация на группы риска проводилась на основании данных хромосомного анализа и молекулярно-биологического исследования. К группе стандартного риска относились пациенты с inv(16)/t(16;16) с CBFβ-*MYH11* и t(8;21) с CBFα(*AML1*)/*ETO*. К группе высокого риска — больные с (-5/5q-), (-7/7q-), inv(3)/t(3;3), сложным кариотипом и аномалиями региона 11q23, кроме t(9;11). К группе среднего риска относились все остальные пациенты.

Критерием рефрактерности являлось отсутствие полной ремиссии (нормализация показателей периферической крови и количество бластных клеток < 5% в миелограмме) после проведения сдвоенного индукционного блока ADE-HAM. Рецидив констатировался при выявлении более 5% лейкемических бластных клеток в костном мозге или экстрамедуллярного поражения и/или любого количества бластных клеток в костном мозге с однозначными морфологическими признаками злокачественности (палочки Ауэра) с одновременным обнаружением транскрипта *AML/ETO* не менее чем через 1 месяц после установления первой полной клинико-гематологической ремиссии.

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Statistica 6.0. Вероятность общей (ОВ), бессобытийной (БСВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости рассчитана по методу Каплана–Майера. Сравнение выживаемости между группами выполнено при помощи log-rank-теста. Для непараметрических количественных данных определяли медиану, а также максимум и минимум вариационного ряда. Достоверность различий между исследуемыми группами исчислялась по методу Манна–Уитни, χ^2, точного теста Фишера. Оценивалась доверительная вероятность p, различия считались достоверными при $p \leq 0{,}05$.

Терапия

Дизайн протокола и блоки терапии приведены на рис. 1. Как видно из приведенных данных, пациенты с t(8;21), как и большинство остальных пациентов, получали двойную индукцию в режиме «интенсивного тайминга» — т. е. с уменьшением интервалов между инициальными курсами ХТ, суть которого заключалась в коротком (не более 10 дней) промежутке от окончания первой фазы индукции (модифицированная классическая схема ADE) и началом 2-й фазы (блок HAM). Консолидация ремиссии для больных с t(8;21) состояла из 3 блоков терапии, основой которых служили высокие дозы Ara-C. Пилотная версия протокола подразумевала применение «интенсивного тайминга» во всех 3 блоках консолидирующей ХТ (табл. 1); суммарная доза Ara-C в консолидации составляла 24 г/м², антрациклинов — 120 мг/м². Причиной отказа от «интенсивного тайминга» в 2 блоках консолидирующей терапии послужил высокий уровень летальности от инфекционных осложнений

Рис. 1. *Дизайн протокола ОМЛ-2000.*
Двойная индукция ADE-HAM:
ADE: Цитозин-арабинозин (Ara-C) 100 мг/м² № 14, в дни 1–7; VP-16 100 мг/м² № 3, в дни 1–3; Dnr 45 мг/м № 3, в дни 4–6.
HAM: Ara-C 1 г/м² № 4, в дни 14 и 15; Mit 10 мг/м² № 2, в дни 14 и 15.
Консолидация ремиссии 1 – HD Ara-C + Ida:
Ara-C 3 г/м² № 6, в дни 1–3; Ida 10 мг/м² № 3, в дни 2–4.
Консолидация ремиссии 2 – Capizzi:
Ara-C 1 г/м² № 4, в дни 1–2 и 8–9; L-asp 6000 МЕ/м² № 2, в дни 3 и 10.
Консолидация ремиссии 3 – AME-H:
Ara-C 2 г/м² № 6, в дни 1–3; VP-16 500 мг/м² № 1, в день 1; Mit 30 мг/м² № 1, в день 3.

Таблица 1. *Изменение консолидации для пациентов с t(8;21)*

Вариант	I	II	III
Консолидация 1	Capizzi + Vp: - Ara-C 1 г/м² № 8 в дни 1–2 и 8–9 - Vp-16 100 мг/м² № 4 в дни 1–2 и 8–9 - L-asp 6000 Ед/м² № 2 в дни 3 и 10	HDAra-C + Vp: - Ara-C 1 г/м² № 8 в дни 1–4 - Vp-16 100 мг/м² № 4 в дни 1–4	HDAra-C + Ida: - Ara-C 3 г/м² № 6 в дни 1–3 - Ida 10 мг/м² № 3 в дни 2–4
Консолидация 3	AME-H: - Ara-C 1 г/м² № 8 в дни 1–2 и 8–9 - Vp-16 500 мг/м² № 1 в день 2 - Mit 30 мг/м² № 1 в день 9 - L-asp 6000 Ед/м² № 2 в день 3 и 10	AME-H: - Ara-C 1 г/м² № 8 в дни 1–4 - Vp-16 500 мг/м² № 1 в день 2 - Mit 30 мг/м² № 1 в день 4 - L-asp 6000 Ед/м² № 1 в день 5	AME-H: - Ara-C 2 г/м² № 6 в дни 1–3 - VP-16 500 мг/м² № 1 в день 1 - Mit 30 мг/м² № 1 в день 3

(см. результаты лечения). Вторая версия отличалась от пилотной только дизайном — «интенсивный тайминг» использовался только во втором блоке консолидирующей терапии, суммарные дозы Ara-C и антрациклинов оставались прежними. Среди 16 пациентов группы стандартного риска с t(8;21), которые получали терапию согласно версиям I и II, у 3 (19%) развился рецидив. Это было расценено как недостаточная эффективность терапии и принято решение об эскалации доз антрациклинов и Ara-C для группы пациентов с t(8;21): в окончательной версии в консолидирующей терапии суммарная доза Ara-C составила 38 г/м², а антрациклинов (в пересчете на дауно-

рубицин) — 240 мг/м². Основная версия протокола представлена на рис. 1. Консолидация 2 согласно режиму Capizzi оставалась неизменной во всех версиях протокола. Проведение ТГСК пациентам с t(8;21) в первой ремиссии не планировалось. Оценка MRD выполнялась перед каждым блоком терапии, а после завершения терапии — один раз в 3 месяца, материалом для исследования был костный мозг.

Результаты исследования

Хромосомный анализ был проведен 152 (87,86 %) больным из 173. Цитогенетические аномалии обнаружены у 117 (67,63 %) больных. Структура цитогенетических характеристик группы больных, включенных в исследование, приведена на рис. 2. Молекулярно-биологическое исследование проведено 153 (88,44 %) пациентам из 173. Аномальные транскрипты обнаружены у 70 (45,75 %) больных из 153.

Группу детей с t(8;21) составили 33 (19 %) ребенка из 173. При проведении хромосомного анализа транслокация t(8;21)(q22;q22) выявлена у 29 (87,8 %) детей из 33. Аномальный транскрипт *AML1/ETO* был обнаружен у 32 (96,7 %) больных из 33 (табл. 2). У 29 больных данные цитогенетического исследования коррелировали с данными молекулярного анализа, т. е. были обнаружены t(8;21)(q22;q22) и *AML1/ETO*.

У 2 больных с обнаружением химерного транскрипта *AML1/ETO* цитогенетическое исследование не проводилось (пациенты № 1 и 2).

У 7 детей обнаружены и транскрипт *AML1/ETO* и t(8;21), без дополнительных цитогенетических изменений (пациенты № 3–9). У 12 детей помимо t(8;21) была выявлена потеря половой хромосомы, без других дополнительных хромосомных аномалий (пациенты № 10–21). У 3 пациентов с t(8;21) обнаружена дополнительная делеция 9-й хромосомы (пациенты № 22–24).

Пациенты № 25–28 кроме t(8;21) имели ряд дополнительных редких хромосомных аномалий, влияние которых на прогноз основного заболевания не известен, в связи с чем мы рассматривали их как аномалии, не ухудшающие прогноз.

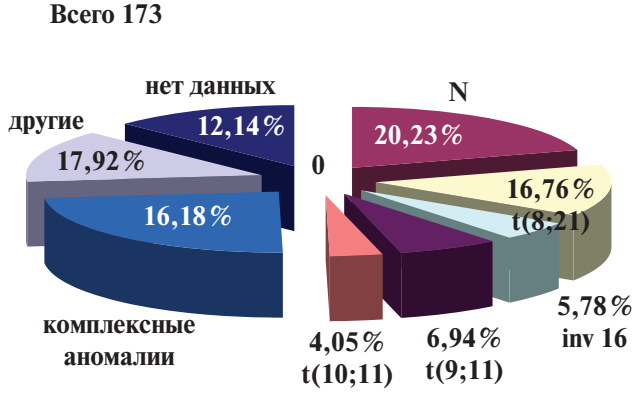


Рис. 2. *Структура цитогенетических аномалий у больных ОМЛ, получающих терапию по протоколу ОМЛ-ММ 2000, по данным хромосомного анализа*

Таблица 2. *Данные хромосомного и молекулярного методов исследования у пациентов с t(8;21)*

№ пациента	Кариотип	Транскрипт	Число больных
1, 2	Нет данных	*AML1/ETO*	2
3–9	46 XX (XY), t(8;21)	*AML1/ETO*	7
10–21	45X (-X/-Y), t(8;21)	*AML1/ETO*	12
22–24	t(8;21) del(9)	*AML1/ETO*	3
Редкие дополнительные аномалии в сочетании с t(8;21)*			
25	45X-Y, t(8;21) — 24 мет 44X-Y, t(8;21),(-20) — 6 мет	*AML1/ETO*	1
26	46XY, t (8;21), del (9) del(6)	*AML1/ETO*	1
27	47XX, t(8;21)+8	*AML1/ETO*	1
28	46XX, t(8;21) – 12 мет, 46XX, t(8;21) -18,+mar – 8 мет	*AML1/ETO*	1
Дополнительные потенциально неблагоприятные аномалии в сочетании с t(8;21)**			
29	46XY, t(8;21), 9q-,7q-	*AML1/ETO*	1
30	46XX, t(8;21), 7q+	Нет данных	1
31	46XX, t(8;21), 9q-,11q-	*AML1/ETO*	1
32	45XX,-7, i(17)(q10)	*AML1/ETO*[1]	1
33	45X-Y, t(8;21), del(7)	*AML1/ETO*	1

*Мет — количество метафаз; [1]контаминация была исключена; *не ухудшающие прогноз; **ухудшающие прогноз.*

Особую подгруппу составили 5 пациентов № 29–33, в чьих клетках помимо t(8;21) были выявлены хромосомные аномалии, затрагивающие 7-ю и 11-ю хромосому, нарушения в которых являются фактором, ухудшающим прогноз, что отразилось на результатах исследования в данной группе (см. результаты).

Среди всей группы детей были 11 (33 %) девочек и 22 (67 %) мальчика, медиана возраста составила 10,5 (2,7–16,8) лет. У 27 больных из 33 был М2-вариант согласно FAB-классификации, у 4 — М4, у 2 больных — М1, что составило 82 %, 12 % и 6 % соответственно.

Клинические характеристики пациентов в исследуемой группе были следующими: медиана количества лейкоцитов составила $18{,}6 \times 10^9$/л (3–$109{,}5 \times 10^9$/л), медиана количества бластных клеток в костном мозге — 66,5 % (19,5–88 %). Спленомегалия была отмечена у 14/33 (42,5 %) детей. Нейролейкоз выявлен у 8 (24 %) больных, экстрамедуллярное поражение — также у 8 пациентов (у 7 с локализацией в области лица — орбита, скуловая кость, веки; у 1 — хлорома позвоночного канала). У 4 больных нейролейкоз сочетался с наличием экстрамедуллярных очагов.

Два (6 %) пациента из 33 получили терапию, частично отличавшуюся от первоначально запланированной. Один пациент был исключен из настоящего исследования в связи с тяжелыми инфекционными осложнениями после первой консолидации. Один пациент был исключен из исследования после проведения двойной индукции по желанию родителей.

Результаты терапии

Результаты терапии ОМЛ в группе детей с t(8;21), в сравнении с остальными пациентами, представлены в табл. 3. Клинико-гематологическая и молекулярная ремиссия были достигнуты у 31/33 (94 %) пациента. Двое детей умерли от инфекционных осложнений во время аплазии кроветворения, 1 — закончил терапию по протоколу после курса индукции по желанию родителей. Соответственно, консолидирующую терапию получили 30 пациентов, из них 25 (75 % от всей группы больных с t(8;21)) полностью завершили терапию согласно протоколу. Одному больному проведение дальнейшей интенсивной противолейкемической терапии не было выполнимо в связи с тяжелыми инфекционными осложнениями, 4 пациента умерли в ремиссии на разных сроках проведения консолидации, в том числе 3 — после последнего блока ПХТ. У 10 (40 %) из 25 детей развился рецидив заболевания, медиана срока его развития составила 17,8 (9–88) месяца. Вероятность БСВ в течение 10 лет составила 0,45. Все дети с рецидивом получили противорецидивную терапию, в основном по международному протоколу Relapsed AML-2001/01, в котором индукция 2-й ремиссии проводилась флударабином, высокими дозами Ara-C и G-CSF (режим FLAG) в сочетании с липосомальным даунорубицином или без такового, с последующей обязательной миелоаблативной терапией и ТГСК. Частота достижения 2-й ремиссии составила 90 % [44, 45].

На рис. 3 представлены графики выживаемости в группе пациентов с t(8;21). Необходимо отметить, что внутри группы благоприятного прогноза имелись различия в результатах терапии. Так, у детей с inv(16), которые получали наименее интенсивную терапию (рис. 1), БСВ составила 0,70. Хотя эта величина существенно больше вероятности БСВ детей с t(8;21), это различие статистически недостоверно (p=0,16). Анализ цитогенетических характеристик

Таблица 3. *Результаты терапии ОМЛ в исследуемой группе больных с t(8;21)*

Результаты терапии	t(8;21)	Остальные пациенты	*p*
Смерть до ремиссии	2/33 (6 %)	8/140 (5,7 %)	0,6
Рефрактерность	0/33	13/140 (9,3 %)	0,09
Ремиссия	31/33 (94 %)	117/140 (83,6 %)	0,1
Смерть в I ремиссии	5/31 (16%)	10/117 (8,5 %)	0,2
Медиана I ремиссии, мес	23,1 (3,43–135,5)	12 (0–133,4)	0,18
Рецидивы	10/25 (40 %)	48/117 (41 %)	0,5
Медиана развития рецидива, мес	17,8 (9–88)	9,2 (1,4–133,4)	0,2
I полная ремиссия	13/31 (42 %)	57/117 (49 %)	0,4
EFS	0,45 + 0,09	0,36 + 0,04	0,22
RFS	0,55 + 0,09	0,48 + 0,05	0,25
OS	0,67 + 0,08	0,44 + 0,04	0,04

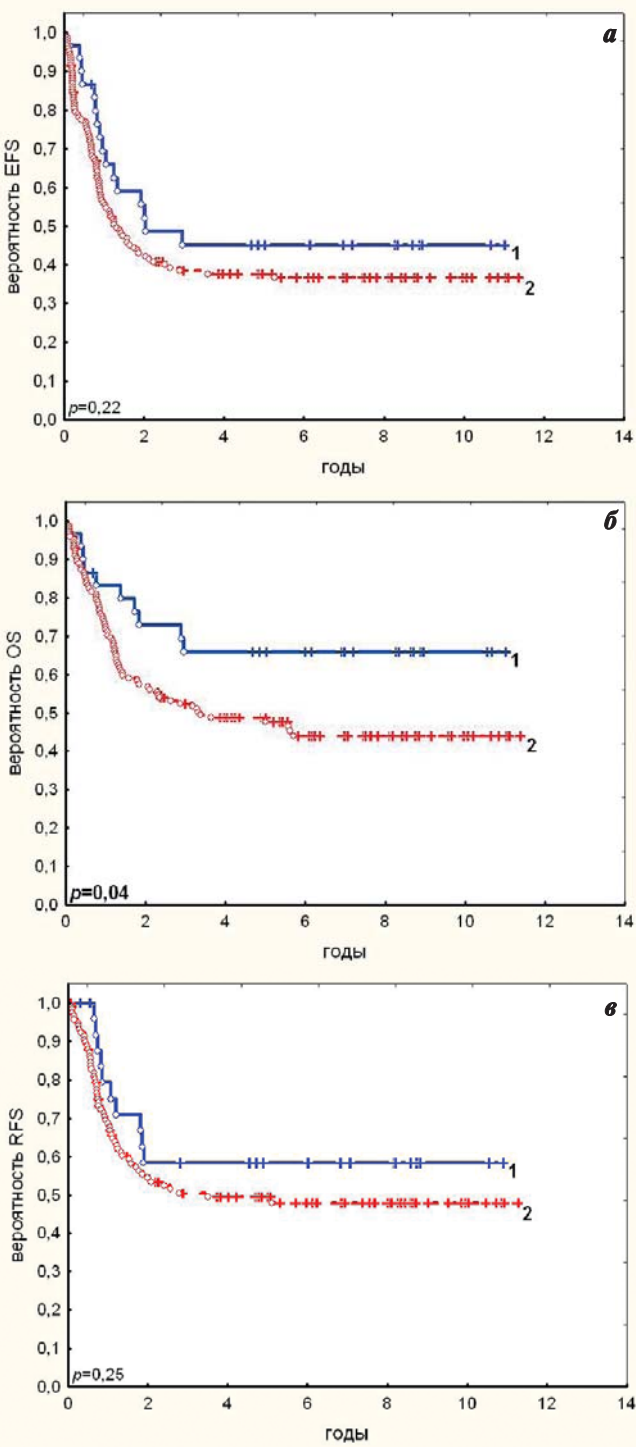


Рис. 3. *Выживаемость пациентов в зависимости от наличия t(8;21): А — EFS; Б — OS; В — RFS.*
Пациенты с t(8;21): EFS — 0,45 ± 0,09; OS — 0,67 ± 0,08; RFS — 0,55 ± 0,09. Пациенты без t(8;21): EFS — 0,36 ± 0,04; OS — 0,44 ± 0,04; RFS — 0,48 ± 0,05.

внутри группы больных с t(8;21) (см. табл. 2) показал, что результаты у больных с t(8;21) и потенциально неблагоприятными аномалиями были достоверно хуже результатов терапии в остальной группе: БСВ 0 и 0,34±0,16 соответственно (p=0,027) (рис. 4).

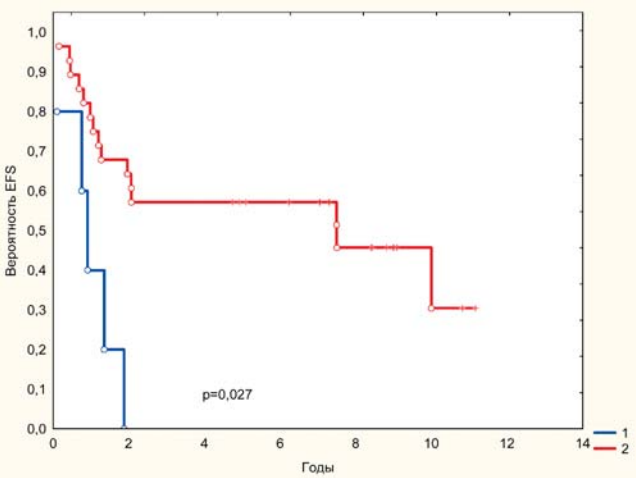


Рис. 4. *Вероятность EFS внутри группы пациентов с t(8;21):*
1 — пациенты с t(8;21) и потенциально неблагоприятными аномалиями EFS 0 (n=5);
2 — пациенты с t(8;21) из остальной группы EFS 0,34±0,16 (n=28)

Наличие нейролейкоза (8/33 пациентов) и экстрамедуллярного поражения (8/33 пациентов) не влияли на результаты терапии в группе больных с t(8;21) (табл. 4).

Анализ инфекционных осложнений больных, получавших терапию по протоколу ОМЛ-ММ-2000, показал, что у 7 (29%) из 24 больных с микробиологически подтвержденным сепсисом была t(8;21). Инфекции послужили причиной прекращения терапии у 2/148 (1,35%) больных в ремиссии. У одного из них была t(8;21).

Сравнительный анализ 3 разных вариантов консолидации не показал статистически достоверных различий в результатах терапии (табл. 5).

Анализ летальности

Из 33 больных с t(8;21) умерли 11 (33%). До достижения ремиссии умерли 2 ребенка (2/33, 6%): первый больной — от сочетанной инвазивной грибковой инфекции (ИГИ) (данные бактериологического исследования аутопсийного материала — *Rhodotorula rubra* и *Aspergillus fumigatus*); 2-й — от сочетания аспергиллезного поражения легких *Aspergillus flavus* и кровоизлияния в головной мозг (данные аутопсии).

Таблица 5. *Сравнительный анализ различных вариантов консолидирующей терапии у пациентов группы t(8;21)*

Консолидация	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Всего больных	p
Число больных	5	11	14	30*	0,6
Смерть в ремиссии	2	3	0	5	0,09
Рецидив	1	2	7	10	0,1
I полная ремиссия	2	5/1 lost	6/1 снят	13/1 lost	0,2

** 30 больных получили консолидацию ремиссии, так как 2 больных погибли до достижения ремиссии, и один больной снят с протокола после блока индукции.*

В первой полной ремиссии умерли 5 (15,2%) пациентов из 33: 2 от ИГИ (*Fusarium, Asp. flavus*) и 2 — от бактериальной инфекции (сепсис — *Ps. aeruginosa*). Необходимо отметить, что эти 4 пациента составляют 50% от всех больных с ОМЛ, умерших в первой ремиссии от инфекционных осложнений. Один больной погиб от несчастного случая. От рецидива в группе t(8;21) умерли 3 больных. Один больной умер после проведения ТГСК во 2-й ремиссии.

Общие результаты лечения (рис. 5)

Всего среди больных из группы t(8;21) в настоящее время жив 21 (70%) ребенок, из них в первой ремиссии 13 (39,4%) детей, и 8 (24,3%) детей — во 2-й ремиссии. Один больной потерян из-под наблюдения в первой ремиссии на сроке наблюдения 6,8 месяца. Умерли 11 (33%) детей из 33.

Обсуждение

Применение интенсивной ПХТ и ТГСК, современной сопроводительной терапии, дифференциру-

Таблица 4. *Вероятность EFS, RFS, OS у пациентов с t(8;21) в зависимости от наличия нейролейкоза и экстрамедуллярных поражений*

	Н +	Н –	p	Х +	Х –	p	(Н+Х) +	(Н+Х) –	p
n	8	25		8	25		4	21	
EFS	0,37±0,17	0,59±0,09	0,8	0,36±0,17	0,52±0,09	0,8	0,50±0,25	0,57±0,09	0,8
RFS	0,37±0,17	0,63±0,09	0,2	0,38±0,17	0,63±0,11	0,2	0,50±0,25	0,73±0,11	0,7
OS	0,75±0,15	0,64±0,09	0,4	0,75±0,15	0,64±0,09	0,4	0,75±0,2	0,65±0,09	0,6

n — число пациентов, Н — нейролейкоз, Х — хлоромы, + присутствовали, – не было.

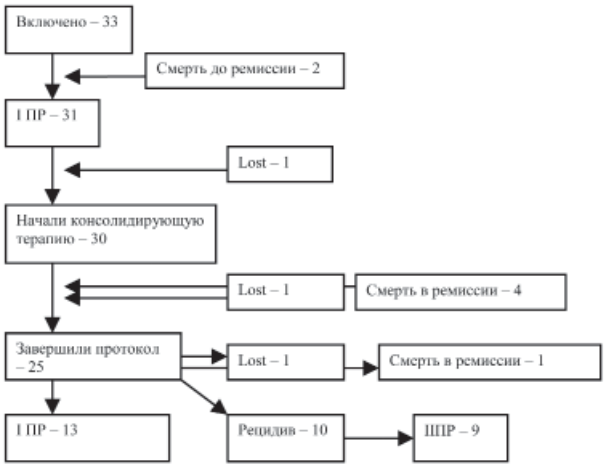


Рис. 5. *Общие данные о результатах терапии в группе пациентов с t(8;21)*

ющей терапии в зависимости от биологических характеристик лейкемических клеток позволили увеличить продолжительность жизни больных с ОМЛ в отдельных подгруппах до 60–70% [3, 4]. Дальнейший прогресс результатов терапии возможен только вследствие лучшего понимания биологических основ развития ОМЛ и выявления новых генетических маркеров заболевания [19]. Только это позволит полностью реализовать идею дифференцированной терапии, возможность воплощения которой отлично демонстрируют результаты лечения детей с ОМЛ с inv(16), которым для получения наилучших результатов (вероятность достижения ремиссии — 100%, медиана продолжительности ремиссии — 52 месяца, вероятность БСВ — 70%) требуется наименее агрессивная терапия из всей группы не-М3 ОМЛ. Результаты лечения больных с другой «благоприятной» хромосомной аномалией t(8;21) оказались если и не разочаровывающими, то, по крайней мере, хуже, чем при inv(16), несмотря на существенно более интенсивную терапию: частота ремиссии — 94%, медиана ее продолжительности — 21,3 месяца, БСВ — 48%. Эти результаты существенно уступают данным других групп, несмотря на весьма схожие принципы терапии, дозы и «компоновку» химиопрепаратов. Очевидно, что расхождения в результатах объясняются как высоким уровнем инфекционной летальности, так и рецидивами заболевания. Одной из особенностей пациентов с t(8;21) в нашем исследовании стал высокий риск доказанных бактериальных и грибковых инфекций, что уже неоднократно отмечалось в литературе. Учитывая высокий риск как прямой инфекционной летальности, так и связанной с инфекциями невозможности дальнейшего проведения эффективной противолейкемической терапии, при ведении таких пациентов необходим самый высокий стандарт сопроводительной терапии.

Интересно, что наихудшие результаты в нашем исследовании были получены у пациентов в группе t(8;21) с потенциально неблагоприятными аномалиями, в которой вероятность БСВ составила 0. Похожие тенденции выявлены и другими исследовательскими группами. Таким образом, пациенты этой группы с учетом высокой вероятности рецидива могут расцениваться как кандидаты на аллогенную ТГСК в первой ремиссии. Эти данные еще раз подтвердили, что при применении современной терапии внутри группы с t(8;21) существуют разные субварианты заболевания, прогноз которых определяется дополнительными факторами. Соответственно, для выделения истинно благоприятной группы больных с t(8;21) необходима всеобъемлющая диагностика — хромосомный анализ и расширенное молекулярно-генетическое исследование с целью выявления всех значимых факторов прогноза. Это станет следующим шагом на пути к более дифференцированному лечению.

Литература

1. Pui C.H., Schrappe M., Ribeiro R.C. et al. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004:118–45.
2. Kaspers G.J., Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. Leukemia 2005 Dec;19(12):2025–9.
3. Creutzig U., Zimmermann M., Ritter J. et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. Leukemia 2005 Dec;19(12):2030–42.
4. Gibson B.E., Wheatley K., Hann I.M. et al. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. Leukemia 2005 Dec;19(12):2130–8.
5. Rowley J.D. Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. Ann Genet 1973;16:109–12.
6. Ferrara F., Del Vecchio L. Acute myeloid leukemia with t(8;21)/AML1/ETO: a distinct biological and clinical entity. Haematologica 2002;87:306–19.
7. Strout M.P., Marcucci G., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. Core-binding factor (CBF) and MLL-associated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications. Ann Hematol 1999;78:251–64.
8. Marcucci G., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. Molecular and clinical advances in core binding factor primary acute myeloid leukemia: a paradigm for translational research in malignant hematology. Cancer Invest 2000; 18:768–80.
9. Raimondi S.C., Chang M.N., Ravindranath Y., Behm F.G., Gresik M.V., Steuber C.P. et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study — POG 8821. Blood 1999;94:3707–16.
10. Hiddemann W., Büchner T., Ritter J. et al. Acute Leukemias IX. Basic research, experimental approaches and novel therapies.
11. Andrieu V., Radford-Weiss I., Troussard X., Chane C., Valensi F., Guesnu M. et al. Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. Br J Haematol 1996;92:855–65.
12. Hurwitz C.A., Raimondi S.C., Head D., Krance R., Mirro J. Jr, Kalwinsky D.K. et al. Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. Blood 1992;80:3182–8.
13. Kita K., Nakase K., Miwa H., Masuya M., Nishii K., Morita N. et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia asso-

ciated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B cell antigen CD19 together with the stem cell antigen CD34. Blood 1992;80:470–7.
14. Kita K., Shirakawa S., Kamada N. Cellular characteristics of acute myeloblastic leukemia associated with t(8;21)(q22;22). The Japanese Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. Leuk Lymphoma 1994;13:229–34.
15. Dusenbery K.E., Howells W.B., Arthur D.C. et al. Extramedullary leukemia in children with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group. J Pediatr Hematol Oncol. 2003 Oct;25(10):760–8.
16. Kobayashi R., Tawa A., Hanada R. et al. Extramedullary infiltration at diagnosis and prognosis in children with acute myelogenous leukemia. Pediatr Blood Cancer 2007 Apr;48(4):393–8.
17. Schwyzer R., Sherman G.G., Cohn R.J. et al. Granulocytic sarcoma in children with acute myeloblastic leukemia and t(8;21). Med Pediatr Oncol 1998 Sep;31(3):144–9.
18. Tallman M.S., Hakimian D., Shaw J.M., Lissner G.S., Russell E.J., Variakojis D. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 1993;11:690–7.
19. Byrd J.C., Weiss R.B., Arthur D.C., Lawrence D., Baer M.R., Davey F. et al. Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22; q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461. J Clin Oncol 1997;15:466–75.
20. Grimwade D., Walker H., Oliver F. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 1998;92:2322–33.
21. Marcucci G., Mrozek K., Ruppert A.S. et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol 2005;23:5705–17.
22. Heim S., Mitelman F. Quantitative acute leukemia cytogenetics. Cancer cytogenetics. Second ed. Chichester et al. Wiley-Liss; 1995.
23. Lin P., Chen L., Luthra R., Konoplev S.N., Wang X., Medeiros L.J. Acute myeloid leukemia harboring t(8;21)(q22;q22): a heterogeneous disease with poor outcome in a subset of patients unrelated to secondary cytogenetic aberrations. Department of Hematopathology, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77003, USA. peilin@mdanderson.org.
24. Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A. et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. Blood 2000 Dec 15;96(13):4075–83.
25. Schoch C., Haase D., Haferlach T. et al. Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. Leukemia 1996;10:1288–95.
26. Sarriera J.E., Albitar M., Estrov Z. et al. Comparison of outcome in acute myelogenous leukemia patients with translocation (8;21) found by standard cytogenetic analysis and patients with AML1/ETO fusion transcript found only by PCR testing. Leukemia 2001 Jan;15(1):57–61.
27. Kiyoi H., Naoe T. Biology, clinical relevance, and molecularly targeted therapy in acute leukemia with FLT3 mutation. Int J Hematol 2006 May;83(4):301–8.
28. Doepfner K.T., Boller D., Arcaro A. Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. Crit Rev Oncol Hematol 2007 Sep;63(3):215–30. Epub 2007 Jul 19.
29. Testa U., Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. Haematologica 2007 Jan;92(1):81–94.
30. Kondo M., Horibe K., Takahashi Y. et al. Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. Med Pediatr Oncol 1999 Dec;33(6):525–9.
31. Meshinchi S., Alonzo T.A., Stirewalt D.L. et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. Blood 2006 Dec;108(12):3654–61. Epub 2006 Aug 15.
32. Zwaan C.M., Meshinchi S., Radich J.P. et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. Blood 2003 Oct;102(7):2387–94.
33. Heibert S.W., Lutterbach B., Durst K. et al. Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins. Cancer Chemother Pharmacol 2001 Aug;48 Suppl 1:31–4.
34. Boissel N., Leroy H., Brethon B. et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). Leukemia 2006 Jun;20(6):965–70.
35. Paschka P., Marcucci G., Ruppert A.S., Mro´zek K. et al. Adverse Prognostic Significance of KIT Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia With inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol 2006 Aug;24:3904–11.
36. Shimada A., Taki T., Tabuchi K. et al. *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. BLOOD March 2006:107,5:1805–9.
37. Nucifora G., Larson R.A., Rowley J.D. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. Blood 1993;82:712–5.
38. Saunders M.J., Tobal K., Yin J.A. Detection of t(8;21) by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in remission of acute myeloid leukemia type M2 after chemotherapy or bone marrow transplantation. Leuk Res 1994;18:891–5.
39. Miyamoto T., Nagafuji K., Akashi K. et al. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. Blood 1996;87:4789–96.
40. Tobal K., Newton J., Macheta M., Chang J. et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. Blood 2000;95:815–9.
41. Morschhauser F., Cayuela J.M., Martini S., Baruchel A. et al. Evaluation of Minimal Residual Disease Using Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction in t(8;21) Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Study of 51 Patients. J Clin Oncol 2000;18:788–94. 2000 by American Society of Clinical Oncology.
42. Swerdlow S.H., Campo E., Yarris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th Ed.).International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2008; p. 439.
43. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. Br J Haematol 1976 Aug;33(4):451–8.
44. Kaspers G.J.L., Zwaan C.M. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. Haematologica/the hematology journal 2007;92(11):1519–32.
45. Kaspers G.J.L., Zimmermann M., Reinhardt D., Tamminga R., Maschan A. et al. Clinical relevance of early treatment response in pediatric relapsed acute myeloid leukemia (AML): study relapsed AML 2001/01. Annals of Hematology;Vol 87 (Suppl 1) February 2008.

Пути улучшения результатов лечения злокачественных опухолей у подростков и молодых взрослых

А.Г. Румянцев, В.В. Птушкин, С.В. Семочкин

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва

Контакты: *Вадим Вадимович Птушкин vadimvadim@inbox.ru*

В настоящей статье представлен обзор клинических и биологических особенностей наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей у подростков и молодых взрослых. На основе собственного опыта обобщены сведения по наиболее эффективным педиатрическим и общеонкологическим подходам к лечению описанных патологий.

Ключевые слова: *подростки, молодые взрослые, ОЛЛ, ДВККЛ, остеосаркома*

Approaches to improvement of treatment results of malignant tumors in adolescents and young adults

A.G. Rumyantsev, V.V. Ptushkin, S.V. Semochkin

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

This article provides an overview of clinical and biological features of most common malignant tumors in adolescents and young adults. The most effective pediatric and oncological treatment approaches to described diseases based on own experience are summarized.

Key words: *adolescents, young adults, ALL, DBLCL, osteosarcoma*

Нозологическая структура онкологической заболеваемости характеризуется возрастной динамикой. Превалирующие группы опухолей у детей и у взрослых могут меняться радикальным образом. Если в 1-й группе чаще встречаются лейкозы и саркомы, то во 2-й это, в первую очередь, рак различных локализаций и лейкозы и лимфомы в приблизительно одинаковом соотношении. При этом с возрастом также может меняться и результативность стандартного лечения одних и тех же нозологий. Например, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) у пациентов старше 50 лет при сходном лечении рецидивирует в несколько раз чаще, чем у детей. Аналогичные наблюдения имеются и для примитивных нейроэктодермальных опухолей центральной нервной системы (ЦНС), где даже небольшое увеличение возраста — когорты 15–19 лет и 20–24 года — снижает долговременную выживаемость на четверть. Это влияет на терапевтические приоритеты, определяемые соотношением токсичность/эффективность, особенно в группах пожилых пациентов. У детей, как правило, используют интенсивные подходы к лечению (высокодозная, дозоинтенсивная химиотерапия), в то время как у пожилых больных интенсивность терапии снижается из-за высокой токсичности. Что касается промежуточной группы — подростков от 15 до 19 лет и молодых взрослых от 20 до 29 лет, то она может сочетать в себе особенности двух групп [1]. В настоящее время на эту «серую» возрастную зону все чаще обращают внимание как педиатры, так и онкологи в связи с отсутствием существенного прогресса в ее лечении и большим количеством противоречий, возникающих при использовании как «взрослых», так и «детских» подходов [2, 3].

Подростки и молодые взрослые составляют соответственно 6,5 и 17,2% населения России, при этом заболеваемость злокачественными опухолями у них превышает таковую у детей в 1,3 и 4,0 раза соответственно [4]. Популяционный анализ эффективности лечения злокачественных опухолей в США в группе молодых пациентов в возрасте от 15 до 45 лет показывает, что за последние 25 лет произошло очень незначительное улучшение выживаемости, в то время как у детей до 15 лет и у взрослых старше 45 лет был достигнут очевидный прогресс. В отношении пациентов 25–35 лет вообще не было зарегистрировано положительных изменений [5]. К числу основных причин ограниченной эффективности лечения злокачественных опухолей у подростков и лиц молодого возраста в сравнении с детьми относят низкий процент включения молодых пациентов в клинические исследования [6], особенности переносимости терапии [7], клинико-биологические особенности опухолей и чувствительности малигнизированных клеток к химиопрепаратам [8]. Таким образом, различия между возрастными группами, возможно, касаются не только нозологической структуры нео-

плазий, но также могут затрагивать различия в биологии опухолей и в лечебных подходах.

Подростки и молодые взрослые — это особая группа и с точки зрения приоритетов сохранения фертильной и когнитивной функций. Применяемые варианты лечения должны обязательно учитывать необходимость сохранения репродуктивного здоровья, возможность получать полноценное образование и реализовывать свои способности. Терапию также необходимо проводить с учетом влияния на качество жизни больных. С этой точки зрения чрезвычайно важно учитывать те психологические проблемы, которые сопровождают переход человека во взрослую жизнь. Без учета этих факторов трудно рассчитывать на достижение взаимопонимания между пациентом и врачом и, как следствие, на дисциплинированное отношение больного к длительному и, порой, мучительному лечению.

Целью настоящей статьи является анализ существующих данных, касающихся различий в результативности лечения в группе подростков и молодых взрослых с онкологическими новообразованиями, оценка возможных объяснений этого, а также рассмотрение путей улучшения результатов лечения.

Превалирующий спектр новообразований

Подростки (15–19 лет) и молодые взрослые (20–29 лет) имеют свой особый спектр опухолей (рис. 1) [9]. Лишь 11 нозологических форм составляют 95% от общей заболеваемости неоплазиями в этой возрастной группе, причем 4 из них (лимфомы, рак щитовидной железы, рак яичка и меланома) составляют более половины от общего числа заболевших. В то же время даже на этом относительно небольшом возрастном отрезке состав основных нозологий продолжает меняться. Острые лейкозы, частота которых составляет 12% у подростков, снижают свое представительство у молодых взрослых до 4% (в основном за счет сокращения заболеваемости ОЛЛ), также как частота опухолей ЦНС уменьшается с 10% до 5%. Напротив, частота инвазивных форм рака кожи (в основном за счет меланомы) возрастает с 8% до 18% [1]. Лимфопролиферативные заболевания, опухоли репродуктивной системы и эндокринной системы (преимущественно рак щитовидной железы) сохраняют относительно стабильное представительство. Эти данные могут косвенно свидетельствовать о зависимости патогенеза некоторых опухолей, например ОЛЛ, от изменений, сопровождающих созревание организма.

Биологические различия

Многие эксперты отсутствие прогресса в результатах лечения группы подростков и молодых взрослых видят в недостатке информации о возможных биологических отличиях данной популяции [5]. Это касается генетических поломок, определяющих канцерогенез, изменений гормонального статуса, а так-

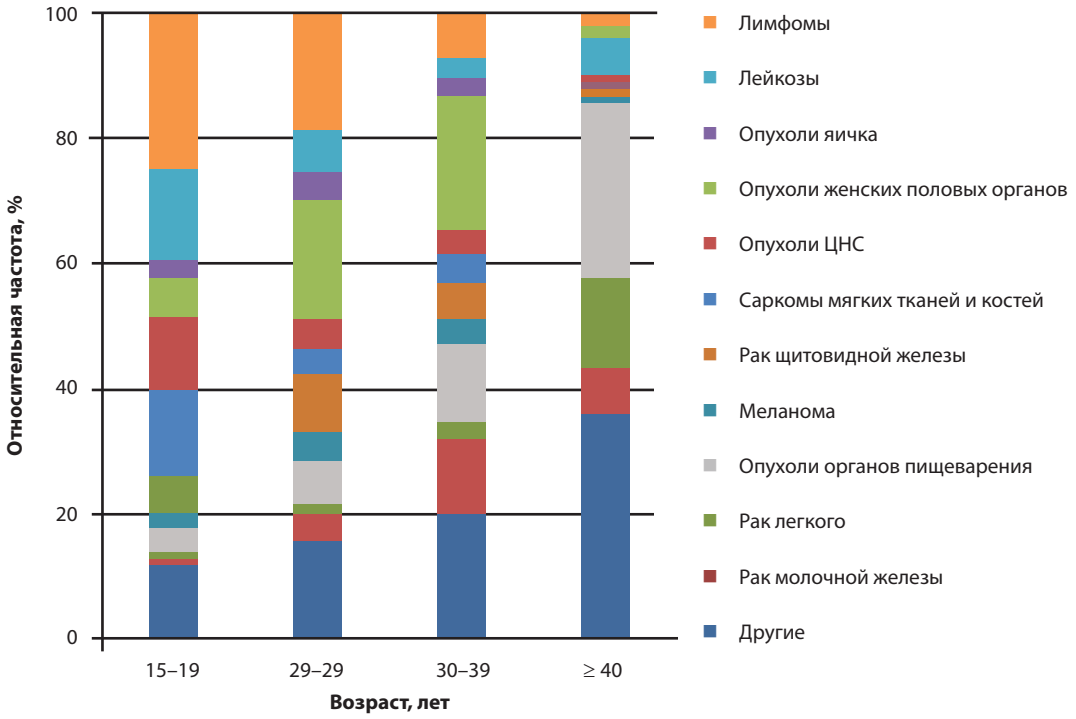


Рис. 1. *Относительная частота встречаемости отдельных злокачественных опухолей в зависимости от возраста для пациентов > 14 лет (данные по России за 2007 г. [9]).*

Примечание. *На графике представлены комбинированные данные по пациентам мужского и женского пола; раздел «Другие» включает опухоли ЛОР-органов, рак предстательной железы, почки, мочевого пузыря и множественную миелому.*

же индивидуальных особенностей фармакогеномики. В качестве примера различий механизмов канцерогенеза можно привести стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST). Подавляющее большинство взрослых пациентов с подобным вариантом неоплазий имеют мутации KIT (85%) или EGFRA (5%) в клетках опухоли. В этих случаях высока эффективность блокатора тирозинкиназы иматиниба. В подростковой популяции эти мутации крайне редки. Учитывая высокую эффективность иматиниба именно при мутации KIT, многие специалисты рекомендуют разрабатывать для молодых больных иную стратегию лечения [10]. Следует отметить, что сведений о генетических изменениях в клетках опухоли в группе подростков и молодых взрослых недостаточно. Отчасти это связано с дефицитом материала для исследований. В настоящее время во всех крупных онкологических центрах существуют банки образцов, где при сверхнизких температурах хранятся небольшие образцы опухолей. Этот материал служит источником информации при углубленных генетических исследованиях, однако далеко не все ткани, полученные при биопсии опухоли, направляются в подобные банки. Хуже всего ситуация обстоит в подгруппе подростков, где при более высокой, в 2–4 раза по сравнению с детьми, заболеваемости количество образцов приблизительно то же самое [11].

Фармакокинетика

Одним из факторов, потенциально влияющих на результативность лечения подростков и детей, служат различия в фармакокинетике противоопухолевых препаратов. Известно, что концентрация препарата в крови и длительность его экспозиции во многом определяют эффективность и токсичность противоопухолевого лечения. В исследованиях I фазы у взрослых большинство этих параметров тщательно контролируется. Подростки, проходящие лечение во взрослых стационарах, получают схемы химиотерапии, разработанные на основе этих данных. Однако основные процессы, влияющие на поступление, распределение и выведение препаратов, меняются с возрастом. Абсорбция из желудочно-кишечного тракта определяется кислотностью содержимого желудка, интенсивностью перистальтики, активностью ферментов и состоянием слизистой. Основное формирование пищеварительной системы завершается ко второму году жизни [12], но информации о ее функциональных свойствах в период от 2 до 18 лет недостаточно. Отличия в процессах распределения лекарственных препаратов у взрослых и детей определяются рядом факторов, включая разное соотношение содержания воды, внеклеточной жидкости, жировой ткани и связывающей способности белков плазмы. Например, сокращение доли воды с 75% массы тела у доношенных младенцев до 55% у взрослых сопровождается снижением объема распределения таких антибиотиков, как аминогликозиды в тканях с 35% до 20–25% [13]. Содержание жировой ткани, повышаясь между пятью и десятью годами, в последующем проградиентно снижается к семнадцати годам, что может сходным образом менять объем распределения некоторых липофильных препаратов [14]. Биотрансформация препаратов является одним из важнейших путей их метаболизма. Окислительно-восстановительные реакции определяют инактивацию, активацию или трансформацию в формы, способные к конъюгированию и выведению. Эти процессы меняются по мере созревания организма и во многих случаях протекают более активно у детей, чем у взрослых, определяя различие метаболических профилей одного препарата. Противоопухолевое действие многих цитостатиков напрямую зависит от их дозы, а доза, в свою очередь, определяется переносимой токсичностью. Высокая активность некоторых процессов метаболизма у детей сопровождается увеличением переносимости разовой дозы для таких химиопрепаратов, как этопозид на 20%, а доксорубицин — на 35% в сравнении с взрослыми. Данных по пограничным возрастным группам в настоящее время недостаточно. Что касается почечной экскреции, то этот путь выведения препаратов, созревая к одному году, в последующем с возрастом принципиально не меняется [15].

Обзор широкого спектра исследований показал существенные различия в фармакокинетике таких препаратов, как блеомицин, циклофосфамид, идарубицин, ифосфамид, метотрексат, винкристин у детей и взрослых [16]. Ситуация в промежуточной возрастной группе исследована значительно меньше, что, по мнению ряда экспертов, препятствует достижению прогресса в противоопухолевом лечении подростков и молодых взрослых и должно быть исправлено.

Участие в клинических исследованиях

В целом ряде работ показано, что дети со злокачественными новообразованиями, включенные в контролируемые исследования или получающие лечение по зарегистрированным протоколам, имеют лучшие показатели выживаемости [17]. Это было отмечено при лечении гематологических новообразований (ОЛЛ, лимфомы), а также солидных опухолей (мягкотканые саркомы). В США группа онкологических исследований в педиатрии Children Oncology Group (COG) охватывает в различных мультидисциплинарных протоколах до 90% детей с неоплазиями. Ситуация в пограничной возрастной группе значительно менее оптимистична даже для США. Сравнительно недавно проведенный анализ ситуации показал, что дети от 0 до 14 лет охвачены протоколами COG в 87% случаев против 36% в возрастном интервале 15–19 лет. При этом показатель общей выжи-

ваемости был значимо ниже у пациентов, включенных в протоколы, в сравнении с леченными по рекомендациям конкретного медицинского центра при таких характерных для детского возраста неоплазиях, как ОЛЛ (83,3 % и 53,3 % соответственно; $p < 0,05$) или все лейкозы (75,1 % и 46,3 % соответственно; $p = 0,0015$). Анализ этих показателей для подростков (15–19 лет) принципиально не отличался от всей группы. Риск смерти в течение 5 лет от постановки диагноза был ниже при стандартизованном лечении на 62 % для больных ОЛЛ, на 65 % — для саркомы Юинга и на 26 % — для остеосаркомы [1]. Напротив, для некоторых опухолей (герминогенные опухоли яичка, карциномы), для которых чаще используют «взрослые» подходы к лечению, результаты были лучше вне исследований COG. Это может свидетельствовать о преимуществе «взрослых» подходов для части пограничной возрастной популяции.

Различный прогноз на одинаковой терапии: фармакокинетика и токсичность лечения

Помимо накапливающихся данных по различной биологии опухолей у подростков и молодых взрослых, появляются дополнительные доказательства, что прогноз основных вариантов онкологических заболеваний у данных категорий больных отличается от такового на той же самой терапии от детей и основной популяции взрослых. Опухоли подростков и молодых взрослых с худшей выживаемостью по сравнению как с детьми, так и взрослыми включают в себя рак молочной железы, колоректальный рак, саркомы мягких тканей и лейкозы. Результаты лечения таких заболеваний, как ОЛЛ, саркома Юинга, опухоли почек (включая опухоль Вильмса), лимфома Ходжкина, рак шейки матки, яичника, опухоли головного мозга и рак печени, — хуже, чем у детей [1].

Выраженность токсических реакций зависит от многих факторов, включая возраст, пол, расу, конституцию и особенности фармакогенетики [7]. У детей старше 10 лет, особенно подростков, выше риск развития асептических некрозов костей, гипергликемии, мукозитов, тифлитов и смерти от инфекционных осложнений [18–20]. В то же время жизнеугрожающие инфекции и органные нарушения чаще развиваются у пожилых, чем у молодых пациентов [21].

Во франко-бельгийском исследовании Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) 2003 г. возраст 45 лет был назван критическим в отношении переносимости интенсивной терапии [22]. Интенсивную терапию по педиатрическому протоколу получили 225 взрослых пациентов с Ph-негативным ОЛЛ в возрасте от 15 до 60 лет (медиана — 31,0 год). В исследовании был сделан акцент на увеличение кумулятивных доз немиелотоксичных препаратов (преднизолон, винкристин и L-аспарагиназа). Частота токсических смертей для пациентов моложе и старше 45 лет составила 5 % и 22 % соответственно ($p < 0,01$).

Острый лимфобластный лейкоз

Возраст, иммунофенотип и инициальное число лейкоцитов являются наиболее важными прогностическими факторами для ОЛЛ. В педиатрии в качестве группы стандартного риска с относительно благоприятным прогнозом определяют пациентов с В-линейным ОЛЛ в возрасте от 1 до 10 лет с числом лейкоцитов $< 50 \times 10^9$/л [23]. Во взрослой практике прогноз также ухудшается с увеличением возраста и числа лейкоцитов, однако четких рекомендаций по делению больных на группы риска на основе данных параметров не существует. По крайней мере, в случае ОЛЛ из В-клеток-предшественников имеется очевидное ухудшение результатов терапии с увеличением возраста больных (рис. 2). Самая высокая 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) получена у детей от 1 до 5 лет — более 80 % [24]. Результаты лечения подростков и взрослых хуже: 5-летняя БСВ составляет менее 60 и 40 % соответственно [25, 26].

В случае Т-клеточного ОЛЛ нет столь очевидной связи с возрастом пациентов, БСВ по данным разных взрослых и педиатрических исследований составляет до 60 % [26, 27]. Эффективность лечения Т-ОЛЛ хуже, чем Ph-негативного В-линейного ОЛЛ, при этом частота этого варианта ОЛЛ максимальна именно в группе подростков и молодых взрослых [28]. Помимо иммунофенотипа, мужской пол часто рассматривается как фактор неблагоприятного прогноза [29]. Здесь важно упомянуть, что помимо общеизвестных пиков заболеваемости ОЛЛ в детском и пожилом возрасте, существует третий, не столь заметный пик, характерный для подростков и молодых взрослых, обусловленный преимущественно лицами мужского пола [1, 28]. Таким образом, сочета-

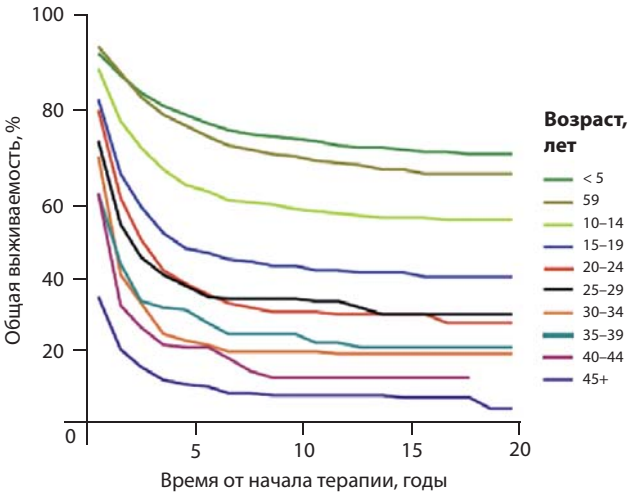


Рис. 2. *ОВ пациентов с ОЛЛ в зависимости от возраста (США, 1975–1998 г. [1])*

ние мужского пола и Т-клеточного иммунофенотипа служат факторами, ухудшающими прогноз для подростков и молодых людей с ОЛЛ.

Важное прогностическое значение имеют количественные и структурные хромосомные нарушения, выявляемые в лейкемических клетках. Плохой прогноз ассоциируется с транслокациями *MLL-AF4* t(4;11) и *BCR-ABL* t(9;22). Приблизительно в 50% случаев ОЛЛ у младенцев, 2% у детей и 5–6% у взрослых имеет место t(4;11). Частота случаев с t(9;22) растет с возрастом: от 3% у детей до 20% у взрослых и более чем у 50% больных старше 50 лет [30, 31]. Возраст сам по себе влияет на прогностическую значимость многих генетических нарушений. Так, дети с t(9;22) в возрасте от 1 до 9 лет имеют более благоприятный прогноз по сравнению с подростками с такой же транслокацией, а последние, в свою очередь, имеют лучший прогноз, чем взрослые с Ph-позитивным ОЛЛ [30, 31]. Среди пациентов с химерным геном *MLL-AF4* прогноз хуже у младенцев, чем у детей старшего возраста, а наиболее неблагоприятный прогноз имеют взрослые [31].

В основе этих возрастных различий могут лежать биологические отличия опухоли у детей и взрослых. Так, установлено, что профиль чувствительности лимфобластов к цитостатикам *in vitro* различается у детей и подростков. Анализ случаев В-линейных ОЛЛ показал, что у подростков в 7 раз чаще наблюдается резистентность к преднизолону, в 4 раза — к дексаметазону, в 13 раз — к L-аспарагиназе и 2,6 раза — к 6-меркаптопурину ($p > 0,05$) [8].

Подростки могут лечиться как в педиатрических, так и во взрослых клиниках. Подходы к лечению при этом могут существенно различаться в силу вполне объективных обстоятельств. В частности, при включении в унифицированный взрослый протокол пациентов в возрасте от 15 до 60 лет заведомо ограничивается интенсивность лечения для молодых пациентов, поскольку приходится учитывать ограниченную переносимость лечения у старших пациентов. При том, что в ряде исследований было продемонстрировано значимое преимущество педиатрических протоколов над взрослыми для лечения подростков и молодых взрослых с ОЛЛ (табл. 1).

Нами накоплен большой опыт лечения подростков и молодых взрослых по протоколам, принятым в педиатрической практике [32]. В период с 12.1997 г. по 03.2008 г. в исследование было включено 77 пациентов (мужчины — 48, женщины — 30) в возрасте от 15 до 37 лет (медиана 19,3 года) с первичным ОЛЛ. По протоколу ALL-BFM-90m было пролечено 43 пациента (набор завершен 09.2005 г.), по ALL-MB-91 — 21 (06.2007 г.) и ALL-MB-2002 — 13 (03.2008 г.). Полной ремиссии достигли 87% паци-

Таблица 1. *Результаты сравнительных ретроспективных исследований по лечению подростков и молодых взрослых с ОЛЛ*

Протоколы	Период, годы	*n*	Возраст, лет	ПР, %	БСВ, %	ОВ, %	Выводы	Ссылки
FRALLE-93, Франция (пед.)	1993–1994	77	15–20	94	67 (5 лет)	78	Преимущество педиатрического протокола	[34]
LALA-94, Франция (взр.)	1993–1994	100	15–20	83	41 (5 лет)	45		
CCG-1800, США, Канада (пед.)	1989–1995	197	16–20	90	63 (7 лет)	67	Преимущество педиатрического протокола	[33]
GALGB 8811-9511, США, Канада (взр.)	1988–2001	124	16–20	90	34 (6 лет)	46		
DCOG, Дания (пед.)	1985–1999	47	15–18	98	69 (5 лет)	79	Преимущество педиатрического протокола	[35]
NOVON, Дания (взр.)	1985–1999	44	15–18	91	34 (5 лет)	45		
BFM-83, NOPHO 92/ 2000, Финляндия (пед.)	1990–2004	128	13 (10–18)	96	67 (5 лет)	77	Не выявлено значимых различий между педиатрическим и взрослым протоколами	[37]
«Взрослые» протоколы, Финляндия	1990-2004	97	19 (15–26)	97	60 (5 лет)	70		
BFM-90m, ALL-MB 91/ 2002, Россия (пед.)	1997–2008	40	16 (15–19)	86	67 (6 лет)	67	Нет различий между подростками и молодыми взрослыми при лечении по педиатрическим протоколам	[32]
	1997–2008	37	23 (20–37)	89	54 (6 лет)	64		
ALL-6, Испания (пед.)	1996–2005	35	15–18	98	63 (6 лет)	77	Нет различий между подростками и молодыми взрослыми при лечении по педиатрическим протоколам	[36]
	1996–2005	46	19–30	98	60 (6 лет)	63		

Примечание: *ПР — полная ремиссия, БСВ — бессобытийная выживаемость, ОВ — общая выживаемость.*

ентов. 6-летняя БСВ составила 64 % (медиана наблюдения 5,7 года), общая выживаемость (ОВ) — 73 %. В нашем исследовании не было выявлено каких-либо различий в результатах лечения подростков (15–19 лет) и молодых взрослых (20–37 лет): 6-летняя БСВ составила 67 и 54 % соответственно ($p > 0,05$).

Наши данные по лечению ОЛЛ в целом согласуются с международными. В частности, в 1988 г. американские исследователи из Children's Cancer Group (CCG) предложили для лечения подростков в возрасте от 16 до 21 года протокол CCG 1800, являвшийся модифицированной версией одного из первых «детских» протоколов ALL-BFM-76/79 [28]. Протокол назвали «усиленным BFM», поскольку его отличие заключалось в повышении суммарных доз винкристина, L-аспарагиназы и кортикостероидов, а также отказе от системного высокодозного метотрексата. Сравнительный анализ эффективности данного протокола и одновременно проведенного в США и Канаде взрослого исследования Cancer and Leukemia Group B (CALGB) серии 8811-9511 показал преимущество педиатрического режима: 6-летняя БСВ составила 64 против 38% ($p < 0,05$) [33]. Позднее аналогичные сообщения поступили из Европы [34–37]. Во Франции было продемонстрировано преимущество педиатрического протокола French Acute Lymphoblastic Leukemia (FRALLE) 93 над взрослым режимом Leucémies Aiguës Lymphoblastiques de l'Adulte (LALA) 94 (5-летняя БСВ 67 % против 41 %; $p < 0,05$) [34], а в Дании — педиатрического Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) против протокола для взрослых Dutch Foundation for Adult Haemato-Oncology (NOVON): 5-летняя БСВ — 69 % против 34 % ($p < 0,05$) [35]. Испанские исследователи, также как и мы, показали отсутствие различий в результатах лечения подростков (15–18 лет) и молодых взрослых (19–30 лет) при лечении по педиатрическому протоколу: 6-летняя БСВ — 63 % против 60 % ($p > 0,05$) [36].

В целом, основные различия педиатрических и взрослых протоколов лечения ОЛЛ заключаются в следующем:

1. Используются более высокие кумулятивные дозы критичных для лечения ОЛЛ, но в то же время немиелосупрессивных препаратов (винкаалкалоидов — доза в 3 раза выше в педиатрических протоколах, кортикостероидов — в 5 раз и L-аспарагиназы — в 20 раз).

2. Ограниченно используются или исключаются миелотоксичные цитостатики (антрациклины, циклофосфамид и цитарабин).

3. Меньше показаний для проведения трансплантации стволовых гемопоэтических клеток, как правило, в первой ремиссии ОЛЛ — это лишь пациенты высокого риска: плохой ответ на терапию, неблагоприятные транслокации t(4;11) и t(9;22). В ряде взрослых исследований, в частности в недавно завершенном UK Acute Lymphoblastic Leukaemia (UKALL) XII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 02993, само по себе наличие HLA-совместимого сиблинга рассматривается как показание к трансплантации в первой ремиссии [38].

4. Более строгое соблюдение временных интервалов между терапевтическими элементами и меньшая частота перерывов в их проведении, что по существу связано с более адекватной, но и затратной системой сопроводительной терапии.

К сожалению, все процитированные выше сравнительные исследования носят ретроспективный характер, в силу чего их доказательная ценность ограничена. На сегодняшний день не существует ни одного рандомизированного исследования, сравнивающего педиатрические и взрослые режимы лечения ОЛЛ.

Мета-анализ результатов мультицентровых исследований, выполненных в Великобритании, показал, что наиболее значимыми факторами прогноза ОЛЛ являются возраст и Ph-статус пациента [39]. В этой связи интересно недавно опубликованное исследование частоты выявления отдельных кариологических поломок при ОЛЛ у пациентов разного возраста [40]. Максимальное количество хорошо изученных цитогенетических аномалий было выявлено у детей и взрослых. Приблизительно у 2/3 больных в возрасте от 10 до 35 лет был обнаружен либо «нормальный», либо непонятный кариотип, т. е. отсутствовали какие-либо «неслучайные» аномалии, характерные для ОЛЛ. Во всех других возрастных группах пропорция таких больных была ниже — 20–45 %. Полученные данные демонстрируют корреляцию между возрастом и кариотипом, что подтверждает, что ОЛЛ у подростков и молодых взрослых следует рассматривать отдельно от детского и взрослого ОЛЛ, возможно, с другими неизвестными патогенетическими механизмами лейкемогенеза. Если это так, то самой лучшей терапией мог бы стать ни «педиатрический», ни «взрослый» подход, а уникальное лечение, основанное на знаниях молекулярных механизмов патогенеза ОЛЛ и развития молекулярно-направленной таргетной терапии.

Диффузная В-крупноклеточная лимфома

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) — наиболее часто встречающийся вариант (30–40 % случаев) агрессивных неходжкинских лимфом (НХЛ) у взрослых [41]. В детском и подростковом возрасте ДВККЛ диагностируется реже — 8–10 и 25 % случаев соответственно [42]. В педиатрической гематологии для лечения ДВККЛ используют интенсивные протоколы, аналогичные применяемым для лечения лимфомы Беркитта. При этом даже до появления в практике терапевтических моноклональных антител только на химиотерапии 5-летняя БСВ детей с ДВККЛ составляла почти 95 % [43, 44]. Результаты лечения взрослых с ДВККЛ CHOP-

подобными режимами исторически всегда уступали таковым у детей: 5-летняя ОВ больных ДВККЛ в распространенных стадиях не превышала 30–40 % [41].

ДВККЛ — гетерогенное в клиническом и биологическом отношении заболевание. Генетические изменения при ДВККЛ включают хромосомные перестройки с вовлечением генов *BCL6* (30–40 %), *BCL2* (20–30 %), *c-myc* (10 %) и инактивацию опухолевого гена супрессора *p53* (20 %), однако ни один из обсуждаемых признаков не является строго специфичным для этого злокачественного заболевания [45]. В зависимости от молекулярно-генетических событий ДВККЛ можно разделить, по крайней мере, на 2 варианта, различающиеся в отношении прогноза и ответа на терапию. Один — из В-клеток, подобных клеткам герминального центра (ГЦ), основным событием которого является активация c-myc протоонкогена; данный вариант чаще встречается у детей. Другой — из подобных активированным В-клеткам (АВК) или постгерминальный, чаще возникающий у взрослых, ключевым нарушением при котором является конститутивная активация гена ядерного фактора κB (NF-kappaB). Эффективность стандартной химиотерапии хуже при постгерминальной ДВККЛ, чем при герминальной [46]. Для разделения случаев ДВККЛ на молекулярные варианты (ГЦ или АВК) в 2004 г. C.P. Hans et al. была предложена методика косвенной диагностики, основанная на общедоступной иммуногистохимической технике определения экспрессии 3 ключевых маркеров — CD10, BCL6 и MUM1 в биоптатах опухоли (рис. 3).

Большинство случаев ДВККЛ у детей в основном представлены герминальным вариантом, чем частично объясняются хорошие результаты лечения с помощью интенсивных химиотерапевтических режимов. Наши предварительные данные позволяют предполагать, что результаты лечения, по крайней мере молодых пациентов с герминальной ДВККЛ, возможно улучшить за счет ее интенсификации с помощью режимов, применяемых в педиатрической практике [47]. В период с 06.2006 г. по 04.2009 г. 28 (мужчины — 14, женщины — 14) молодым пациентам с ДВККЛ была проведена интенсивная терапия по протоколам BFM-B-NHL-90m и B-НХЛ-2004М по поводу первичной ДВККЛ. Медиана возраста на момент начала терапии составила 21,0 год (15–38 лет). Молекулярный вариант ДВКЛЛ удалось определить в 15 (54 %) случаях: 6 (40 %) — герминальный и 9 (60 %) — постгерминальный. Полной ремиссии достигли все пациенты с герминальной и 8 (89 %) — с постгерминальной ДВККЛ. Среди пациентов с герминальным вариантом не было случаев первичной рефрактерности или рецидивов заболевания, все пациенты пребывают в полной продолжительной ремиссии (медиана наблюдения — 5,2 года). Пятилетняя БСВ и ОВ составили 1,0 ± 0,0. В группе постгерминальной ДВККЛ зарегистрирован 1 (11 %) случай рефрактерности к терапии и 3 (33 %) рецидива ($p < 0,05$). Один (11 %) пациент умер от осложнений терапии. В полной продолжительной ремиссии находятся лишь 4 (44 %) пациента при медиане наблюдения 1,5 года; 5-летняя БСВ составила 0,44 ± 0,17 ($p < 0,05$); ОВ — 0,58 ± 0,20 [48]. Выполнимость интенсивных педиатрических протоколов лимитируется возрастной переносимостью и может быть рекомендована лишь для лечения подростков и молодых пациентов [47].

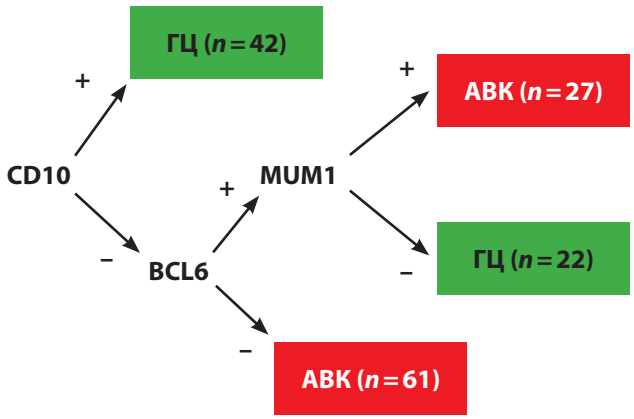


Рис. 3. *Иммуногистохимический алгоритм (цитируется по C.P. Hans et al., 2004, [46]).*
Примечание: *ГЦ – герминальный вариант ДВККЛ; АВК – постгерминальный (из активированных В-клеток).*

Саркомы мягких тканей и костей

Отдельные варианты сарком мягких тканей встречаются преимущественно у подростков и молодых взрослых. Особым феноменом этой возрастной группы является наличие специфических цитогенетических нарушений, обнаруживаемых при синовиальной саркоме — t(X;18)(p11.2;q11.2), альвеолярной мягкотканой саркоме — der(17)t(X;17)(p11.2;q25) и десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли — t(11;22)(p13;q12) [49]. Две из трех наиболее часто встречающихся сарком костей — остеосаркома и саркома Юинга — являются преимущественно опухолями подростков и молодых взрослых. При саркоме Юинга почти всегда имеет место транслокация t(11;22)(q24;q12). Удлинение 1q или потеря 16q при саркоме Юинга ассоциируются с крайне неблагоприятным прогнозом и встречаются в 2–2,5 раза чаще у пациентов ≥ 15 лет по сравнению с детьми: 5-летняя БСВ 39 % против 56% ($p = 0,018$) и 38 % против 74 % ($p = 0,092$) соответственно. Утрата 16q коррелирует с инициальной диссеминированностью опухолевого процесса, а удлинение 1q ухудшает прогноз независимо от клинической стадии. Биологическое значение изменений 1q и 16q до конца не ясно, но предполагается, что они могут быть ответственными за резистентность опухолевых клеток к ифосфамиду и этопозиду, которая часто наблюдается у подростков и молодых взрослых с саркомой Юинга, в отличие от детей с данной патологией [50].

Фертильность

Достигнутые успехи в лечении детей при использовании дозоинтенсивных протоколов практически сразу породили вопросы долговременной токсичности подобного «сильного» лечения. Гормональное здоровье, репродуктивное здоровье, риск развития вторичных опухолей. Особенно актуальны данные проблемы в группе излеченных пациентов, которым предстоит прожить еще много 10-летий. Это инициировало вторую волну исследований, направленных на снижение токсичности лечения при сохранении его эффективности. Во многом эти вопросы решены в «детской» практике, но сохраняют актуальность во «взрослой», особенно в группе молодых взрослых.

Психологические особенности

Обобщенное рассмотрение подростков и молодых взрослых целесообразно в силу целого ряда причин. Возраст от 15 до 29 лет является переходным между детством и взрослой жизнью, характеризуется завершением физиологического и психологического формирования личности, получением профессионального образования и финансовой самостоятельности. Работа медицинского персонала с пациентами-подростками во многом сложнее, чем с детьми или взрослыми. Ощущается их эмоциональная незрелость, определенная мятежность и нежелание соответствовать «привычным» для врачей стандартам поведения больных. Молодые люди с онкологическими заболеваниями сталкиваются не только с проблемами, свойственными подростковому возрасту, — физическое, познавательное, психосоциальное становление, но и с проблемами, которые ставят перед ними само заболевание и последствия, возникающие после лечения. Частые и продолжительные периоды госпитализации могут прервать посещение школы и нарушить общение со сверстниками. Воздействие болезни и лечение способны изменить внешность (облысение, калечащие операции, рубцы, плохая кожа), что является особенно тяжелым психотравмирующим фактором в этой возрастной группе. Как следствие, нередко формируется анозогнозический тип поведения — это активное отбрасывание мысли об опасном заболевании и возможных последствиях, объяснение симптомов случайными обстоятельствами с отказом от обследования и лечения. Подобная внутренняя картина заболевания связана с формированием у больных сильных механизмов психологической защиты, и требуются время и усилия специалистов для подведения больного к объективному осознанию реальности [51, 52].

Приведем клинический случай. *Пациент М., 19 лет, из социально адаптированной семьи, поступил в гематологическое отделение ГКБ им. С.П. Боткина 5 августа 2009 г. На момент поступления предъявлял жалобы на боли в горле, высокую лихорадку, быструю утомляемость. Поставлен диагноз ОЛЛ на основании стандартных исследований костного мозга, начата терапия по протоколу ALL-MB-2008. На 15-й день индукционной терапии при контрольном исследовании костного мозга бластных клеток обнаружено не было. Пациент чувствовал себя удовлетворительно и решил самостоятельно прекратить лечение, в чем получил поддержку со стороны своих родственников. Продолжительные беседы врачей с пациентом и его мамой о необходимости продолжения лечения результатов не дали. Спустя 2 месяца бригадой скорой медицинской помощи молодой человек был вновь доставлен в гематологическое отделение в тяжелом состоянии за счет фебрильной лихорадки до 39 °С, нарастающей слабости. Результаты проведенного обследования выявили прогрессирование заболевания с субтотальной инфильтрацией костного мозга бластными клетками. На настоящий момент пациент получает высокодозную противорецидивную химиотерапию, состояние его стабилизировано. Признание больного: «Я принял свою болезнь, но не сразу, мне потребовалось время. Изменилось восприятие мира, а также я сам. Я сожалею о своем поступке. Я очень хочу вылечиться»*. Подобные случаи отказов от лечения подростков, которые попали во взрослый стационар, к сожалению, не редкость.

Молодые взрослые пациенты также весьма требовательны в отношении искренности, тактичности и уважительности к неприкосновенности частной жизни. Помимо физиологических и психологических проблем, вообще присущих данному возрасту, еще существует тяжелая реальность онкологического заболевания, необходимость длительного лечения и болезненных диагностических процедур, возникновение неблагоприятных последствий терапии, изоляция от сверстников, часто невозможность реализации образовательных и финансовых устремлений. Таким образом, психологическая и социальная поддержка является очень важным аспектом лечения молодых онкологических пациентов, определяющим уникальность этой возрастной категории [53, 54].

Выводы

Опухоли — основная причина смерти в возрастной группе подростков и молодых взрослых.

За последние 20 лет в мире не было достигнуто прогресса при лечении опухолевых заболеваний у больных в возрасте от 15 до 29 лет. В то же время у детей и в старшей возрастной группе прогресс очевиден.

В качестве объяснения этого факта ведущими экспертами предлагаются следующие варианты:

— ограниченное включение данных больных в контролируемые исследования;

— отсутствие «биологического» понимания того, какую стратегию — «детскую» (более интенсивную) или «взрослую» (менее токсичную) — сле-

дует взять за основу при лечении подростков и молодых взрослых;

— недостаток знаний о фармакокинетике и фармакогеномике противоопухолевых препаратов в пограничной (да и в детской) возрастной группе;

— недостаток внимания к психологическим особенностям переходного возраста, приводящим к резкому падению дисциплины лечения этих пациентов.

Основными направлениями достижения прогресса можно считать:

1. Создание контролируемых протоколов лечения, ориентированных на данную возрастную группу и ставящих целью сравнение «взрослых» и «детских» подходов в проспективных исследованиях.

2. Создание банков биологических образцов основных неоплазий в данной возрастной группе для детального анализа результатов контролируемых исследований.

3. Проведение исследований по фармакокинетике противоопухолевых препаратов в группе пациентов 15–29 лет.

4. Внедрение программ психологической помощи в данной возрастной группе.

5. Внедрение программ предохранения фертильной функции.

6. Создание эффективных протоколов, исходя из опыта и результатов, показанных различными исследовательскими группами.

Литература

1. Bleyer A., O'Leary M., Barr R., Ries L.A.G. Cancer Epidemiology in older adolescents and young adults 15 to 29 years of age, including SEER incidence & survival 1975–2000. Pub. NCI 2006.
2. Семочкин С.В. Оптимизация технологий лечения лимфопролиферативных заболеваний у подростков и лиц молодого возраста. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2007.
3. Thomas D.M., Seymour J.F., O'Brien T. et al. Adolescent and young adult cancer: a revolution in evolution? Intern Med J 2006;36(5):302–7.
4. Демографический ежегодник России. 2009: Стат. сб. / Росстат. М., 2009. 557 с.
5. Bleyer A. The adolescent and young adult gap in cancer care and outcome. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2005;35(5):182–217.
6. Downs-Canner S., Shaw P.H. A comparison of clinical trial enrollment between adolescent and young adult (AYA) oncology patients treated at affiliated adult and pediatric oncology centers. J Pediatr Hematol Oncol 2009;31(12):927–9.
7. Relling M.V., Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. Nat Rev Cancer 2001;1:99–108.
8. Pieters R., den Boer M.L., Durian M. et al. Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia-implications for treatment of infants. Leukemia. 1998;12:1344–6.
9. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2009;20(3): прил. 1.
10. Agaram N.P., Laquaglia M.P., Ustun B. et al. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2008;14(10):3204–15.
11. Platell C., Zeps N., Joseph D. et al. Tumour banking as part of routine clinical practice. ANZ J Surg. 2010;80(4):203–4.
12. Физиология роста и развития детей и подростков (теоретические и практические вопросы). Под ред. А.А. Баранова, Л.А. Щеплягиной. М.: Гэотар-Медиа, 2006, том 1. 416 с.
13. Pacifici G.M. Clinical pharmacokinetics of aminoglycosides in the neonate: a review. Eur J Clin Pharmacol 2009;65(4):419–27.
14. Ginsberg G., Hattis D., Sonawane B. Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. Toxicol Appl Pharmacol 2004;198(2):164–83.
15. McLeod H.L., Relling M.V., Crom W.R. et al. Disposition of antineoplastic agents in the very young child. Br J Cancer Suppl 1992;18:23–9.
16. Groninger E., Proost J.H., de Graaf S.S. Pharmacokinetic studies in children with cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2004;52(3):173–97.
17. Румянцев А.Г., Варфоломеева С.Р., Осипов С.Г. и др. Основные инструменты доказательной медицины в детской гематологии/онкологии. Вопр гематол онкол и иммунопатол педиатр 2009;8(1):5–17.
18. Sala A., Mattano L.A. Jr., Barr R.D. Osteonecrosis in children and adolescents with cancer — an adverse effect of systemic therapy. Eur J Cancer 2007;43(4):683–9.
19. McCarville M.B., Adelman C.S., Li C. et al. Typhlitis in childhood cancer. Cancer 2005;104:380–7.
20. Prucker C., Attarbaschi A., Peters C. et al. Induction death and treatment-related mortality in first remission of children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based analysis of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster study group. Leukemia 2009;23(7):1264–9.
21. Balducci L. Management of chemotherapy-induced neutropenia in the older cancer patient. Oncology (Williston Park) 2006;20(14, Suppl 9):26–31.
22. Huguet F., Leguay T., Raffoux E. et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. J Clin Oncol 2009;27(6):911–8.
23. Pui C.H. Toward a total cure for acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2009;27(31):5121–3.
24. Möricke A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. Leukemia 2010;24(2):265–84.
25. Thomas X., Boiron J.M., Huguet F. et al. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. J Clin Oncol 2004;22:4075–86.
26. Göekbuget N., Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol 2009;46(1):64–75.
27. Gaynon P.S., Angiolillo A.L., Carroll W.L. et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. Leukemia 2010;24(2):285–97.
28. Nachman J., Sather H.N., Buckley J.D. et al. Young adults 16-21 years of age at diagnosis entered on Childrens Cancer Group acute lymphoblastic leukemia and acute myeloblastic leukemia protocols. Results of treatment. Cancer 1993;71:3377–85.
29. Vilmer E., Suciu S., Ferster A. et al. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. Leukemia 2000;14:2257–66.
30. Gleissner B., Gukbuget N., Bartram C.R. et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. Blood 2002;99:1536–43.
31. Mancini M., Scappaticci D., Cimino G. et al. A comprehensive genetic classification

of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. Blood 2005;105:3434–41.
32. Семочкин С.В., Лория С.С., Куликова С.С. и др. Современные подходы к терапии острого лимфобластного лейкоза у подростков и лиц молодого возраста. Вопр гематол онкол и иммунопатол педиатр 2009;8(1):26–32.
33. Stock W., La M., Sanford B. et al. What determines the outcomes for adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia treated on cooperative group protocols? A comparison of Children's Cancer Group and Cancer and Leukemia Group B studies. Blood 2008;112(5):1646–54.
34. Boissel N., Auclerc M.F., Lheritier V. et al. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. J Clin Oncol 2003;21:774–80.
35. De Bont J.M., Holt B., Dekker A.W. et al. Significant difference in outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on pediatric vs adult protocols in the Netherlands. Leukemia 2004;18:2032–5.
36. Ribera J.M., Oriol A., Sanz M.A. et al. Comparison of the results of the treatment of adolescents and young adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia with the Programa Español de Tratamiento en Hematología pediatric-based protocol ALL-96. J Clin Oncol 2008;26(11):1843–9.
37. Usvasalo A., Räty R., Knuutila S. et al. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults in Finland. Haematologica 2008;93(8):1161–8.
38. Goldstone A.H., Richards S.M., Lazarus H.M. et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). Blood 2008;111:1827–33.
39. Ramanujachar R., Richards S., Hann I., Webb D. Adolescents with acute lymphoblastic leukaemia: emerging from the shadow of paediatric and adult treatment protocols. Pediatr Blood Cancer 2006;47(6):748–56.
40. Harrison C.J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2009;144(2):147–56.
41. Shipp M.A., Harrington D.P., Anderson J.R. et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. N Engl J Med 1993;329(14):987–94.
42. Самочатова Е.В. Неходжкинские лимфомы у детей: от патогенетической классификации к успешной терапии. Вопр гематол онкол и иммунопатол педиатр 2007;6(4):5–12.
43. Reiter A., Schrappe M., Parwaresch R. et al. NHL of childhood and adolescence: Results of a Treatment stratified for biologic subtypes and stage. A report of the BFM Group. J Clin Oncol 1995;13(2):359–72.
44. Klapper W., Szczepanowski M., Burkhardt B. et al. Molecular profiling of pediatric mature B-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials. Blood 2008;112(4):1374–81.
45. Lenz G., Wright G.W., Emre N.C. et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105(36):13520–5.
46. Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C. et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Blood 2004;103(1):275–82.
47. Семочкин С.В., Бобкова М.М., Лория С.С. и др. Опыт терапии подростков и взрослых больных с неходжкинскими лимфомами по педиатрическому протоколу NHL-BFM-90m. Вопр гематол онкол и иммунопатол педиатр 2007;6(1):18–25.
48. Бобкова М.М., Семочкин С.В., Иванова В.Л. и др. Эффективность применения интенсивной полихимиотерапии в лечении молодых больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой из клеток герминального центра. Онкогематология 2009;4:4–11.
49. Jain S., Xu R., Prieto V.G., Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. Int J Clin Exp Pathol 2010 Apr 23;3(4):416–28.
50. Hattinger C.M., Pötschger U., Tarkkanen M. et al. Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. Br J Cancer 2002 Jun 5;86(11):1763–9.
51. Evan E.E., Zeltzer L.K. Psychosocial dimensions of cancer in adolescents and young adults. Cancer 2006;107:1663–71.
52. Clinton-McHarg T., Carey M., Sanson-Fisher R. et al. Measuring the psychosocial health of adolescent and young adult (AYA) cancer survivors: a critical review. Health Qual Life Outcomes 2010;8:25.
53. Freyer D.R., Brugieres L. Adolescent and young adult oncology: transition of care. Pediatr Blood Cancer 2008;50 (5 Suppl):1116–9.
54. Subbiah V. Adolescent oncology: who cares?-the new KID on the block. Support Care Cancer 2010;18(6):771–3.

Лечение неходжкинских лимфом и острого лейкоза из зрелых В-клеток у детей и подростков по данным региональных российских клиник

Е.В. Самочатова[1], Л.Н. Шелихова[2]
[1]ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва;
[2]Российская детская клиническая больница, Москва

Контакты: *Елена Владимировна Самочатова samochatova@niidg.ru*

В статье представлены результаты лечения 233 больных (дети и подростки до 19 лет, медиана — 8,76 года) неходжкинскими лимфомами и острым лейкозом из зрелых CD20-позитивных В-клеток (В-НХЛ/-ОЛ) с использованием только химиотерапии (протоколы BFM B-NHL 90–95) или комбинированной химиоиммунотерапии с включением ритуксимаба (протокол B-NHL-2004маб). Комбинированная химиоиммунотерапия использовалась для больных лимфомой Беркитта, диффузными В-крупноклеточными лимфомами III–IV стадий и В-ОЛ и включала циторедуктивную фазу, 6 курсов полихимиотерапии (ПХТ) и ритуксимаб. Курсы ПХТ аналогичны по составу и дозам химиопрепаратов из оригинального протокола BFM B-NHL90, за исключением 2 первых курсов, где доза метотрексата в суточной инфузии снижена с 5 до 1 г/м²/24 час; ритуксимаб в дозе 375 мг/м² в виде в/в инфузии вводится за 12 часов до начала первых 4 курсов ПХТ. Данные в анкетном варианте за последние 5 лет представили 28 педиатрических специализированных стационаров из 27 регионов России (2005–2009 гг.). Анализ показал более высокую эффективность терапии по протоколу с включением ритуксимаба. Авторы обсуждают возможность использования комбинированной химиоиммунотерапии для лечения зрелоклеточных В-НХЛ/-ОЛ в стационарах регионального уровня и перспективы дальнейшего улучшения результатов лечения этой группы опухолей.

Ключевые слова: *дети, В-клеточные неходжкинские лимфомы, таргетная терапия*

Treatment of non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute leukemia in children and adolescents: data of Russian regional hospitals

Ye.V. Samochatova[1], L.N. Shelikhova[2]
[1]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;
[2]Russian Children Clinical Hospital, Moscow

The article presents treatment results of 233 patients (children and adolescents under 19 years old; median — 8.76 years) with CD20-positive non-Hodgkin lymphomas and B-cell acute leukemia (B-NHL/B-AL) received chemotherapy (BFM B-NHL 90–95 protocols) or combined chemo-immunotherapy with rituximab (B-NHL-2004mab protocol). Combined chemo-immunotherapy was used for patients with Burkitt lymphoma, diffuse large cells lymphomas stage III–IV and B-AL, and included cytoreductive phase, 6 polychemotherapy (PCT) courses and rituximab. PCT courses are similar to those of original BFM B-NHL90 protocol, except for the first 2 courses, where daily methotrexate dose was reduced from 5 to 1 g/m²/24 h. Rituximab infused IV 12 hours before the start of first 4 chemotherapy courses at a dose of 375 mg/m². The data in the questionnaires form have been submitted from 28 pediatric specialized hospitals from 27 Russia regions over the past 5 years (2005–2009). Protocol with rituximab has proved to be more effective than chemotherapy alone.
The authors discuss the possibility of using combined chemo-immunotherapy for the treatment of B-NHL/B-AL at regional hospitals and the prospects for further treatment results improvement in this group of tumors.

Key words: *children, B-cell non-Hodgkin lymphoma, target therapy*

Введение

Самые частые в детском возрасте варианты неходжкинских лимфом из зрелых В-клеток (В-НХЛ) — лимфома/лейкоз Беркитта (ЛБ) и диффузные В-крупноклеточные лимфомы (ДВККЛ) — отличаются стремительным ростом и абсолютной злокачественностью [1]. При относительной редкости этих опухолей они вносят существенный вклад в структуру детской смертности, поскольку при поздней, тем более ошибочной диагностике и терапии очень быстро заканчиваются летально. Еще недавно прогноз при этих лимфоидных опухолях был

более чем плохим, выжить имели шанс единичные больные с 1-й, редко — 2-й стадиями заболевания [2]. К настоящему времени разработаны основные принципы терапии В-НХЛ, использование которых в современных протоколах позволяет повысить долгосрочную выживаемость больных до 80–90 % [3–5]. Краеугольным камнем этих протоколов является высокоинтенсивная по дозам и темпу выполнения курсовая ПХТ в составе стандартных препаратов с цитотоксической активностью против лимфоидных клеток различной степени дифференцировки. При удлинении интервалов между курсами опухоль вырастает вновь, возрождается подобно мифической гидре, опережая процесс гибели злокачественных клеток под действием цитостатиков, особенно если снизить их дозовую и временную интенсивность [6]. Неизбежно возникающие в ходе тотальной терапии осложнения часто носят жизнеугрожающий характер, становясь ведущей причиной непосредственных ее неудач и нежелательных отсроченных явлений.

В российских клиниках для лечения детей и подростков, больных НХЛ, до 90-х годов прошлого века использовали беспорядочно подбираемые независимо от варианта курсы ПХТ (в основном — CHOP-подобные) в произвольных режимах, нередко в сочетании с локальным облучением. Эффективность терапии была крайне низкой, с показателями выживаемости не выше 20 %. Когда в практике работы вновь организованных в крупных детских больницах онкогематологических отделений для лечения НХЛ и острых лейкозов с начала 90-х годов стали использовать протоколы германо-австрийской группы BFM, результаты резко улучшились [7]. Однако условия работы большинства стационаров не отвечают требованиям, необходимым для выполнения интенсивной цитостатической терапии. Ошибки и недоработки выполнения стандартов сопроводительной терапии, несоблюдение в полной мере тех принципов организации лечебного процесса от санитарно-гигиенического состояния помещений и качества расходных материалов до ограниченных возможностей диагностических служб и т. п., которые вначале кажутся незначительными, не позволяют достичь тех высоких результатов, которые получены ведущими западными клиниками. В отечественных клиниках они не превышали 40–60 % [8].

Особую проблему представляет тяжелая сочетанная гематологическая и органная токсичность инициального этапа лечения, включая обусловленный метаболическими нарушениями синдром лизиса опухоли (СОЛ) с развитием острой почечной недостаточности и тяжелые инфекционные осложнения. Замедленный клиренс высокодозового метотрексата (Mtx), который входит в состав первых курсов ПХТ, является причиной тяжелых мукозитов и последующих системных инфекций [8]. Попытки уменьшить токсичность ПХТ за счет снижения интенсивности ухудшают ее эффективность с развитием рефрактерности и/или рецидивов. Это заставляет искать возможности терапии с другими механизмами противоопухолевого действия и меньшей органной токсичностью.

Реальный выход видится в том, чтобы найти возможность эффективного лечения меньшей интенсивности и токсичности. Такая цель казалась недостижимой, пока развитие генно-инженерных технологий не сделало возможным получать противоопухолевые препараты соединения с избирательным действием на специфические молекулярные мишени в структуре опухолевых клеток. Тогда в арсенале противоопухолевой терапии появились препараты целенаправленного — таргетного (от английского «target» — цель), или точечного действия. В отличие от «тотальной» таргетная цитостатическая терапия оказывает действие на конкретную мишень, специфичную для данного вида опухолевых клеток, малозначимую для других тканей и клеток организма. Это могут быть антитела, вакцины, дифференцировочные и другие биологические агенты.

Одним из первых таргетных препаратов, нашедших свое место в клинической практике, является ритуксимаб (Rituximab) — моноклональное антитело (АТ) против белка CD20, который присутствует как рецептор на липидном слое мембраны В-клеток. Антиген CD20 служит идеальной мишенью для таргетной терапии В-НХЛ, поскольку экспрессируется только на клетках В-клеточной принадлежности определенного уровня дифференцировки, не интернализуется после связывания с АТ и не циркулирует в плазме в виде свободного белка [9]. Ритуксимаб — химерный иммуноглобулин G1, гуманизированное моноклональное антитело к антигену CD20 В-клеток, под действием которого происходит апоптоз (клеточная смерть) В-клеток. Механизм цитотоксического действия сложен, связан с количеством CD20 молекул в структуре клеток-мишеней, которое линейно возрастает по мере их дифференцировки, но отсутствует на плазматических клетках. В крупных проспективных многоцентровых исследованиях у взрослых больных было показано, что ритуксимаб обладает минимальной миело- и органной токсичностью [10, 11].

Материалы и методы

Сочетание высокого цитостатического эффекта и низкой системной токсичности явилось основанием включить ритуксимаб в 1-ю линию терапии детей, больных зрелоклеточными В-НХЛ, группы высокого риска в сочетании с цитостатической ПХТ в уменьшенных дозировках. Такая идея заложена в основе протокола В-НХЛ-2004маб, разработанного в НКЦ ДГОИ для лечения зрелоклеточных В-НХЛ III/IV стадий и ОЛ у детей и подростков. Целью протокола

служит уменьшение токсичности терапии и доступность оказания своевременной эффективной помощи детям и подросткам, больным В-НХЛ/В-ОЛ, в региональных отечественных клиниках. Основной задачей исследования было оценить эффективность сочетания иммунотерапии и ПХТ сниженной интенсивности притом, что проведение протокола не требует сложного технического оснащения и доступно для выполнения в полном объеме в специализированных подразделениях региональных детских больниц.

В проспективное многоцентровое исследование В-НХЛ-2004Маб (2004–2008 гг.) был включен 61 первичный больной с гистологически и иммуногистохимически верифицированным диагнозом ЛБ и ДВККЛ в возрасте младше 19 лет при экспрессии АГ CD20 ≥ чем на 50 % клеток опухоли. Протокол состоит из циторедуктивной фазы и 6 курсов ПХТ, аналогичных оригинальному протоколу B-NHL BFM-90 [5], за исключением 2 первых курсов, где доза метотрексата в суточной инфузии снижена с 5 до 1 г/м^2. Ритуксимаб в дозе 375 мг/м^2 в/в входит в состав первых 4 курсов ПХТ (день 0). Подробное описание протокола и результаты этого исследования представлены в предыдущих публикациях [12]. Набор пациентов закончен 01.01.2008, анализ результатов приведен на 01.01.2010, когда от завершения терапии последним включенным в исследование пациента прошло более 2 лет. Была показана высокая эффективность комбинированной иммунохимиотерапии при умеренной токсичности: бессобытийная (EFS) и общая выживаемость (OS) составили 89 ± 0,04 %, рефрактерность 3,3 %, рецидивы развились в 1,6 % случаев [13].

Включение ритуксимаба в состав комбинированного лечения В-НХЛ не сопровождалось добавочной острой токсичностью, побочные (купируемые) явления отмечались только при первой инфузии препарата. Все положенные по протоколу введения были выполнены полностью. Использование иммунотерапии не оказывало миело- и органотоксического действия, противоопухолевый эффект продолжался за счет его введений и в тех случаях, когда цитостатическая химиотерапия была невозможна из-за высокого риска осложнений — в состоянии аплазии кроветворения, при системных инфекциях, при почечной недостаточности, при развитии тяжелого геморрагического синдрома, постхирургических осложнений и даже комы.

Одной из серьезных проблем при использовании протокола была сложность достоверной оценки эффекта лечения, констатация состояния ремиссии, верификация рефрактерного течения и определение показаний для проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Почти в половине случаев после 3–4 курсов терапии на месте первичной опухоли по данным компьютерной томографии продолжало выявляться объемное образование. У 14 человек это образование оставалось после 5 и 6-го курсов лечения, при позитронно-эмиссионной томографии (ФДГ ПЭТ) метаболическая активность не определялась. Все пациенты с ПЭТ-негативными остаточными объемными образованиями после завершения лечения остаются в состоянии ремиссии с удовлетворительным качеством жизни уже более 3 лет (медиана наблюдения — 34,6 мес). Только у 2 больных инфильтраты были позитивны при исследовании методом ПЭТ; при повторной биопсии (second look operation) выявлены жизнеспособные опухолевые клетки и констатировано рефрактерное течение НХЛ. Этот опыт использован при разработке рекомендаций по тактике проведения терапии с использованием таргетных препаратов [13].

Целесообразность использования сочетанной иммунохимиотерапии как эффективного и умеренно токсичного метода лечения зрелоклеточных В-НХЛ/В-ОЛ у детей и подростков стала очевидной уже на первом году исследования не только для его участников, но и для врачей онкогематологических стационаров, не входящих в многоцентровую исследовательскую группу. Многие больные стали получать терапию, близкую к протоколу В-НХЛ-2004маб, в других клиниках продолжают использовать BFM-ориентированную терапию без ритуксимаба, как правило, на основе протоколов BFM НХЛ 90–95, модифицированную в соответствии с возможностями конкретных стационаров.

Нами были запрошены результаты терапии В-НХЛ в профильных стационарах различных российских педиатрических клиник*. Проведен анализ данных о больных ЛБ, ДВККЛ и В-ОЛ в возрасте до 19 лет, полученных за последние 5 лет из 28 педиатрических специализированных онкогематологических отделений. Всего представлена информация о 284 пациентах, исключены из исследования 35 случаев не-В-клеточных НХЛ, а также данные 16 больных с В-НХЛ/-ОЛ, 11 из которых получали непрограммное лечение, 3 больных умерли до начала лечения и 2 отказались от терапии. Из 233 пациентов в анализе 101 лечился согласно протоколу BFM B-NHL-90/95 и 132 — по протоколу В-НХЛ-2004маб. Возрастные и половые характеристики больных в группах не имели значимых различий; состав пациентов по вариантам заболевания представлен в табл. 1.

Результаты лечения детей и подростков по протоколам, используемым в большинстве педиатрических специализированных отечественных стационаров, представлены в табл. 2. Выживаемость и кумулятивная вероятность анализируемого события (метод Каплана–Майера) у больных В-НХЛ/-ОЛ при лече-

Исключения: Городская клиническая больница им. С.П. Боткина (Москва) и Онкологический диспансер Московской области (Балашиха).

Таблица 1. *Варианты В-НХЛ в группах согласно полученной терапии*

Вариант	BFM-90,95м	B-NHL-2004маб	Всего
ЛБ	66	69	135
В-ОЛ	8	28	36
ДВККЛ	27	35	62
Всего	101	132	233

Таблица 2. *Результаты терапии В-НХЛ/-ОЛ по протоколам BFM В-НХЛ 90/95 и В-НХЛ-2004маб*

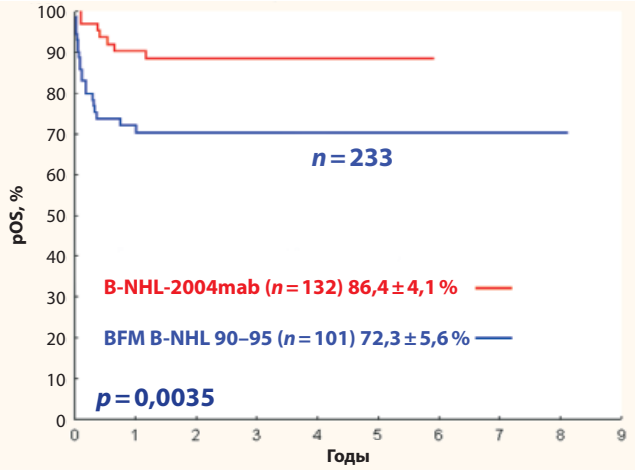
Результат	Всего, абс. (%)	BFMм, абс. (%)	B-NHL-2004маб, абс. (%)	*p*
Ремиссия	205	83 (82,2)	122 (92,2)	
Смерть в ремиссии	6 (2,9)	2 (2,4)	4 (3,2)	
Рецидив	10 (4,8)	7 (8,4)	3 (2,4)	
LFU	1 (0,4)	1 (1,2)	—	
2-я опухоль	1 (0,4)	—	1 (0,8)	
Продолжительная полная ремиссия	187 (80,25)	73 (72,3)	114 (86,4)	0,0035

Таблица 3. *Показатели общей выживаемости больных ЛБ, ДВККЛ и В-ОЛ при лечении по протоколам BFM 90/95м и В-НХЛ-2004маб*

		BFM (90/95)м		В-НХЛ-2004маб		*p*
		Выживаемость > 3 лет, %				
Всего больных	233	*n*	73,3 ± 5,7	*n*	86,4 ± 4,1	0,0037
ЛБ	135	66	74,2 ± 5,4	69	87,1 ± 4,1	0,028
В-ОЛ	36	8	75,0 ± 13,0	28	82,4 ± 6,8	0,05
ДВККЛ	62	27	71,9 ± 8,8	35	88,9 ± 5,4	0,027

нии по модифицированным протоколам BFM-90/95 и В-НХЛ-2004маб представлены на рисунке, показатели общей выживаемости больных ЛБ, ДВККЛ и В-ОЛ — в табл. 3.

Таким образом, согласно представленным ретроспективным данным показано значимое преимущество эффективности комбинированной иммунохимиотерапии с включением препарата анти-CD20 антител зрелоклеточных В-НХЛ/-ОЛ при высокой ее



Показатели общей выживаемости больных В-НХЛ/-ОЛ при лечении по протоколам BFM 90/95м (101 больной) и В-НХЛ-2004маб (132 больных)

выполняемости у детей и подростков. Учитывая это, а также умеренную токсичность, протокол В-НХЛ-2004маб может быть использован в лечении больных В-НХЛ высокой группы риска и особенно ОЛ из зрелых В-клеток.

Заключение

На основании полученных результатов можно заключить, что с целью оптимизации терапии группы опухолей из зрелых В-клеток в последующих клинических исследованиях усилия будут сконцентрированы на подтверждении возможности снизить цитотоксическую нагрузку при условии качественного локального и системного контроля (определение минимальной остаточной болезни) и своевременной коррекции терапии. Важной задачей остается достоверная верификация состояния ремиссии и решение проблем преодоления рефрактерности, предупреждения и адекватного лечения рецидивов. Можно определить составляющие этого комплекса: исследование характеристик опухолевых клеток с применением информативных современных методик; анализ лабораторно-клинических корреляций с использованием методов современной статистики, определение достоверных факторов риска неблагоприятного течения В-НХЛ/ОЛ и разработка целенаправленной эффект-адаптированной терапии.

Принципиальным является достижение максимальной доступности выполнения эффективного лечения в стандартно функционирующих профильных стационарах регионального уровня.

Благодарность

Авторы выражают признательность коллегам — онкогематологам клиник, предоставивших данные по результатам лечения зрелоклеточных В-НХЛ/В-ОЛ за период 2005—2009 гг.:

ОДКБ, Архангельск; ОДКБ, Астрахань; Онкодиспансер Московской области, Балашиха; РДКБ, Уфа, Республика Башкортостан; ОДКБ, Благовещенск; РДКБ, Улан-Удэ, Республика Бурятия; Онкодиспансер, Волгоград; ОДКБ № 1, Воронеж; РДКБ, Махачкала, Республика Дагестан; ОДКБ № 1, Екатеринбург; ОКБ, Иваново; ОДКБ, Иркутск; НИИ гематологии и переливания крови, Киров; КДКБ, Краснодар; РДКБ, Москва; ГКБ им. С.П. Боткина, Москва; ОДКБ, Нижний Новгород; ДГКБ № 4, Новокузнецк; ЦРБ, Новосибирск; ОКОД, Оренбург; Пермская КДКБ, Пермь; ОДКБ, Ростов-на-Дону; ОДКБ, Рязань; больница № 31, Санкт-Петербург; РДКБ, Казань, Республика Татарстан; РДКБ, Чебоксары, Республика Чувашия; ОДКБ, Челябинск; ОДКБ, Чита; ДГБ № 3, Ярославль.

Авторы выражают признательность К.И. Киргизову за помощь в подготовке публикации и статистическую обработку представленных региональными клиниками результатов.

Литература

1. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. Lyon, 2001; p.181
2. Magrath I. The non-Hodgkin's lymphomas in children. In Oxford Textbook of Oncology. Oxford Medical Publications, Oxford, 1995; p. 1809–51.
3. Patte C., Philip T., Rodary C. et al. High survival rate in advanced-stage B-cell lymphomas and leukemias without CNS involvement with a short intensive polychemotherapy: results from the French Pediatric Oncology Society of a randomized trial of 216 children. J Clin Oncol 1991;9: 123–32.
4. Goldman S., Gerard M., Sposto R. et al. Exellent results in children and adolescents with isolated mature B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) (Burkitt): Report from the FAB International LMB study FAB/LMB 96. Proc Am Hem 2005;106;Abstract 234:72a.
5. Reiter A., Schrappe M., Tiemann M. et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: a report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM-90. Blood 1999;94(10):3294–306.
6. Самочатова Е.В., Островская А.В., Карачунский А.И. и соавт. Значение верификации варианта неходжкинской лимфомы у детей для эффективности лечения по современным протоколам. Гематол и трансфузиол 2000;6:9–14.
7. Самочатова Е.В., Алейникова О.В., Беликова Л.Ю., Боридко А.Н. и соавт. Неходжкинские лимфомы у детей: клиническая характеристика, возможности диагностики и терапии (по данным клиник России и Беларуси). Гематол и трансфузиол 2001;1:1–10.
8. Островская А.В. Неходжкинские лимфомы у детей. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. М., 2004.
9. Minard-Colin V., Horikawa M., Xiu Y. Immune effector mechanisms of CD20 monoclonal antibodies. Hematology meeting reports 2009;3(5):19.
10. Pfreundshuh M.G.M. et al. Randomized intergroup trial of first-line treatment for patients < 60 years with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with a CHOP-like regimen with and without the anti-CD20 antibody rituximab — early stopping after first interim analysis. Blood 2002;11:A65.
11. Coiffer B., Lepage E., Brier J. et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002;346:235.
12. Samochatova E., Myakova N., Shelikhova L. et al. Preliminary results of treatment of pediatric advance-staged mature B-cell non-Hodgkin lymphomas/B-ALL with intensive chemotherapy + rituximab: effectiveness and toxicity. Pediatric Blood & Cancer 2006;46(issue7):854.
13. Самочатова Е.В., Шелихова Л.Н., Белогурова М.Б., Шамардина А.В. и соавт. Комбинированная химиоиммунотерапия больных неходжкинскими лимфомами из зрелых В-клеток возрастной группы до 18 лет: результаты многоцентрового исследования НХЛ 2004 М с применением ритуксимаба и модифицированного протокола В-НХЛ БФМ-90. Онкогематол 2009;3:4–14.

Функция щитовидной железы после комбинированной терапии болезни Ходжкина у детей и подростков

Р.И. Феоктистов[1,2], Ю.Г. Абугова[1], Ю.Ю. Дьяконова[1], О.В. Макарова[1,2], Н.В. Мякова[1,2]
[1]Российская детская клиническая больница, Москва;
[2]ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: *Роман Игоревич Феоктистов feoktistov-r@yandex.ru*

Заболевания щитовидной железы, особенно гипотиреоз, являются одними из наиболее часто встречающихся эндокринных осложнений у пациентов с лимфомой Ходжкина (ЛХ), получивших лучевую терапию на шейную область. В исследовании была проведена оценка функции щитовидной железы у 34 пациентов (11 мальчиков и 23 девочки) после комбинированной химиолучевой терапии ЛХ по модифицированному протоколу DAL-HD-90M и протоколу GPOH-HD-2002. Медиана возраста составила 15,9 (5–18 лет) лет, медиана времени от окончания терапии — 1,08 (1 мес–4,9 лет) лет. Лучевая терапия на шейную область проведена 33 пациентам: 12 детям — в дозе 20 Гр, 9 — в дозе 25 Гр, 10 — в дозе 30 Гр, 2 — в дозе 35 Гр. Обследование включало клинический осмотр, ультразвуковое исследование и оценку гормонального профиля щитовидной железы. Нарушения щитовидной железы обнаружены у 4 из 21 пациента, получивших лучевую терапию на шейную область в дозе 20–25 Гр (1 случай аутоиммунного тиреоидита и 3 случая субклинического гипотиреоза) и у 3 из 12 пациентов, получивших лучевую терапию в дозе 30–35 Гр (2 случая аутоиммунного тиреоидита и 1 случай субклинического гипотиреоза). Аутоиммунный тиреоидит развился также у пациента, которому проведено только облучение средостения в дозе 35 Гр. Возраст, пол, время от окончания лечения, доза лучевой терапии не были значимыми факторами риска развития дисфункции щитовидной железы. Оценка функции щитовидной железы обязательна при катамнестическом обследовании детей и подростков, получавших химиолучевое лечение ЛХ.

Ключевые слова: *дети, подростки, лимфома Ходжкина, щитовидная железа*

Thyroid function in children and adolescents after combined therapy of Hodgkin disease

R.I. Feoktistov[1,2], Y.G. Abugova[1], Y.Y. Dyakonova[1], O.V. Makarova[1,2], N.V. Myakova[1,2]
[1]Russian Children's Clinical Hospital, Moscow;
[2]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Thyroid diseases, especially hypothyroidism, are among the most frequent endocrine complications in patients with Hodgkin lymphoma who have received neck irradiation. Thyroid function was evaluated in 34 patients (11 males and 23 females) after combined chemo radiotherapy of Hodgkin lymphoma according to modified DAL-HD-90M and GPOH-HD-2002 protocols. The median age was 15.9 years (range 5–18 years), the median time from the end of therapy was 1.08 years (range 1 month–4.9 years). 33 patients received radiotherapy to the neck region: 12 children — 20 Gy, 9 — 25 Gy, 10 — 30 Gy, 2 — 35 Gy. These patients were investigated by clinical examination, thyroid ultrasound and thyroid function tests. Thyroid abnormalities were detected in 4 of 21 patients who received 20–25 Gy (1 case of autoimmune thyroiditis and 3 cases of subclinical hypothyroidism) and in 3 of 12 patients who received 30–35 Gy (2 cases of autoimmune thyroiditis and 1 case of subclinical hypothyroidism). Autoimmune thyroiditis also developed in patient who received only 35 Gy mediastinum irradiation. Age, sex, follow-up time, irradiation dose were not significant factors in the thyroid dysfunction development. Thyroid examination must be obligatory part of the follow-up examination of patients with Hodgkin lymphoma.

Key words: *children, adolescents, Hodgkin lymphoma, thyroid gland*

У пациентов с лимфомой Ходжкина (ЛХ) нарушение функции щитовидной железы при проведении лучевой терапии (ЛТ) на область шеи и верхнего средостения является следствием лучевого повреждения эндотелия сосудов, паренхимы щитовидной железы и последующего развития аутоиммунных реакций. Возможно развитие первичного гипотиреоза, болезни Грейвса, тиреоидитов, узлового увеличения щитовидной железы, аденомы и карциномы щитовидной железы [1–3]. Риск поражения органа связан с дозой ЛТ: при проведении ЛТ на область шеи в дозе < 26 Гр нарушение функции щитовидной железы возникает в 17 % случаев, при дозе ЛТ > 26 Гр — в 78 % случаев [4]. По данным некоторых авторов,

кроме дозы ЛТ, факторами риска развития гипотиреоза служат женский пол и возраст старше 15 лет [5].

Наиболее часто, в 20–30 % случаев, описано развитие первичного гипотиреоза, при этом у половины пациентов симптомы заболевания проявляются в течение первых 5 лет от окончания терапии [2]. К основным методам диагностики дисфункции щитовидной железы, помимо клинического осмотра и ультразвукового исследования щитовидной железы, относится определение базального уровня тиреотропного гормона (ТТГ) и свободного тироксина (Т4). По показаниям определяют также уровень антител к ткани щитовидной железы, проводят изотопную сцинтиграфию и пункционную биопсию [6, 7]. При первичном гипотиреозе лабораторно отмечается повышение уровня ТТГ, снижение содержания Т4, уровень трийодтиронина (Т3) — нормальный или ниже нормы. Отдельно выделяют субклинический (биохимический) гипотиреоз, который не имеет четких клинических проявлений и характеризуется повышением уровня ТТГ, при нормальных значениях Т3 и Т4 [6, 8]. Существуют различные варианты течения субклинического гипотиреоза: изменения могут самостоятельно разрешиться, оставаться стабильными в течение многих лет или прогрессировать с развитием клинических проявлений гипотиреоза [8]. У 36 % детей с субклиническим гипотиреозом отмечено спонтанное восстановление нормальной гормонопродуцирующей функции щитовидной железы [4]. Пациентам с субклиническим гипотиреозом может быть рекомендована терапия препаратами тироксина для профилактики развития аденомы щитовидной железы [7].

Целью нашего исследования была оценка функции щитовидной железы у детей и подростков, получивших химиолучевую терапию по поводу ЛХ и находящихся в ремиссии по основному заболеванию, с помощью неинвазивных методик.

Задачи исследования: оценка частоты и времени возникновения нарушений функции щитовидной железы, оценка влияния различных факторов (пол, возраст, доза ЛТ) на риск развития дисфункции щитовидной железы.

Исследование проводилось на базе Федерального государственного учреждения «Российская детская клиническая больница Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации» (главный врач — профессор Н.Н. Ваганов).

Пациенты и методы исследования

Оценка функции щитовидной железы была проведена после окончания терапии ЛХ у 34 пациентов, среди которых было 11 мальчиков и 23 девочки в возрасте от 5 до 18 лет (медиана 15,9 лет), медиана наблюдения 1,08 (1 мес — 4,9 года) года.

Гистологические варианты ЛХ распределялись следующим образом: смешанно-клеточный вариант — 15 (44,1 %), нодулярный склероз — 13 (38,2 %), лимфоидное истощение — 2 (5,9 %), лимфоидное преобладание — 1 (2,9 %), неустановленный гистологический вариант — 3 (8,8 %) случая. В соответствии с системой стадирования по Ann-Arbor [9] пациентов разделили следующим образом: I ст. — 1 (2,9 %), II ст. — 6 (17,6 %), III ст. — 15 (44,1 %), IV ст. — 12 (35,3 %). В-симптомы встречались у 27 (79,4 %) больных.

Терапия по модифицированному протоколу DAL-HD-90M проведена 21 пациенту, по протоколу GPOH-HD-2002 — 13 пациентам. ЛТ на область шейно-ключичных лимфатических узлов с обеих сторон проведена 33 пациентам: в суммарной очаговой дозе 20 Гр — 12, 25 Гр — 9, 30 Гр — 10, 35 Гр — 2 больным.

При контрольном обследовании после окончания терапии оценивался статус ремиссии по основному заболеванию, а также состояние и функция дыхательной, сердечно-сосудистой, эндокринной систем. Эндокринологическое обследование включало: клинический осмотр, ультразвуковое исследование щитовидной железы, определение уровня ТТГ, свободного Т4 и антител к тиреопероксидазе. При необходимости дополнительно исследовался уровень Т3. Гормональный профиль определялся методом иммуноферментного анализа на иммунохемилюминесцентном анализаторе Access 2 (Beckman Coulter Inc., США). Референсные значения: ТТГ 0,2–4,5 мМЕ/л, Т3 общий 1,0–3,2 нмоль/л, Т3 свободный 5,1–10 пмоль/л, Т4 общий 75–150 нмоль/л, Т4 свободный 10–27 пмоль/л, уровень антител к тиреопероксидазе < 50 МЕ/мл. В случае выявления изменений проводилась обязательная консультация эндокринолога.

Достоверность различия сравниваемых показателей определяли методами непараметрической статистики (χ^2). Достоверными полученные результаты считали в случае $p < 0,05$.

Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statistica for Windows V.6.

Результаты исследования

Клинических признаков нарушения функции щитовидной железы у всех 34 пациентов выявлено не было.

По данным ультразвукового исследования у 4 (11,8 %) пациентов отмечено снижение эхогенности паренхимы щитовидной железы. Изменение размеров щитовидной железы и узловые образования в структуре паренхимы ни у кого из пациентов не определялись.

Лабораторные изменения двух видов: повышенное содержание аутоантител к тиреопероксидазе (с и без нарушения гормонопродуцирующей функции щитовидной железы) и субклинический гипотиреоз (повышенное содержание ТТГ, нормальное содер-

жание свободного Т4) выявлены у 8 (23,5%) пациентов (табл. 1).

Аутоиммунные нарушения определялись у 4 человек, у которых содержание антител к тиреопероксидазе составило от 104 до 652 МЕ/мл (среднее значение 303 МЕ/мл). Субклинический гипотиреоз обнаружен у 4 пациентов, содержание ТТГ составило 4,6–7,05 мМЕ/л (среднее значение 5,6 мМЕ/л).

С учетом клинической картины, данных ультразвукового исследования и лабораторных методов 4 пациентам врач-эндокринолог установил диагноз субклинический гипотиреоз, 4 пациентам с наличием высокого титра антител к тиреопероксидазе и гипоэхогенными изменениями ткани щитовидной железы — аутоиммунный тиреоидит (эутиреоз — у 2, субклинический гипотиреоз — у 1, гипотиреоз — у 1 больного). Двум пациентам с аутоиммунным тиреоидитом с гипотиреозом и субклиническим гипотиреозом была назначена заместительная терапия L-тироксином.

У 3 (37,5%) из 8 пациентов изменения щитовидной железы отмечались в течение первого года от окончания ЛТ (табл. 2).

Была проведена оценка связи развития нарушений функции щитовидной железы с полом, возрастом начала терапии, дозой ЛТ на шейно-ключичную область.

Влияния пола пациентов на риск возникновения заболеваний щитовидной железы выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 3).

Возраст начала ЛТ не влиял на риск развития нарушений функции щитовидной железы ($p > 0,05$) (табл. 4).

При анализе влияния дозы ЛТ на шейно-ключичные лимфоузлы на риск развития дисфункции щитовидной железы необходимо отметить, что 1 пациенту, которому облучение шейно-ключичной области не проводилось, а СОД на средостение составила 35 Гр, установлен диагноз аутоиммунного тиреоидита. Зависимости между дозой ЛТ на шейно-ключичную область и риском возникновения заболеваний щитовидной железы выявлено не было ($p > 0,05$), вместе с тем при проведении ЛТ в дозе 30 Гр и более аутоиммунный тиреоидит регистрировался чаще. Изменения отмечались и при проведении ЛТ в относительно небольшой дозе — 20–25 Гр (табл. 5).

Обсуждение результатов

По полученным данным, при медиане наблюдения 1,08 года, из 34 пациентов, завершивших химиолучевую терапию ЛХ, у 8 (23,5%) выявлены заболевания щитовидной железы. Диагноз субклинический гипотиреоз установлен 4 (11,8%) пациентам, аутоиммунный тиреоидит — 4 (11,8%) пациентам. Двум детям потребовалось назначение заместительной терапии L-тироксином. Всем пациентам ре-

Таблица 1. *Результаты лабораторного исследования*

Признак	Количество случаев	%
Субклинический гипотиреоз	4	11,8
Аутоиммунные нарушения (повышенное содержание антител к тиреопероксидазе):	4	11,8
– эутиреоз	2	5,9
– субклинический гипотиреоз	1	2,9
– гипотиреоз	1	2,9

Таблица 2. *Возникновение заболеваний щитовидной железы в зависимости от времени наблюдения от окончания терапии*

Период наблюдения/ Заболевание	< 0,5 года ($n = 10$)	0,5 года–1 год ($n = 5$)	1 год и более ($n = 19$)
Аутоиммунный тиреоидит	0	1	3
Субклинический гипотиреоз	1	1	2

Таблица 3. *Возникновение заболеваний щитовидной железы в зависимости от пола*

Пол/ Заболевание	мальчики ($n = 11$)	девочки ($n = 23$)	p
Аутоиммунный тиреоидит	1	3	0,737
Субклинический гипотиреоз	3	1	0,052

Таблица 4. *Возникновение заболеваний щитовидной железы в зависимости от возраста в момент начала ЛТ*

Возраст/ Заболевание	до 14 лет ($n = 13$)	14 лет и старше ($n = 21$)	p
Аутоиммунный тиреоидит	1	3	0,562
Субклинический гипотиреоз	2	2	0,606

Таблица 5. *Возникновение заболеваний щитовидной железы в зависимости от дозы ЛТ на шейно-ключичную область*

Возраст/ Заболевание	до 30 Гр ($n = 21$)	30 Гр и более ($n = 12$)	p
Аутоиммунный тиреоидит	1 (4,8%)	2 (16,7%)	0,252
Субклинический гипотиреоз	3 (14,3%)	1 (8,3%)	0,614

комендовано проведение контроля гормонального профиля щитовидной железы и наблюдение эндокринолога в динамике.

В исследовании не проводилась оценка гормонального профиля до начала химиолучевой терапии ЛХ. Однако, по данным ряда авторов, распространенность аутоиммунного тиреоидита среди детей очень низка и составляет до 0,5 % [8, 10], что указывает на влияние проводимой терапии на риск развития заболеваний щитовидной железы. Достоверной связи частоты возникновения дисфункции щитовидной железы с полом, возрастом начала терапии, временем от окончания терапии, а также с дозой ЛТ выявлено не было. Риск возникновения нарушений существует и при проведении ЛТ на область шеи в небольших дозах (20 Гр).

В наблюдаемой группе за данный период времени не было выявлено пациентов со злокачественными заболеваниями щитовидной железы. Тем не менее, вероятность возникновения рака щитовидной железы после ЛТ на шейно-ключичную область существует и описана в литературе [11, 12], поэтому необходима онкологическая настороженность в отношении этих пациентов. При появлении узловых образований в щитовидной железе обязательно проведение пункционной биопсии с цитологическим исследованием.

Профилактика и контроль возникновения гормональных нарушений обеспечиваются при проведении адекватного диспансерного наблюдения. В настоящее время в России не существует общепринятых стандартов проведения диспансерного обследования пациентов с ЛХ. Рекомендованная схема оценки гормонального профиля включает ежегодное определение уровня гормонов щитовидной железы [9]. Однако, с учетом ранних сроков возникновения нарушений, представляется целесообразным проводить оценку гормонального профиля щитовидной железы дважды в течение первого года наблюдения и далее ежегодно при отсутствии нарушений. Особую группу в процессе наблюдения должны составлять пациенты, получившие ЛТ на область шеи и средостения в больших дозах — 30 Гр и более.

Раннее выявление постлучевых осложнений позволяет своевременно контролировать их течение и минимизировать негативное влияние на качество жизни.

Литература

1. Hoppe R.T., Mauch P.T., Armitage J.O. et al. Hodgkin Lymphoma. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2007.
2. Jereczek-Fossa B.A., Alterio D., Jassem J. et al. Radiotherapy-induced thyroid disorders. Cancer Treat Rev 2004;30(4):369–84.
3. Ильин Н.В., Виноградова Ю.Н. Поздние осложнения терапии больных лимфомой Ходжкина. Практич онкол 2007;8(2):96–101.
4. Constine L.S., Donaldson S.S., McDougall I.R. et al. Thyroid dysfunction after radiotherapy in children with Hodgkin's disease. Cancer 1984;53(4):878–83.
5. Sklar C., Whitton J., Mertens A. et al. Abnormalities of the thyroid in survivors of Hodgkin's disease: data from the Childhood Cancer Survivor Study. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:3227–32.
6. Altman A.J. Supportive care of children with cancer. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2004.
7. Lanzkowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Elsevier academic press, 2005.
8. Кияев А.В. Аутоиммунный тиреоидит у детей. Попробуем взглянуть по-иному? Клинич и экспер тиреоидология 2008;4(3):23–7.
9. Самочатова Е.В., Владимирская Е.Б., Жесткова Н.М. и др. Болезнь Ходжкина у детей. М.: Алтус, 1997.
10. Jaksic J., Dumic M., Filipovic B. et al. Thyroid disease in a school population with thyromegaly. Arch Dis Child 1994;70(2):103–6.
11. Van Leeuwen F.E., Klokman W.J., Veer M.B. et al. Long-term risk of second malignancy in survivors of Hodgkin's disease treated during adolescence or young adulthood. J Clin Oncol 2000;18(3):487–97.
12. Swerdlow A.J., Barber J.A., Hudson G.V. et al. Risk of second malignancy after Hodgkin's disease in a collaborative British cohort: the relation to age at treatment. J Clin Oncol 2000;18(3):498–509.

Эпидемическая вспышка кандидемий, вызванных необычными видами *Candida non-albicans*: закономерности клинического течения и поиски источника

И.И. Калинина[1], Д.В. Литвинов[2], И.В. Веселова[2], Н.И. Пономарева[2], Л.Н. Шелихова [1,2], В.В. Фоминых[2], Г.А. Клясова[3], А.А. Масчан[1]

[1]ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва;
[2]Российская детская клиническая больница, Москва;
[3]Гематологический научный центр РАМН, Москва

Контакты: *Алексей Александрович Масчан amaschan@mail.ru*

Введение. *Грибковые инфекции, несмотря на появление методов ранней диагностики и эффективных антимикотиков остаются нерешенной проблемой гематологии/онкологии. В структуре инвазивных микозов ведущая роль принадлежит кандидозам, самой частой клинической формой которых служит кандидемия. Кандидемии в отделениях детской гематологии/онкологии, как правило, встречаются спорадически, и эпидемии являются большой редкостью. Мы описываем эпидемию кандидемий, вызванную редко встречающимися видами Candida non-albicans.*

Результаты. *В течение 1 месяца в отделении гематологии/онкологии зарегистрировано 10 случаев кандидемий. Их источником стал контаминированный 4% раствор KCl для внутривенного введения. Этиологией были C. guilliermondii у 4 пациентов (у 1 — в сочетании с C. calliculosa), C. parapsilosis — у 3 пациентов и C. pelliculosa — у 3 больных. У 4 пациентов на момент положительной гемокультуры число гранулоцитов составило < 0,5× 10^9/л. Клиническими проявлениями кандидемии была лихорадка > 38,5° у всех пациентов и поражение легких — у 2. Системная противогрибковая терапия проводилась всем пациентам — 5 получали монотерапию, 3 — комбинацию из двух и 2 — комбинацию из трех антимикотиков. Центральный венозный катетер удален у 4 пациентов. Клиническое и микробиологическое излечение достигнуто у всех пациентов, непосредственная летальность составила 0%. Рецидив кандидемии развился у 2 пациентов через 22 и 60 дней от первого эпизода.*

Выводы. *Вспышки системных инфекций, вызванных необычными возбудителями, требуют поиска единого источника эпидемии. Кандидемии, причиной которых является прямая инокуляция возбудителя в кровоток при отсутствии комбинации факторов риска развития инвазивных микозов, имеют благоприятное течение.*

Ключевые слова: *кандидемия, Candida non-albicans, дети, эпидемия, гематология/онкология*

Epidemic outbreak of candidemia caused by unusual types of *Candida non-albicans*: clinical course patterns and search for the source

I.I. Kalinina[1], D.V. Litvinov[2], I.V. Veselova[2], N.I. Ponomareva[2], L.N. Shelikhova[1,2], V.V. Fominykh[2], G.A. Klyasova[3], A.A. Maschan[1]
[1]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;
[2]Russian Children Clinical Hospital, Moscow;
[3]Hematological Research Center, Moscow

Introduction: *Invasive fungal infections (IFI) remain an unresolved issue of hematology/oncology despite the introduction of methods of early diagnostic and invent of new highly active antimycotics. In etiologic structure of IFI the leading role belongs to candidiasis, the most frequent clinical form of which is candidemia. Candidemias in the pediatric hematology/oncology departments usually occur as sporadic cases, and epidemics are very rare. We describe an epidemic outbreak of candidemia caused by species of Candida non-albicans rarely reported in patients.*

Results: *Ten cases of candidemia were registered in the hematology/oncology department within one month. Candidemia was caused by C. guilliermondi in 4 patients (in 1 concomitantly with C. calliculosa), by C. parapsilosis – in 3 patients and by C. pelliculosa in another 3 patients. Contaminated intravenous 4 % KCl solution has been found to be the source of candidemia. In four patients granulocytes count was < 0.5 × 10^9/l at the time of positive blood cultures. Clinical manifestation of candidemia included fever > 38.5 in all patients and lung involvement in 2 patients. All patients received systemic antifungal therapy: 5 — monotherapy, 3 — combinations of 2 drugs and 2 — of 3 drugs. Central venous catheter was removed in 4 patients. Clinical and microbiological cure was achieved in all patients; the mortality rate was 0 %. In 2 patients candidemia relapsed 22 and 60 days after the first episode.*

Conclusions: *Outbreaks of systemic infections caused by unusual pathogens necessitate searching of a single infection source. Candidemia caused by a direct pathogen inoculation in the bloodstream, in the absence of multiple risk factors for invasive fungal infections follows a favorable course.*

Key words: *candidemia, Candida non-albicans, children, epidemic, hematology/oncology*

Введение

Интенсивная химиотерапия, иммуносупрессивная терапия и трансплантация гемопоэтических клеток — основа современной терапии лейкемий, апластических анемий и врожденных иммунодефицитных синдромов у детей. Главными осложнениями такой терапии, существенно ухудшающими прогноз пациентов, служат бактериальные, грибковые и вирусные инфекции. Особая роль принадлежит грибковым инфекциям, которые, несмотря на усовершенствование методов ранней диагностики, появление ряда эффективных антимикотиков и разработку алгоритмов упреждающей терапии остаются важнейшей нерешенной проблемой гематологии/онкологии.

Несмотря на тенденцию к изменению этиологической структуры и повышение доли плесневых грибов самыми частыми возбудителями инвазивных микозов (ИМ) у детей по-прежнему являются грибы рода *Candida*. В структуре ИМ доля кандидозов составляет 20–40 %. В настоящее время известно более 150 видов грибов рода *Candida*, однако лишь немногие из них являются значимыми патогенами у человека. Самой распространенной клинической формой системной кандидозной инфекции у онкогематологических больных является кандидемия; на 2-м месте стоит гораздо реже встречающийся хронический диссеминированный кандидоз, еще реже регистрируются такие формы, как кандидозный менингит, эндофтальмит, пиелонефрит, остеомиелит и другие органные поражения, в сумме составляющие не более 10 % всех документированных случаев инвазивного кандидоза.

Хотя наиболее распространенным возбудителем кандидемии является *C. albicans*, за последние 15–20 лет отмечено значительное возрастание доли *Candida non-albicans: C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata, C. krusei* и более редких возбудителей — *C. lusitaniae, C. guilliermondii, C. kefur* и др. [1–6]. Самыми важными источниками кандидемии у онкогематологических больных являются желудочно-кишечный тракт и кожа, в норме колонизируемые *C. albicans* [7].

Нарушение целостности кожи и слизистых вкупе с другими факторами — нейтропенией, подавлением функции нейтрофилов и тканевых макрофагов и длительным стоянием внутривенных катетеров резко увеличивают риск кандидемии. Особенно уязвимыми в отношении риска кандидемии являются 2 популяции пациентов — недоношенные новорожденные и реципиенты интенсивной химиотерапии. Нетрудно заметить, что факторы риска в этих популяциях практически идентичны — нарушения целостности кожи, стояние внутривенных катетеров, проведение парентерального питания, применение антибиотиков широкого спектра и нарушения числа/функции фагоцитов. Как правило, в каждом конкретном отделении случаи кандидемии встречаются спорадически, более или менее равномерно распределяясь в течение фиксированных интервалов времени. Значительно реже регистрируются эпидемические вспышки, когда случаи кандидемии группируются более компактно с регистрацией нескольких случаев в течение относительно короткого интервала времени — как правило, нескольких недель. Наиболее широко известны эпидемические вспышки кандидемий в отделениях интенсивной терапии и реанимации новорожденных. Десятки описаний объединяет то, что все эти случаи являются внутрибольничными и в возникновении и поддержании эпидемии важную роль играют грибковая колонизация медицинских материалов, входящих в соприкосновение с пациентами, руки медицинского персонала и растворы для парентерального питания [8–12].

Если для успешного лечения кандидемии у каждого конкретного пациента необходимо устранение факторов риска, идентификация патогена и проведение адекватной системной противогрибковой терапии, то для прекращения эпидемии очень важно обнаружение и устранение источника кандидемии. В частности, принципиальным является проведение комплекса санитарных мероприятий, имеющих целью устранение грибковой колонизации инструментария, расходных материалов, медицинского белья и одежды персонала, а также повышенные требования к обработке рук и использованию перчаток.

В отделениях детской гематологии/онкологии эпидемии кандидемии крайне редки, и при поиске в базе данных PubMed нам встретилось лишь 2 случая [13, 14]. Ниже мы описываем эпидемическую вспышку кандидемий, вызванных несколькими видами *Candida non-albicans*, явившуюся результатом использования контаминированного 4 % раствора хлорида калия.

Описание эпидемии и пациентов

С 27.09. по 25.10.2008 в отделении онкогематологии РДКБ у 10 больных получен рост *Candida non-albicans* в гемокультурах, взятых в рамках рутинного микробиологического обследования по поводу фебрильных эпизодов. Посев производился в среду BACTEC Plus/F непосредственно после забора крови из центрального венозного катетера. Возбудитель идентифицировался до вида с определением чувствительности к антимикотикам в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии Гематологического научного центра РАМН (руководитель лаборатории — д.м.н. Г.А. Клясова).

В результате поиска единого источника кандидемии была обнаружена серия раствора 4 % калия хлорида в ампулах по 10 мл, произведенного отечественным заводом по архаичной технологии, которая не обеспечивает должной герметизации ампул. В нескольких ампулах на глаз было заметно наличие раз-

нообразных загрязнений — от единичных белых пленок до массивных хлопьев с черными вкраплениями (рис. 1). Раствор из интактных ампул был использован для приготовления «базового» раствора для инфузии, содержавшего помимо хлорида калия 5% глюкозу и 0,9% хлорид натрия. На микробиологическое исследование были направлены 2 контаминированные ампулы, из которых была культивирована *C. guilliermondii*. При опросе медицинского персонала, занимавшегося приготовлением инфузионных растворов, выяснилось, что указаний на использование визуально недоброкачественных ампул с хлоридом калия не было.

Всего инфузию раствора, содержавшего хлорид калия из подозрительной серии, получили 13 пациентов. Медиана лейкоцитоза на момент инфузии предположительно контаминированного раствора составила 3×10^9/л ($0{,}5–8 \times 10^9$/л). Кандидемия развилась у 10 пациентов (6 мальчиков, 4 девочки, медиана возраста 11,5 (8 мес–16 лет) года): у 3 с острым миелолейкозом, у 3 — с острым лимфобластным лейкозом, у 2 — с нейробластомой IV стадии, у 1 — с В-клеточной лимфомой брюшной полости и у 1 — с Т-клеточной лимфобластной лимфомой. Медиана интервала от момента поступления больного в стационар до дня получения позитивной гемокультуры составила 3,5 (1,2–8,2) мес. У 7 больных кандидемия зафиксирована в первые 3 дня после начала использования предположительно контаминированного раствора, в то время как у 3 — в более поздние сроки. Медиана количества лейкоцитов на момент выделения составила $1{,}85 \times 10^9$/л ($0{,}5–6 \times 10^9$/л), гранулоцитов — $1{,}1 \times 10^9$/л ($0–5{,}64 \times 10^9$/л). На момент положительной гемокультуры лишь 4 пациента из 10 (40%) находились в агранулоцитозе, медиана продолжительности которого составила 20,5 (4–26) дня. Четверо больных (40%) получали парентеральное питание с включением липидов и концентрированных растворов глюкозы. Девять пациентов (90%) получали системные антимикотики: 6 — флуконазол 5 мг/кг/с, 2 — вориконазол (у 1 больной в качестве вторичной профилактики после высева *Candida*, у 1 — в качестве первичной профилактики), 1 — комбинацию вориконазола и каспофунгина.

C. guilliermondii была этиологией кандидемии у 4 пациентов (у 1 — в сочетании с *C. calliculosa*), и по 3 пациента развернули кандидемию, вызванную *C. parapsilosis* и *C. pelliculosa* (рис. 2). В клинической картине у всех больных отмечалась фебрильная лихорадка, у 2 больных — пневмония. Септического шока и других органных поражений зарегистрировано не было. Данные по чувствительности изолятов к антимикотикам приведены в таблице. Антиген грибов рода *Candida* (маннан) определялся только в 1 случае и его уровень составил 0,126 нг/мл.

После изъятия партии предположительно инфицированного 4% раствора калия хлорида эпизоды с кандидемией у пациентов отделения онкогематологии не повторялись.

Рис. 1. *Ампула раствора хлорида калия, контаминированного грибами рода Candida*

Лечение

Всем пациентам после получения информации о выделении *Candida* из крови была модифицирована антимикотическая терапия, вначале эмпирически, а затем в зависимости от показателей чувствительности выделенного патогена. Пяти пациентам проводилась монотерапия: 2 получали амфотерицин В и по 1 — флуконазол, вориконазол и каспофунгин. Два пациента получали комбинированную антимикотическую терапию двумя препаратами: вориконазол + амфотерицин В (липидный комплекс) и вориконазол + амфотерицин В, в то время как 3 пациента — комбинацию из 3 препаратов

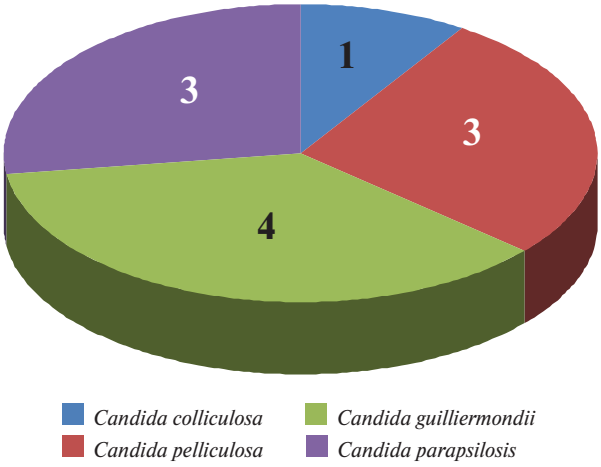


Рис. 2. *Этиологическая структура грибов рода Candida, полученных из гемокультуры в результате эпидемической вспышки*

Чувствительность изолятов к антимикотикам

Пациент	Диагноз	АЧГ* $\times 10^9$/л	Вид *Candida*	Чувствительность					
				флуко-назол	ворико-назол	итрако-назол	каспо-фунгин	амфоте-рицин B	5-ФЦ
К.М.	ОМЛ	1,84	*C. guilliermondii*	у	н. д.	у	у	ч	ч
Б.Ю.	Нейробластома IV степени	0,3	*C. guilliermondii*	у	н. д.	у	у	ч	ч
Ч.А.	Т-ОЛЛ	0	*C. parapsilosis*	ч	н. д.	ч	ч	ч	ч
Ф.А.	ОЛЛ, рецидив	0	*C. pelliculosa*	ч	ч	у	ч	ч	у
А.А.	ОЛЛ, рецидив	1,1	*C. pelliculosa*	ч	ч	у	ч	ч	у
С.К.	ОМЛ, гапло-ТКМ	3,3	*C. pelliculosa*	ч	ч	у	ч	ч	у
М.А.	Нейробластома IV степени	5,6	*C. parapsilosis*	ч	ч	ч	ч	ч	ч
К.И.	В-лимфома III степени	1,1	*C. parapsilosis*	ч	ч	ч	ч	ч	ч
Ш.А.	ОМЛ М7	1,34	*C. guilliermondii*	у	ч	у	у	ч	ч
Р.К.	ОЛЛ, рефрактерный	0,5	*C. guilliermondii*	у	ч	у	у	ч	ч
			C. colliculosa	ч	н. д.	ч	н. д.	ч	ч

**АЧГ — абсолютное число гранулоцитов на момент кандидемии; н. д. — нет данных.*

(каспофунгин + вориконазол + амфотерицин B — у 2 пациентов и каспофунгин + флуконазол + амфотерицин B — у 1). Четырем пациентам, которые находились в состоянии агранулоцитоза, назначался гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), медиана терапии составила 9 (1–17) дней. У всех 4 пациентов отмечалось восстановление гранулоцитопоэза, медиана от дня высева *Candida* до достижения числа гранулоцитов > $0{,}5 \times 10^9$/л составила 5 (4–10) дней.

Четверым пациентам был удален центральный венозный катетер (ЦВК) с медианой в 3 (1–7) дня от дня получения положительной гемокультуры. При микробиологическом исследовании дистального конца удаленных ЦВК, рост *Candida* ни в одном случае не получен. Надо отметить, что у больных с положительной гемокультурой *C. guilliermondii* (4 пациента) *in vitro* данный штамм был устойчив к каспофунгину, однако данный препарат 3 из них был назначен эмпирически с положительным клиническим и микробиологическим эффектом.

Исходы

У всех 10 пациентов кандидемия была купирована, медиана продолжительности лихорадки составила 2,5 (1–28) дня. У одного из 2 пациентов, у которых кандидемия сопровождалась пневмонией, очаг легочного поражения полностью разрешился по данным КТ-легких через 43 дня после высева, а у второго пациента легочное поражение сохранялось до смерти от резистентного ОМЛ, а при проведении аутопсии и гистологического исследования субстрата было доказано его специфическое лейкемическое происхождение.

Девять пациентов после разрешения лихорадки и «стерилизации» крови получили вторичную антимикотическую профилактику: вориконазол — 5, флуконазол — 2, позаконазол и итраконазол — по 1 пациенту.

Повторный эпизод кандидемии, вызванной тем же видом *Candida*, развился у 2 пациентов. Рецидив кандидемии, вызванный *C. guilliermondii*, наблюдался у больной с нейробластомой через 22 дня от первого эпизода. ЦВК этой пациентке не удалялся, и вторичная противогрибковая профилактика не проводилась. На момент повторного эпизода кандидемии гемопоэз больной был полностью восстановлен, и из клинических проявлений системной кандидозной инфекции выявлялась лишь лихорадка. Чувствительность *C. guilliermondii* была идентичной выявленной при первом эпизоде, в частности возбудитель был резистентен к каспофунгину. Несмотря на это, также как и в течение первого эпизода, больная до идентификации возбудителя получила терапию каспофунгином и достигла афебрилитета через 1 день. ЦВК не удалялся, в дальнейшем пациентка противогрибковой профилактики не получала, рецидивов кандидемии не было.

Повторный эпизод кандидемии, вызванной *C. pelliculosa*, развился у больного во 2-й ремиссии ОЛЛ, получавшего вторичную профилактику флуконазолом внутрь, через 60 дней после первого эпизода. ЦВК этому пациенту также не удалялся. На момент повторного эпизода кандидемии пациент на-

ходился в агранулоцитозе после очередного «блока» полихимиотерапии. Помимо высокой лихорадки в клинической картине отмечались судороги. Пациент получал противогрибковую терапию в/в флуконазолом в течение 5 дней, затем внутрь; удален ЦВК и афебрилитет достигнут через 3 дня, кандидемия купирована, судороги не повторялись, при бактериологическом и вирусологическом исследовании ликвора патогенов не выявлено.

Обсуждение

Инвазивные кандидозы и в частности кандидемии в отделениях детской гематологии/онкологии, как правило, встречаются в виде спорадических случаев и их частота даже в крупных клиниках, где проводится максимально интенсивная химиотерапия, не превышает нескольких случаев в год [15–18]. Возникновение же вспышки, подобно описываемой нами, во время которой в течение первых 3 дней регистрируется 7 случаев кандидемии, а всего за месяц — 10 случаев, является крупной эпидемией. Развитие эпидемии кандидемии ставит целый ряд задач, от быстрого решения которых зависит судьба десятков пациентов. В первую очередь необходимо определить, является эпидемия истинной или ложной. Псевдоэпидемия может быть связана с контаминацией *Candida* материалов (например, игл), используемых для забора крови на гемокультуры или сред, применяемых в микробиологической лаборатории [19, 20].

В нашем случае забор крови осуществлялся разными медицинскими сестрами одноразовыми шприцами, открытыми непосредственно перед забором крови из центральных венозных катетеров, и, следовательно, контаминация материала была исключена. В микробиологической же лаборатории, осуществлявшей исследование позитивных гемокультур, идентификации *Candida*, подобных культивированным из нашего центра, за тот же период не было. Следовательно, в описываемой ситуации речь шла об истинной эпидемии.

Второй важнейшей задачей является выяснение того, возникла эпидемия из одного источника или она является результатом общего санитарного неблагополучия и множественной колонизации грибками *Candida* рук персонала, медицинского инструментария, белья, больничной мебели и т. д. Очевидно, что только точное определение источника эпидемии может позволить добиться скорейшего ее прекращения. Эта задача зачастую трудновыполнима и может потребовать выполнения сотен и даже тысяч микробиологических исследований [21]. В нашем случае экстраординарная концентрация 7 случаев кандидемии в течение 3 дней прямо указывала на необходимость поиска единого внешнего источника, связанного с инфузионной терапией. Кроме того, видовой спектр кандидемии у наших пациентов (*C. guilliermondii, C. pelliculosa, C. calliculosa*), исключительно редко вызывающих инвазивные кандидозы, также говорил о необходимости поиска единого источника. В частности, первое, что было необходимо проверить — это качество внутривенных растворов. К счастью, поиски источника быстро привели к результату, и нами была обнаружена партия ампул с 4% хлоридом калия, в части которых невооруженным глазом было заметно загрязнение, и из которых впоследствии была выделена *C. guilliermondii*. Дополнительным подтверждением причинной роли именно данной партии ампул послужило прекращение эпидемии после полного ее изъятия. Ампулы были изготовлены по старой технологии (оплавление конусообразного конца) на одном из российских заводов. В прошлом мы уже встречались с грибковой контаминацией ампул с хлоридом калия именно этого фармацевтического предприятия, однако причиной эпидемии они стали впервые.

Третьей задачей во время эпидемии кандидемии является определение правильной терапевтической тактики — назначение адекватной противогрибковой терапии, устранение факторов риска неблагоприятного исхода, в частности нейтропении, а также решение вопроса о необходимости удаления ЦВК. Если польза раннего удаления ЦВК при кандидемии достаточно убедительно показана у пациентов отделений интенсивной терапии, то в отношении пациентов, страдающих онкогематологическими заболеваниями, данные весьма противоречивы [22–24]. Анализ эффективности противогрибковой терапии открыл ряд интересных закономерностей — благоприятное течение (прямая и атрибутивная летальность 0%) и разрешение кандидемиии и лихорадки у всех пациентов, несмотря на то, что у их части имелась устойчивость патогенов к назначенному антимикотику. Это, на наш взгляд, связано с тем, что 6 из 10 пациентов на момент инокуляции патогена не были в состоянии агранулоцитоза, а у 4 пациентов, имевших гранулоцитопению $< 0{,}5 \times 10^9$/л, ее разрешение было быстро достигнуто под влиянием терапии G-CSF. В отношении необходимости удаления ЦВК при кандидемии, вызванной прямым введением культуры *Candida* в катетер, наше исследование не дает однозначных ответов, поскольку первый эпизод кандидемии разрешился у всех пациентов, независимо от того, был катетер удален (4 пациента) или нет (6 пациентов). С другой стороны, у 2 пациентов (33%), у которых катетер не был удален, в дальнейшем развился рецидив кандидемии, вызванный первичным изолятом, что может свидетельствовать как о сохранении живых грибковых клеток в составе биопленки, так и о колонизации данным грибком или формировании в результате кандидемии и персистенции отдаленных грибковых метастазов.

Важным вопросом является, почему кандидемия у пациентов была вызвана четырьмя видами *Candida*,

а из контаминированных ампул выделен лишь один вид — *C. guilliermondii*? На наш взгляд, это является следствием недостаточно полного микробиологического исследования, которому были подвергнуты лишь 2 наиболее загрязненные ампулы из контаминированной серии. Что касается момента, когда могла произойти грибковая контаминация раствора, то выявить его с точностью невозможно. Это могло произойти и на самом заводе, и в ходе дальнейшего хранения (в картонных коробках при комнатной температуре при неизвестной влажности) ампул, герметичность которых не обеспечивается технологическими особенностями производства.

Очевидным уроком нашего наблюдения является то, что системная профилактика не предотвращает кандидемии, если причиной последней служит прямое внутривенное введение контаминированной среды. Важным наблюдением представляется и исключительно благоприятное течение кандидемии из единого внешнего источника, поскольку у всех пациентов достигнуто как клиническое, так и микробиологическое излечение. Отсутствие летальности и тяжелых осложнений у наших пациентов служит отражением того, что развитие кандидемии явилось следствием прямого попадания *Candida* в кровеносное русло, а не сочетания у пациентов факторов риска, обычно способствующих развитию инвазивных микозов: тяжелой длительной нейтропении, нарушений питания, повреждения кожных покровов, тяжелого мукозита, терапии глюкокортикоидами и т. д.

В заключение считаем необходимым подчеркнуть, что современная госпитальная терапия детей с онкогематологическими заболеваниями представляет собой сложнейшую многокомпонентную технологию, в которой нет мелочей, и которая должна использовать только проверенные высококачественные препараты, начиная с химиотерапии и заканчивая самыми простыми инфузионными растворами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pagano L., Antinori A., Ammassari A. et al. Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. Eur J Haematol 1999 Aug;63(2):77–85.
2. Auberger J., Lass-Flörl C., Ulmer H. et al. Significant alterations in the epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. Int J Hematol 2008 Dec;88(5):508–15.
3. Pagano L., Caira M., Candoni A. et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. Haematologica 2006 Aug;91(8):1068–75.
4. Hahn-Ast C., Glasmacher A., Mückter S. et al. Overall survival and fungal infection-related mortality in patients with invasive fungal infection and neutropenia after myelosuppressive chemotherapy in a tertiary care centre from 1995 to 2006. J Antimicrob Chemother 2010 Apr;65(4):761–8.
5. Sipsas N.V., Lewis R.E., Tarrand J. et al. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001–2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. Cancer 2009 Oct 15;115(20):4745–52.
6. Hachem R., Hanna H., Kontoyiannis D., Jiang Y., Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: Candida glabrata and Candida krusei as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. Cancer 2008 Jun;112(11):2493–9.
7. Nucci M., Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? Clin Infect Dis 2001 Dec 15;33(12):1959–67.
8. Hernández-Castro R., Arroyo-Escalante S., Carrillo-Casas E.M. et al. Outbreak of Candida parapsilosis in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. Eur J Pediatr 2010 Jul;169(7):783–7.
9. Dimopoulos G., Ntziora F., Rachiotis G., Armaganidis A., Falagas M.E. Candida albicans versus non-albicans intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. Anesth Analg 2008 Feb;106(2):523–9.
10. Sherertz R.J., Gledhill K.S., Hampton K.D. et al. Outbreak of Candida bloodstream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. J Pediatr 1992 Mar;120(3):455–61.
11. Roilides E., Farmaki E., Evdoridou J. et al. Candida tropicalis in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J Clin Microbiol 2003 Feb;41(2):735–41.
12. Huang Y.C., Lin T.Y., Leu H.S. et al. Outbreak of Candida parapsilosis fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. Infection. 1999 Mar–Apr;27(2):97–102.
13. Posteraro B., Bruno S., Boccia S. et al. Candida parapsilosis bloodstream infection in pediatric oncology patients: results of an epidemiologic investigation. Infect Control Hosp Epidemiol 2004 Aug;25(8):641–5.
14. Barchiesi F., Caggiano G., Falconi Di Francesco L. et al. Outbreak of fungemia due to Candida parapsilosis in a pediatric oncology unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2004 Aug;49(4):269–71.
15. Stamos J.K., Rowley A.H. Candidemia in a pediatric population. Clin Infect Dis 1995 Mar;20(3):571–5.
16. Ridola V., Chachaty E., Raimondo G. et al. Candida infections in children treated with conventional chemotherapy for solid tumors (transplant recipients excluded): The Institut Gustave Roussy Pediatrics Department experience. Pediatr Blood Cancer 2004 Apr;42(4):332–7.
17. Blyth C.C., Chen S.C., Slavin M.A. et al. Australian Candidemia Study. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. Pediatrics 2009 May;123(5):1360–8.
18. Besnard M., Hartmann O., Valteau-Couanet D. et al. Systemic Candida infection in pediatric BM autotransplantation: clinical signs, outcome and prognosis. Bone Marrow Transplant 1993 Jun;11(6):465–70.
19. Medeiros E.A., Lott T.J., Colombo A.L. et al. Evidence for a pseudo-outbreak of Candida guilliermondii fungemia in a university hospital in Brazil. J Clin Microbiol 2007 Mar;45(3):942–7.
20. Yagupsky P., Dagan R., Chipman M. et al. Pseudooutbreak of Candida guilliermondii fungemia in a neonatal intensive care unit. Pediatr Infect Dis J 1991 Dec;10(12):928–32.
21. Orth B., Frei R., Itin P.H. et al. Outbreak of invasive mycoses caused by Paecilomyces lilacinus from a contaminated skin lotion. Ann Intern Med 1996 Nov 15;125(10):799–806.
22. Nucci M., Anaissie E., Betts R.F. et al. Early removal of central venous catheter in patients withcandidemia does not improve outcome: analysis of 842 patients from 2 randomized clinical trials. Clin Infect Dis 2010 Aug 1;51(3):295–303.
23. Horn D.L., Ostrosky-Zeichner L., Morris M.I. et al. Factors related to survival and treatment success in invasive candidiasis or candidemia: a pooled analysis of two large, prospective, micafungin trials. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010 Feb;29(2):223–9.
24. Rodriguez D., Park B.J., Almirante B. et al. Barcelona Candidemia Project Study Group. Impact of early central venous catheter removal on outcome in patients with candidaemia. Clin Microbiol Infect 2007 Aug;13(8):788–93.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при ювенильном миеломоноцитарном лейкозе: анализ опыта одного центра и обзор литературы

М.А. Масчан[1], Л.А. Хачатрян[1], Ю.В. Скворцова[1], Е.Е. Курникова[2], Д.А. Шашелева[1], В.О. Бобрынина[1], Д.Н. Балашов[1], Е.В. Скоробогатова[1], Д.Д. Байдильдина[1], Г.А. Новичкова[1], А.А. Масчан[1]

[1]ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва;
[2]Российская детская клиническая больница, Москва

Контакты: *Михаил Александрович Масчан mmaschan@yandex.ru*

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) — стандарт терапии пациентов с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом (ЮММЛ). В статье проанализирован опыт ТГСК в группе 17 пациентов с ЮММЛ. Во всех случаях использовалось миелоаблативное кондиционирование на основе бусульфана (15 пациентов) или треосульфана (2 пациента). Пять трансплантаций выполнено от родственного совместимого донора, 8 — от неродственного донора (2 — пуповинная кровь), 4 — от родственного частично совместимого донора. Первичное приживление достигнуто у 75 % пациентов. Частота острой РТПХ II–IV степени составила 58 %, III–IV степени — 23 %. Частота хронической РТПХ составила 33 %. Рецидив заболевания развился у 5 пациентов. Безрецидивная выживаемость составила 66 ± 12 %. Четыре пациента умерли от осложнений трансплантации. Трансплантационная смертность составила 28 ± 12 %. Пять пациентов умерли от прогрессии основного заболевания. Общая выживаемость составила 38 ± 13 % при медиане наблюдения 13 месяцев. В статье дан обзор основных публикаций, посвященных ТГСК при ЮММЛ.

Ключевые слова: *трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, трансплантационная смертность, рецидив*

Hematopoietic stem cell transplantation in juvenile myelomonocytic leukemia: analyse one centre experience and literature review

M.A. Maschan[1], L.A. Khachatryan[1], Yu.V. Skvortsova[1], E.E. Kurnikova[2], D.A. Shasheleva[1], V.O. Bobrynina[1], D.N. Balashov[1], E.V. Skorobogatova[1], D.D. Baydildina[1], G.A. Novichkova[1], A.A. Maschan[1]
[1]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;
[2]Russian Children Clinical Hospital, Moscow

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the standard curative therapy for juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Seventeen patients with JMML received myeloablative conditioning (busulfan-based — 15, treosulfan-based — 2). Donors included 5 matched related siblings, 8 — matched unrelated volunteer or cord blood (2), 4 — mismatched relatives. Primary engraftment was achieved in 75 %. The rate of acute GVHD grade II–IV was 58 %, grade III–IV — 23 %. Chronic GVHD occurred in 33 % of patients. Five JMML relapses occurred. Relapse-free survival is 66 ± 12 %. Four patients died of transplant-related complications. TRM was 28 ± 12 %. Five patients died of disease progression. Overall survival is 38 ± 13 % with median follow-up of 13 months. A review of most important publications related to HSCT in JMML is provided.

Key words: *hematopoietic stem cell transplantation, juvenile myelomonocytic leukemia, transplant-related mortality, relapse*

Введение

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ), согласно классификации ВОЗ 2008 г., относят к группе заболеваний, несущих черты миелопролиферативных заболеваний и миелодиспластических синдромов. В основе болезни лежит патологическая активация сигнального пути, ассоциированного с рецептором гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), обусловленная, как правило, соматическими мутациями в одном из 5 генов: *PTPN11, KRAS, NRAS, CBL* и *NF1*. До 10 % пациентов в качестве основного генетического события несут герминальную мутацию в гене NF1, реже — в других перечисленных выше генах [1, 2].

Клинические проявления ЮММЛ достаточно стереотипны и включают гепатоспленомегалию, лимфаденопатию, полиморфную сыпь, задерж-

ку физического развития, рецидивирующее затяжное течение обычных вирусных и бактериальных инфекций. Характерная лабораторная картина включает лейкоцитоз с развернутой лейкоцитарной формулой, стойкий моноцитоз, анемию и тромбоцитопению. Специфическими биологическими феноменами являются аномальное повышение содержания фетального гемоглобина и гиперчувствительность миелоидных предшественников к ГМ-КСФ *in vitro*. Бластная популяция в периферической крови и костном мозге по определению не превышает 20%. Трансформация в острый лейкоз возможна, но не характерна для ЮММЛ, однако в естественных условиях заболевание протекает злокачественно и ведет к смерти пациента. Смерть, как правило, обусловлена патологической инфильтрацией легких или инфекционными осложнениями [3].

Высокодозная химиотерапия (ХТ) не изменяет неблагоприятный естественный прогноз заболевания [4, 5]. Единственным методом терапии, приводящим к излечению заболевания, служит трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Лечебный потенциал ТГСК при ЮММЛ был продемонстрирован в конце 70-х годов XX в., однако первое проспективное исследование ТГСК при ЮММЛ было выполнено лишь через 20 лет [6, 7]. Как и при ряде других тяжелых заболеваний, терапевтический потенциал ТГСК оплачен высокой ценой. Трансплантационная смертность, т. е. вероятность смерти от осложнений процедуры трансплантации (TRM, transplant-related mortality), составляет до 20%, сохраняется риск развития инвалидизирующих поздних осложнений и длительной зависимости от медикаментозной терапии. Противоопухолевая эффективность ТГСК ограничена: вероятность развития рецидива ЮММЛ составляет 30–50% [8].

В настоящей статье суммирован опыт проведения ТГСК у пациентов с ЮММЛ в Российской детской клинической больнице (РДКБ)/Федеральном научно-клиническом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии (ФНКЦ ДГОИ), и проанализированы публикации, посвященные данной теме.

Материалы и методы

В исследование включены 17 пациентов с ЮММЛ (13 мальчиков и 4 девочки), трансплантированных в отделении трансплантации костного мозга РДКБ в период с 2003 по 2010 г. Всего выполнено 23 ТГСК (17 — первичных, 6 — повторных). Диагноз был установлен в соответствии с международными критериями (табл. 1). Всем пациентам ретроспективно выполнено молекулярно-генетическое исследование генов *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS* и *CBL*, у 11 пациентов диагноз верифицирован. Двум пациентам установлен клинический диагноз нейрофиброматоз I типа (NF1).

Медиана возраста на момент диагноза составила 18 месяцев. Медиана интервала диагноз — трансплантация составила 12,2 (2,1–39,3) месяцев, медиана возраста на момент трансплантации — 3,7 (1,3–5,3) года. Медиана наблюдения составила 13 (0,5–82) месяцев. Детальная исходная клинико-лабораторная характеристика группы представлена в табл. 2.

Таблица 1. *Критерии диагностики ЮММЛ [2]*

I. Обязательные клинические и гематологические критерии	• Содержание моноцитов ПК > $1{,}0 \times 10^9$/л • Содержание бластов в крови и КМ < 20% • Спленомегалия • Отсутствие Ph-хромосомы или *BCR-ABL* транскрипта
II. Обязательные клинические и гематологические критерии	• Соматическая мутация генов *PTPN11* или *RAS*, или *CBL* • Мутация гена *NF1* или клинический диагноз нейрофиброматоза I типа • Моносомия 7
III. Дополнительные лабораторные критерии	• Спонтанный рост гранулоцитарно-макрофагальных колоний из мононуклеаров ПК или гиперчувствительность к ГМ-КСФ • Повышенное содержание гемоглобина F • Циркуляция незрелых гранулоцитов в ПК • Лейкоцитоз > 10×10^9/л • Клональная цитогенетическая аномалия, отличная от моносомии 7

Диагностическое правило: необходимо выполнение всех критериев группы I и одного из критериев группы II. При отсутствии критериев группы II необходимо выполнение двух критериев группы III.

Терапия до трансплантации. Все пациенты до трансплантации получали ХТ. Пять пациентов получали только дифференцировочную терапию: 13-цис-ретиноевая кислота в дозе 100 мг/м²/сутки ежедневно (Роаккутан, Хоффман-Ля Рош) и низкие дозы цитозин-арабинозида (20 мг/м²/сутки, 10 дней каждого месяца). Пять пациентов получали только высокодозную ХТ. Семь пациентов получали оба варианта терапии. Высокодозная терапия включала курсы FLAM (флударабин 30 мг/м²/сут № 5, цитозин-арабинозид 2000 мг/м²/сут № 5, митоксантрон 10 мг/м² № 3) у 9 пациентов и курсы ADE (цитозин-арабинозид 200 мг/м²/сут № 7, этопозид 150 мг/м² № 3, даунорубицин 45 мг/м² № 3) у 3 пациентов. Четырем пациентам до трансплантации была выполнена спленэктомия.

Статус на момент трансплантации. На момент начала кондиционирования у 9 пациентов статус болезни оценивался как «стабильное заболевание», у 8 пациентов — как «активное заболевание». «Стабильное заболевание» определялось как отсутствие клинических и лабораторных признаков ЮММЛ, за исключением моноцитоза и спленомегалии не более 2 см из-под ребра.

Таблица 2. *Клинико-лабораторная характеристика группы пациентов с ЮММЛ (на момент установления диагноза)*

	Пол	Возраст, лет[1]	Лейкоциты, $\times 10^9$/л	Тромбоциты, $\times 10^9$/л	Моноциты		Незрелые гранулоциты[2], кровь, %	Бласты к. м., %	HbF, %	ГМ-колонии[3]	Ген	NF[4]
					%	абс., $\times 10^9$/л						
1	М	1,2	10	27	16	1,6	2	1	5	+	*NRAS*	–
2	Ж	5,1	29	104	16	4,7	23	7,5	44	+	–	–
3	М	2,6	107	23	1	1,2	18	1,2	21	+	*PTPN11*	–
4	М	0,9	22	19	44	9,6	5	3,2	19	+	–	–
5	М	3,0	33	62	15	4,9	4	1,6	38	+	*PTPN11*	–
6	М	1,5	39	116	19	7,5	13	3,6	но[5]	+	*PTPN11*	–
7	Ж	1,3	29	197	20	5,9	5	7	8	+	*NRAS*	–
8	Ж	0,7	58	123	33	19,3	10	11,2	9	+	–	+
9	М	0,9	80	51	15	12,0	16	3	11	+	*KRAS*	–
10	М	3,8	11	5	11	1,2	29	10	53	+	*PTPN11*	–
11	Ж	4,1	36	17	4	1,4	27	5,6	36	–	*PTPN11*	–
12	М	4,6	46	42	13	6,0	11	20	0,4	но	–	–
13	М	0,2	63	92	49	31,0	3	2	48	+	–	+
14	М	4,5	40	71	33	13.0	21	2,5	но	но	–	–
15	М	3,4	42	4	33	14,0	9	8	3	–	*PTPN11*	–
16	М	1,0	25	150	21	5,2	9	18,4	9	–	*CBL*	–
17	М	1,4	4,2	27	39	1,6	1	9,6	2	–	*KRAS*	–
медиана		**1,5**	**37,5**	**56**	**19**	**5,9**	**10,5**	**4,6**	**15**			

[1]*возраст на момент установления диагноза;*
[2]*Σ про-, миело-, метамиелоциты, палочкоядерные нейтрофилы;*
[3]*спонтанный рост гранулоцитарно-макрофагальных колоний из ПК;*
[4]*клинический диагноз нейрофиброматоза;*
[5]*но — не определяли.*

Характеристика трансплантата. Пять пациентов трансплантированы от родственного совместимого донора (MSD), в 3 случаях источником стволовых клеток был костный мозг (КМ), в 1 — периферическая кровь (ПК), еще в 1 — пуповинная кровь (СВ). Шесть пациентов трансплантированы от неродственного совместимого донора (MUD) (HLA-совместимость 10/10 — 4 пациента, 9/10 — 2), в 3 случаях источником стволовых клеток был КМ, в 3 — ПК. В 2 случаях трансплантат был представлен двумя образцами неродственной СВ (HLA-совместимость 9/10 и 8/10). Четырем пациентам выполнена трансплантация от родственного частично совместимого донора (MMRD), в 3 случаях (гаплоидентичный донор, HLA-совместимость 5/10 — 2 пациента, 7/10 — 1) источником стволовых клеток явилась ПК, подвергнутая иммуномагнитной деплеции CD3/CD19 на приборе CliniMACS, Miltenyi Biotec, Германия, в 1 случае (донор — мать, совместимость 9/10) трансплантирован нативный КМ. Иммуномагнитная селекция выполнялась в соответствии с рекомендацией производителя.

Кондиционирование. Все пациенты получили миелоаблативное химиотерапевтическое кондиционирование. Пятнадцать пациентов получили в качестве базового компонента кондиционирования бусульфан (Bu), 2 пациента — треосульфан (Treo). Четыре пациента получили кондиционирование бусульфан/циклофосфамид/мелфалан (Bu/Cy/Mel). Восемь пациентов — бусульфан/флударабин/мелфалан (Bu/Flu/Mel). Пациенты, трансплантированные от неродственного или гаплоидентичного донора, получили в составе кондиционирования дополнительную иммуносупрессию антитимоцитарным глобулином. Детали кондиционирования приведены в табл. 3.

Состав трансплантата. Медиана дозы нуклеарных клеток составила $5{,}8 \times 10^8$/кг (0,05–22) массы тела реципиента. При гаплоидентичной трансплантации доза $CD34^+$ клеток составила 13 $(4{,}7–16) \times 10^6$/кг, $CD3^+$ – 10 $(4{,}8–51) \times 10^4$/кг и $CD20^+$ – 3 $(1{,}4–12{,}8) \times 10^4$/кг.

Профилактика и терапия реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Профилактика РТПХ после родственной совместимой трансплантации проводилась циклоспорином А (CsA) (монотерапия — 3, в комбинации с метотрексатом (Mtx) — 1, с мофетила микофенолатом (MMF) — 1). Профи-

лактика РТПХ после MUD трансплантации проводилась комбинацией ингибитора кальциневрина (CsA — 1, такролимус — 7) и Mtx (1 пациент) либо MMF (6 пациентов). Профилактика РТПХ после гаплоидентичной трансплантации проводилась CsA у 2 пациентов, получивших более 5×10^4 $CD3^+$ клеток на кг массы тела. Терапия 1-й линии острой РТПХ (о. РТПХ) проводилась метилпреднизолоном в стартовой дозе 2 мг/кг/сутки (см. табл. 3).

Профилактика и терапия инфекций и ранних осложнений. Все пациенты получали терапию в боксах с ламинарным потоком воздуха и HEPA-фильтрацией. Профилактика инфекционных осложнений включала ципрофлоксацин, флуконазол и ацикловир. Контроль цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ) основывался на еженедельном мониторинге вирусной ДНК в крови методом ПЦР и упреждающей терапии ганцикловиром при 1-крат-

Таблица 3. *Характеристики и результаты ТГСК в группе пациентов с ЮММЛ*

	Возраст, лет	Интервал[1], мес	Терапия[2] до ТГСК	Донор[2]	Источник ГСЛ[4]	Доза нуклеарных клеток, $\times 10^8$/кг	Кондиционирование[5]	Профилактика РТПХ[6]	Приживление, день	о. РТПХ	Рецидив, дней от ТГСК	Исход[7] (время от ТГСК, мес)	Причина смерти
1	2,5	17,8	2,1	UCB	2×CB	2,5	Treo42/Mel100/Flu150Atgam90	Tac/MMF	22	1	–	**10,6+**	–
6	2,9	17,7	1, 2, 3	UCB	2×CB	1,6	Bu20/Cy120/Thy10	Tac/MMF	0	–	+ 58	†12,9	ЮММЛ
2	5,3	3,3	2	MUD	КМ		Bu16/Mel100/Thy7	Tac/pred	12	2	–	†0,5	сепсис
4	1,3	4,6	2,1	MUD	ПК	10	Bu16/Mel140/Cy120/ATG-F40	CsA/MMF/Mtx	15	2	–	**82,2+**	–
7	4,3	36,2	1	MUD	КМ	10	Bu*19/Mel140/Flu150/Thy10	Tac/MMF	16	4	–	†3,9	ЦМВ/РТПХ
9	1,9	12,2	1	MUD	ПК	22	Bu16/Mel140/Cy120/Atgam90	CsA/MMF	14	2	–	**64,9+**	–
16	4,3	39,3	1	MUD	КМ	6	Bu16/Mel140/Flu150/Thy10	Tac/MMF	19	4	–	†1,1	РТПХ
17	3,0	17,0	2,1	MUD	ПК	5	Bu16/Mel140/Flu150/Atgam90	Tac/MMF	23	2	–	**2,9+**	–
8	2,4	20,5	1,2	MMRD	ПК (TCD)	11	Bu*19/Mel140/Flu150/Thy5	CsA	0	–	–	†14,3	ЦМВ
5	4,2	14,1	2,3	MMRD	ПК (TCD)	3,2	FLAM/Bu16/Mel100/Atgam60	CsA	13	0	+ 49	†14,3	ЮММЛ
12	5,3	8,4	2,3	MMRD	ПК (TCD)	2,3	FLAM/Bu16/Mel100/Thy6	Нет	0	–	–	**35,3+**	–
11	4,5	4,7	2	MMRD	КМ	5,6	Bu*19/Mel140/Flu150/Thy5	CsA/MMF	15	1	–	**27,0+**	–
3	2,8	2,1	1	MSD	КМ	7,8	Bu16/Mel140/Cy120	CsA/MMF	32	0	+ 116	†12,3	ЮММЛ
13	2,7	30,0	1,2	MSD	CB	0,05	Bu16/Mel140/Cy120	CsA	0	–	+ 46	†17,1	ЮММЛ
14	5,2	8,3	1,2	MSD	КМ	3,1	Treo42/Mel100/Flu150	CsA	18	2	–	**11,2+**	–
15	3,7	4,0	1,3	MSD	КМ	12	Bu16/Mel140/Flu150	CsA	8	2	–	**35,5+**	–
10	4,3	6,8	2	MSD	ПК	19	Bu16/Cy120/Vp500	CsA/Mtx	19	0	+ 48	†4,3	ЮММЛ
медиана	**3,7**	**12,2**				**5,8**			**16**				

[1]*интервал от даты установления диагноза до даты трансплантации;*
[2]*1 — терапия низкими дозами цитарабина и 13-цис-ретиноевой кислотой; 2 — высокодозная ХТ (FLAM, etc.); 3 — спленэктомия;*
[3]*UCB — неродственная пуповинная кровь, MSD — совместимый сиблинг, MUD — неродственный совместимый донор, MMRD — родственный частично совместимый донор;*
[4]*CB — пуповинная кровь, TCD — деплеция Т-клеток;*
[5]*Treo — треосульфан, Mel — мелфалан, Flu — флударабин, Bu — бусульфан, Thymo — тимоглобулин, Cy — циклофосфамид, ATG-F — АТГ-Фрезениус, VP — этопозид, FLAM — флударабин/цитарабин/митоксантрон, Bu* — бусульфан для внутривенного введения, Atgam — атгам. Дозы бусульфана, циклофосфамида указаны в мг/кг, треосульфана — г/кг, мелфалана, флударабина, этопозида — в мг/м²;*
[6]*Tac — такролимус, доза 0,015–0,03 мг/кг/сутки; CsA — циклоспорин А, доза 1 мг/кг/сутки; MMF — микофенолата мофетил, доза 20 мг/кг/сутки, Mtx — метотрексат, доза 15 мг/м² день +3, 10 мг/м² — день +6, +11;*
[7]*† — умер, + — жив.*

ном (неродственный или частично совместимый донор) либо 2-кратном (родственный совместимый донор) выявлении ДНК ЦМВ. Профилактика вено-окклюзивной болезни (ВОБ) печени проводилась гепарином в дозе 100 Ед/кг/сутки. Профилактика геморрагического цистита — меркаптоэтансульфонатом (Уромитексан).

Днем приживления считался первый из 3 последовательных дней с уровнем лейкоцитов > 1.0×10^9/л. Диагностика и клиническое стадирование о. и хронической РТПХ (х. РТПХ) и ВОБ печени осуществлялись на основании международных критериев. Частота развития о. РТПХ оценивалась у 17 пациентов (13 — после первой трансплантации, 4 — после 2-й трансплантации). Частота развития х. РТПХ оценивалась у 15 пациентов, продолжительность жизни которых после приживления составила более 100 дней.

Анализ гемопоэтического химеризма. Определение доли собственных клеток реципиента в крови после ТГСК проводилось с использованием коммерческого набора для определения донорского химеризма производства ООО «Центр медицинской генетики». Полный донорский химеризм констатировался при выявлении > 98 % донорских клеток в образце. Выделение клеточных линий для исследования линейного химеризма осуществлялось иммуномагнитными реагентами Dynabeads®, Invitrogen Dynal AS, США.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен в программах Statistica 7.0, StatSoft и GraphPad InStat. Функция выживаемости и кумулятивная вероятность анализируемого события рассчитана по методу Каплана–Майера. Пациенты, живущие в ремиссии на момент анализа данных, цензурированы 01.01.2011. Сравнение медиан выполнено при помощи теста Манна–Уитни, сравнение разности долей — при помощи точного теста Fisher. При анализе факторов прогноза сравнение функции выживаемости выполнялось при помощи log-rank теста. При анализе метрических переменных формировали 2 группы по отношению к медиане (1 – ≤, 2 – >). Статистически значимыми считались различия при $p < 0{,}05$.

Результаты трансплантации

Приживление. Первичное приживление достигнуто у 13 пациентов. Медиана восстановления нейтрофилов составила 16 (8–32) дней. Четырем пациентам с первичной недостаточностью трансплантата была выполнена 2-я трансплантация. Медиана выполнения 2-й трансплантации составила 128 (54–292) дней. Приживление после 2-й ТГСК достигнуто у всех пациентов с медианой восстановления гемопоэза 13 (12–16) дней. Таким образом, кумулятивная вероятность первичного приживления составила 76,5 ± 10 %, финального приживления — 100 % (рис. 1).

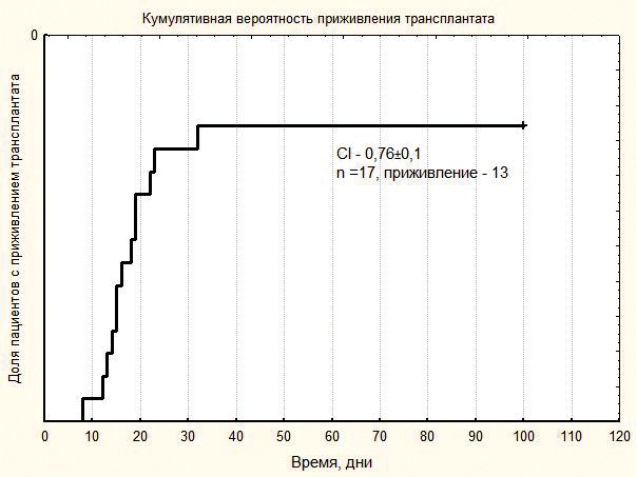


Рис. 1. *Кумулятивная вероятность приживления трансплантата*

О. РТПХ. О. РТПХ II–IV степени развилась после первой трансплантации у 10 (58 %) пациентов, III–IV степени — у 3 (23 %) пациентов. У 2 пациентов о. РТПХ стала основной причиной смерти.

Химеризм. Систематический мониторинг гемопоэтического химеризма проводился у 13 пациентов. У 4 пациентов зарегистрирован смешанный химеризм на сроках 38 (16–116) дней. Во всех случаях была отменена профилактическая иммуносупрессия и выполнена инфузия нативных донорских лимфоцитов (DLI). В результате иммунологического вмешательства у 2 пациентов зарегистрировано развитие клиники о. РПТХ. У 1 пациента произошло восстановление полного донорского химеризма, сохранение гематологической ремиссии и формирование экстенсивной х. РТПХ. В 1 случае достигнуто временное восстановление донорского химеризма и развитие развернутого рецидива через 180 дней от детекции смешанного химеризма. В 2 случаях, несмотря на DLI, развился гематологический рецидив.

Х. РТПХ. Диагноз х. РТПХ установлен у 4 из 12 пациентов (33 %); экстенсивная форма х. РТПХ — у 3 пациентов. У 1 пациента развитие х. РТПХ сопровождало DLI. Среди пациентов с продолжающейся ремиссией доля пациентов с х. РТПХ составила 57 % (4 из 7), среди пациентов с рецидивом — 0 % (0 из 5), $p = 0{,}08$.

Рецидивы. Гематологический рецидив развился у 5 пациентов. Медиана развития рецидива ЮММЛ составила 49 (46–116) дней от даты 1-й трансплантации. Безрецидивная выживаемость (БРВ) составила 66 ± 12 % (рис. 2). Три пациента в качестве терапии рецидива получили ТГСК от исходного (1 больной) или альтернативного (2 больных) донора. Два пациента получали ХТ и иммунотерапию (DLI и интерлейкин-2). Все рецидивировавшие пациенты умерли от прогрессии заболевания.

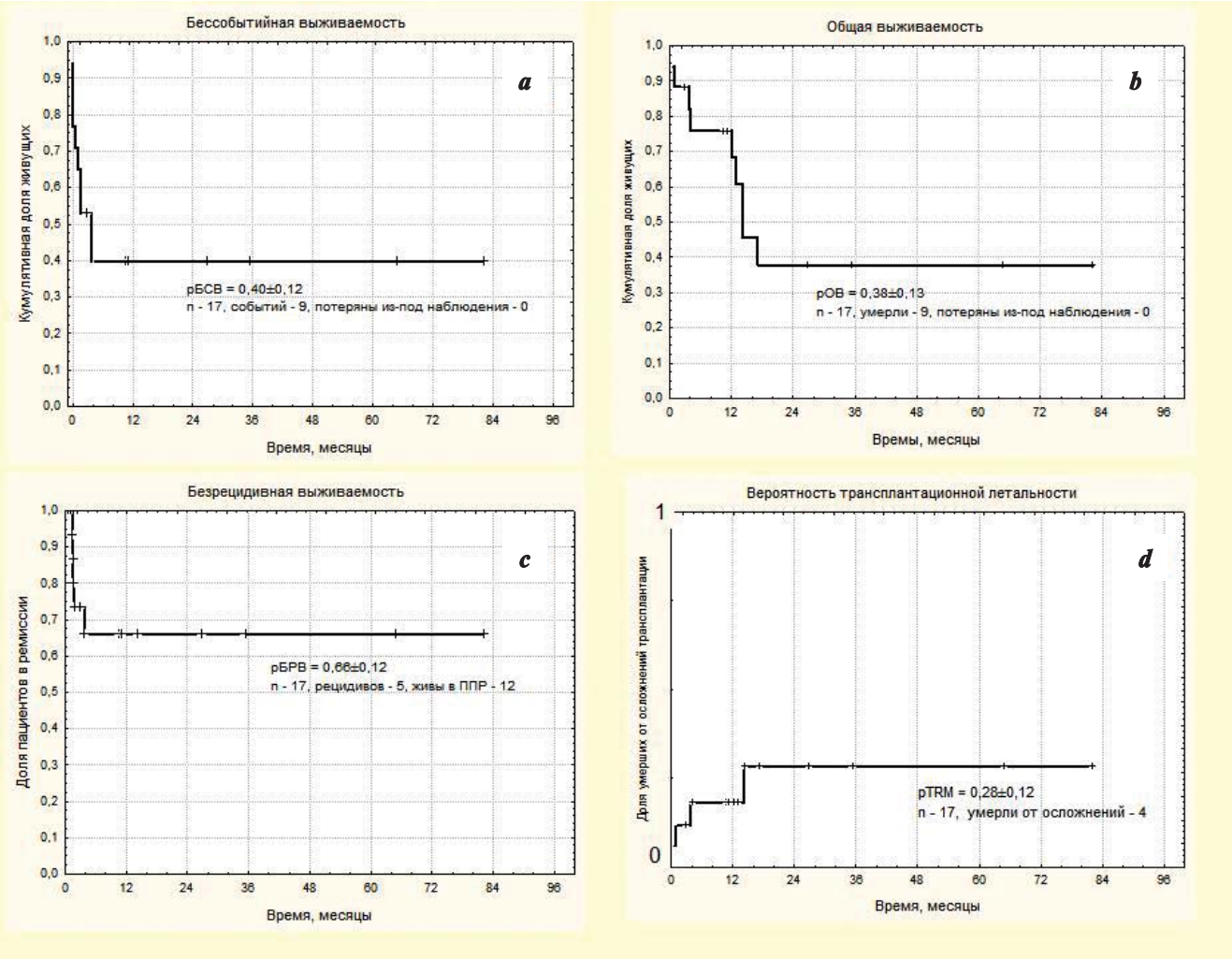


Рис. 2. *Выживаемость после рецидива*

Вторая трансплантация. Шести пациентам была выполнена 2-я трансплантация. Четырем пациентам в связи с первичным неприживлением, 2 пациентам в связи с рецидивом лейкоза. В 2 случаях трансплантация выполнена от исходного донора. В 4 случаях от альтернативного донора (2 — MUD, 2 — MMRD). В 5 случаях проведено миелоаблативное кондиционирование. Приживление достигнуто у 4 пациентов. Четыре из 6 пациентов умерли от прогрессии заболевания, 1 — от поздней (14 месяцев) ЦМВ-инфекции. Один пациент жив на сроке наблюдения 35 месяцев с экстенсивной х. РТПХ.

Выживаемость и структура летальности. На момент анализа данных живы и находятся в полной клинико-гематологической ремиссии 8 пациентов с медианой наблюдения 31 (2,9–82) месяц. Четыре пациента умерли от причин, связанных с трансплантацией (1 — о. РТПХ (день +32), 1 — ЦМВ-инфекция/о. РТПХ (день +118), 1 — ЦМВ-инфекция (день +429), 1 — сепсис/полиорганная недостаточность (день +16)). Трансплантационная смертность составила 28±12%. Пять пациентов умерли от прогрессии основного заболевания. Общая выживаемость (ОВ) составила 38±13%. Бессобытийная выживаемость (БСВ) составила 40±12% (см. рис. 2).

Анализ потенциальных факторов риска. При анализе потенциальных факторов прогноза выживаемости исследованы следующие показатели: возраст на момент ТГСК, возраст на момент начала заболевания, интервал диагноз — ТГСК, исходные лабораторные показатели, предшествующая терапия, статус заболевания на момент трансплантации, кондиционирование, профилактика РТПХ, тип донора, наличие о./х. РТПХ, клеточность трансплантата, генетический вариант ЮММЛ. Статистически достоверно показано неблагоприятное прогностическое значение высокого содержания тромбоцитов и низкого содержания лактатдегидрогеназы (ЛДГ) на момент установления диагноза (см. табл. 4).

Обсуждение и обзор литературы

ОВ в нашем исследовании несколько уступает результатам крупных исследований, в первую очередь за счет высокой трансплантационной смертности. Также обращает внимание высокая

Таблица 4. *Анализ прогностических факторов*

Показатель	pEFS	Log-rank, *p*
Возраст (диагноз), мес		
≤ 18 > 18	0,41 ± 0,17 0,37 ± 0,17	0,94
Возраст (диагноз), мес		
≤ 47 > 47	0,53 ± 0,17 0,25 ± 0,15	0,34
Лейкоциты × 10^9/л, диагноз		
≤ 37,5 > 37,5	0,42 ± 0,17 0,27 ± 0,16	0,59
Моноциты × 10^9/л, диагноз		
≤ 5,9 > 5,9	0,50 ± 0,17 0,37 ± 0,17	0,81
Тромбоциты, × 10^9/л, диагноз		
≤ 56,5 > 56,5	0,64 ± 0,16 0,12 ± 0,11	0,027
Бласты, КМ, %, диагноз		
≤ 4,6 > 4,6	0,50 ± 0,17 0,29 ± 0,16	0,42
ЛДГ, МЕ/л, диагноз		
≤ 365 > 365	0,11 ± 0,10 0,75 ± 0,15	0,016
HbF, %, диагноз		
≤ 15 > 15	0,46 ± 0,18 0,28 ± 0,17	0,51
Статус болезни, ТГСК		
стабильное прогрессия	0,51 ± 0,17 0,25 ± 0,15	0,14
Донор		
MUD\ MSD MMRD\UCB	0,47 ± 0,14 0,20 ± 0,17	0,17
MUD MSD	0,44 ± 0,22 0,40 ± 0,21	0,8
Терапия до ТКМ		
высокодозная низкодозная	0,42 ± 0,14 0,40 ± 0,10	0,62
Интервал диагноз – ТГСК, мес		
≤ 12,2 > 12,2	0,55 ± 0,16 0,18 ± 0,15	0,17
Кондиционирование		
Bu/Mel/Flu другое	0,48 ± 0,16 0,28 ± 0,17	0,37
Профилактика РТПХ		
tacro CsA	0,25 ± 0,20 0,50 ± 0,15	0,45
о. РТПХ		
0–1-й степени 2–4-й степени	0,40 ± 0,21 0,60 ± 0,18	0,56
х. РТПХ		
да нет	0,75 ± 0,21 0,37 ± 0,17	0,27
Генетический дефект		
RAS *PTPN11*	0,53 ± 0,24 0,33 ± 0,19	0,42
Пол		
М Ж	0,44 ± 0,14 0,25 ± 0,21	0,18

частота неприживления, обусловленная, очевидно, характеристиками трансплантата: во всех случаях трансплантат был представлен источниками ГСК, по определению ассоциированными с большим риском неприживления: СВ (2 пациента), либо Т-деплетированными ПК от MMRD (2 пациента), кроме того, в двух случаях имела место недостаточная клеточность трансплантата. Основной причиной неудач, как и во всех опубликованных работах, остаются рецидивы ЮММЛ.

Анализ литературы, посвященной проблеме ТГСК при ЮММЛ, показывает ситуацию, характерную для многих редких болезней: существенная доля актуальной информации получена в результате небольших ретроспективных исследований и описания клинических случаев. В этой связи многие позиции получают лишь косвенное обоснование и, в ряде случаев, не имеют шансов на получение доказательств высокой степени достоверности. Результаты наиболее значимых исследований суммированы в табл. 5 [6, 8–17].

Первая успешная трансплантация КМ пациенту с ЮММЛ была выполнена в 1976 г. в Сиэтле. В 1988 г. опубликованы результаты первого группового наблюдения, которые в значительной мере определили круг проблем на 10-летие вперед [7, 15]. Наиболее значительный результат первых опытов — доказательство принципиальной возможности излечения ЮММЛ и утверждение ТГСК как единственного эффективного метода терапии. Эти положения остаются неизменными и сегодня. Предтрансплантационная подготовка была основана на тотальном терапевтическом облучении (ТТО), профилактика РТПХ — на применении Mtx или комбинации CsA и короткого курса Mtx. Основными причинами неудач стали рецидивы заболевания и смерть от инфекционных и неинфекционных поражений легких. Успех трансплантации оказался возможен как при использовании MSD, так и при пересадке от MMRD. В отдаленной перспективе у пациентов, находящихся в длительной ремиссии, отмечено развитие катаракт и задержка роста как осложнения ТТО.

В ретроспективных исследованиях P. Lutz, J. Donadieu, F. Locatelli, N. Bunin был подтвержден терапевтический потенциал трансплантации, показана возможность успешной трансплантации от MUD, высокий риск рецидива заболевания после трансплантации и неудач при ТГСК от MMRD [8–10, 12]. Практические аспекты трансплантации при ЮММЛ традиционно включают такие вопросы, как выбор режима кондиционирования, выбор донора и источника ГСК, оптимальный срок выполнения трансплантации, роль предтрансплантационной ХТ и спленэктомии, тактика посттрансплантационного мониторинга и терапии рецидивов заболевания.

Таблица 5. *ТГСК при ЮММЛ: обзор публикаций*

Исследование	*n*	Кондиционирование[1]	Донор[2]			EFS[3], %	TRM[4], %	Рецидивы, %	Заключение
			MSD	MUD	MMRD				
Sanders, 1988	14	ТТО – 14	6	–	8	33	28	21	Установлен терапевтический потенциал ТГСК от MSD и MMRD. Поздние осложнения ТТО
Lutz, 1996	18	ТТО – 12, Bu – 6	?	?	?	61	?	?	ТГСК от MUD эффективны
Donadieu, 1994	12	ТТО – 6, Bu – 6	6	1	5	42	8	50	ТГСК от MMRD – высокий риск неудачи
Locatelli, 1997	43	ТТО – 22, Bu – 21	25	14	4	31 MSD – 38 MUD/MMRD – 22	20 9 46	51	ТГСК от MSD – метод выбора. MUD/MMRD – ↑риск TRM. Bu имеет преимущество в сравнении с ТТО в группе MSD
Bunin, 1999	12	ТТО – 11, Bu – 1	–	9	3	64	16	16	ТГСК от MUD с Т-деплецией эффективна. ТТО обеспечивает иммуносупрессию
Matthes-Martin, 2000	11	ТТО – 5, Bu – 6	4	6	1	54	36	9	Трансплантация от альтернативных доноров сопряжена с высоким риском TRM
Manabe, 2002	27	ТТО – 18, Bu – 9	12	10	4	54	11	26	Дети до 1 года – EFS = 100 %. Нет различий между MSD и альтернативными донорами. Цитогенетические аномалии – фактор неблагоприятного прогноза
Yusuf, 2004	32	?	?	?	?	33	?	39	Данные пациентов с ЮММЛ анализируются в массиве данных пациентов с МДС (*n* = 94)
Korthof, 2005	23	ТТО – 14, Bu – 9	11	9	3	48	21	34	Интенсивная предтрансплантационная ХТ и Т-деплеция – факторы неблагоприятного прогноза
Locatelli, 2005	100	Bu/Mel/Cy – 100	48	52	–	52	13	35	Результаты ТГСК от MUD практически идентичны MSD. Женский пол и возраст < 4 лет – факторы неблагоприятного прогноза
Yabe, 2008	10	Bu/Mel/Flu – 10	3	6 (CB – 3)	1	70	–	30	Bu/Mel/Flu достаточно для приживления неродственной ПК
Масчан, 2010	17	Bu/Mel/Flu – 8, Bu/Mel/Cy – 4, Treo/Mel/Flu – 2	5	8 (CB – 2)	4	40	28	29	

[1] *ТТО – тотальное терапевтическое облучение, Treo – треосульфан, Mel – мелфалан, Flu – флударабин, Bu – бусульфан, Thymo – тимоглобулин, Cy – циклофосфамид;*
[2] *MSD – совместимый сиблинг, MUD – неродственный совместимый донор, MMRD – родственный частично совместимый донор;*
[3] *EFS – бессобытийная выживаемость;*
[4] *TRM – смертность, ассоциированная с процедурой трансплантации (Treatment-related mortality).*

Режим кондиционирования

Исторически предтрансплантационная миелоаблация и иммуносупрессия при ЮММЛ были основаны на применении ТТО в дозе 12 Гр в комбинации с циклофосфамидом. Несмотря на адекватное решение проблемы приживления и, у части пациентов, долгосрочного контроля опухоли, поздние осложнения лучевой терапии, такие как задержка роста, эндокринопатии, катаракты и вторичные опухоли, особенно выраженные у детей раннего возраста, обусловили необходимость применения альтернативных режимов кондиционирования [15]. В большинстве центров в 90-х годах XX в. ТТО-содержащие режимы применяли наравне с режимами, основанными на Bu/Cy в комбинации с препаратами, используемыми в терапии острого миелобластного лейкоза, такими как этопозид и цитозин-арабинозид. Ретроспективный анализ F. Locatelli et al. показал существенное преимущество химиотерапевтических режимов в сравнении с ТТО при трансплантации от родственных доноров, в первую очередь в отношении риска развития рецидивов [8]. В наиболее крупном современном мультицентровом исследовании EWOG-MDS, включавшем 100 пациентов, использовался режим Bu — 16–20 мг/кг, Mel — 140 мг/м^2, Cy — 120 мг/кг. Результаты этого исследования с показателем OB=52% и TRM=13% позволяют считать данный режим стандартом кондиционирования при ЮММЛ [6]. Заслуживает внимания опыт применения флударабина в качестве основного иммуносупрессивного компонента: в исследовании M. Yabe применялся режим Bu/Mel/Flu, общая выживаемость составила 70% при фактическом отсутствии TRM [16]. Традиционно при ЮММЛ клиницисты делают ставку на максимально интенсивное кондиционирование, мотивируя данную тактику необходимостью эрадикации примитивных лейкемических стволовых клеток. Принципиальные контраргументы базируются на сохранении высокой частоты рецидивов при используемых в настоящее время высокоинтенсивных подходах и данных о возможной роли реакции «трансплантат против лейкемии» (РТПЛ) в контроле заболевания после трансплантации [18–20]. Тестирование режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью — вопрос будущих исследований, и в настоящее время применение субмиелоаблативного кондиционирования должно быть оправдано либо условиями клинического исследования, либо особенностями соматического статуса пациента.

В настоящем исследовании все пациенты получили миелоаблативное кондиционирование на базе бусульфана (14 пациентов) или треосульфана (2 пациента). Анализ влияния кондиционирования на результаты терапии не выявил значимых различий, что может быть обусловлено ограниченным объемом выборки. Следует лишь отметить, что непосредственная висцеральная токсичность кондиционирования была умеренной и явилась причиной смерти у 1 пациента.

Выбор трансплантата

Традиционно стандартом ТГСК при ЮММЛ является трансплантация от MSD. Первый опыт использования MUD был сопряжен с высокой смертностью от осложнений, однако в эпоху молекулярного HLA-типирования высокого разрешения общие результаты трансплантаций от родственных и неродственных совместимых доноров фактически сравнялись [6]. Более высокая смертность, ассоциированная с трансплантацией, сопровождается меньшей частотой рецидивов при трансплантациях от MUD. В нашей работе, ввиду малого числа наблюдений, статистически достоверно подтвердить эти положения невозможно, однако при качественном анализе видно, что доля рецидивов в группе MSD выше, а все смерти от токсичности произошли в группах MUD и MMRD. Неразрешенным вопросом остается целесообразность использования MMRD с Т-деплецией и UCB. Общее число опубликованных наблюдений в мире не позволяет делать окончательные выводы о приемлемости данных источников стволовых кроветворных клеток для ТГСК при ЮММЛ. Наш опыт указывает на более высокий риск неприживления трансплантата и рецидива ЮММЛ, однако мы полагаем, что до появления результатов клинических исследований использование альтернативных источников допустимо в соответствии с клинической ситуацией.

Показания к трансплантации и тайминг

Подавляющее большинство исследователей согласно с положением, что ЮММЛ является абсолютным показанием к аллогенной ТГСК. Несмотря на консенсус, необходимо принимать во внимание тот факт, что в силу биологической гетерогенности заболевания существует небольшая доля пациентов с относительно благоприятным среднесрочным прогнозом. Это пациенты первого года жизни с низким содержанием фетального гемоглобина. В этой группе амбулаторная терапия низкими дозами цитарабина в комбинации с изотретиноином позволяет достигать длительных клинико-гематологических ремиссий с хорошим качеством жизни [21]. Для таких пациентов решение о выполнении трансплантации от MUD/MMRD, ассоциированное с 10–20% риском смерти от осложнений, является непростым для врача и семьи пациента. Необходимость трансплантации поддерживается нашим наблюдением случая развития острого лимфобластного лейкоза у пациента через 8 лет после «излечения» от ЮММЛ [22].

В ряде работ указывалось, что интервал до выполнения трансплантации служит неблагоприятным прогностическим фактором, однако в более крупных исследованиях это положение подтверждено не

было. В нашем исследовании различия в исходе лечения в зависимости от срока выполнения трансплантации также не были выявлены.

Предтрансплантационная ХТ

Исторически большинство пациентов с ЮММЛ до выполнения трансплантации получали ХТ согласно программам лечения острых миелобластных лейкозов. С конца 1980-х годов известно, что интенсивная ХТ позволяет добиться клинико-гематологической ремиссии у части пациентов и продляет жизнь [5]. Известно также, что излечение ЮММЛ с помощью стандартной ХТ невозможно. В настоящее время большинство трансплантационных центров в Европе и Японии отказалось от проведения предтрансплантационной высокодозной терапии на основании данных, указывающих на отсутствие влияния (либо негативное влияние) такой терапии на результаты трансплантации [6, 11]. Результаты крупного североамериканского исследования, в котором пациенты получали терапию ингибитором фарнезилтрансферазы (типифарниб) и 2 курса FLAM перед трансплантацией, опубликованы не были, несмотря на завершение набора пациентов в 2005 г. Следует подчеркнуть, что проблема роли предтрансплантационной ХТ никогда не была (и, вероятно, не будет) исследована проспективно и выводы, сделанные на основании неконтролируемых исследований, следует воспринимать с осторожностью. Мы полагаем, что рутинное применение высокодозной ХТ нецелесообразно, однако считаем, что при неконтролируемой миелопролиферации такая терапия может стать единственной возможностью обеспечить дожитие пациента до трансплантации и должна быть зарезервирована для таких клинических ситуаций.

Спленэктомия до ТГСК

Удаление или облучение селезенки до ТГСК постулированы как дополнительные методы уменьшения массы опухоли перед трансплантацией [12]. Риски спленэктомии у детей раннего возраста известны и складываются из незначительного операционного риска и продленного (пожизненного?) риска фульминантного постспленэктомического сепсиса. В единственном проспективном исследовании позитивная роль спленэктомии при ЮММЛ не была подтверждена [6]. С этими выводами согласуются и наши результаты. Спленэктомия остается клинической опцией для пациентов с массивной спленомегалией и рефрактерностью к гемотрансфузиям, обусловленной гиперспленизмом.

Мониторинг химеризма и тактика посттрансплантационной иммуноинтервенции

Основной проблемой трансплантации при ЮММЛ остается высокая частота рецидивов, которые, как правило, развиваются на ранних сроках после пересадки. В нашем исследовании медиана срока рецидива составила менее 2 месяцев. Логичным шагом представляется попытка раннего выявления рецидива на основании мониторинга гемопоэтического химеризма или минимальной резидуальной болезни (МРБ) и вмешательство в виде редукции/отмены иммуносупрессии или инфузии донорских лимфоцитов. Технически контроль химеризма при ЮММЛ не отличается от аналогичных методов при других гемобластозах. Анализ химеризма в компартменте гемопоэтических предшественников может увеличивать чувствительность метода, однако практическая польза этого усовершенствования не доказана. Контроль МРБ может осуществляться при помощи детекции мутантных аллелей *PTPN11* и *RAS* [23]. Опыт терапевтического вмешательства на основании химеризма/МРБ при ЮММЛ незначителен, а опубликованных данных практически нет.

В нашей работе была показана принципиальная возможность сохранения ремиссии у пациента после отмены иммуносупрессивной терапии и проведения DLI в момент детекции смешанного химеризма в $CD34^+$ клетках. В 3 случаях отмена иммуносупрессивной терапии и инфузии донорских лимфоцитов была неэффективна. Очевидно, что эффект РТПЛ в отношении ЮММЛ не является столь же надежным инструментом, как при хроническом миелолейкозе.

Терапия рецидивов и 2-я трансплантация

Как и при других гемобластозах, терапия рецидивов ЮММЛ после трансплантации является трудноразрешимой задачей. Единичные случаи успешной терапии альфа-интерфероном, DLI, иными иммунологическими вмешательствами являются скорее анекдотом, чем руководством к действию [19, 20, 24]. В целом, единственным реальным шансом на излечение остается 2-я трансплантация, выполнение которой не только возможно технически, но и, согласно ряду публикаций, абсолютно целесообразно. БСВ после 2-й трансплантации, выполненной по поводу рецидива, составляет до 32 %, что сопоставимо с результатами первой трансплантации [25, 26].

Прогностические факторы

Наше знание о прогностических факторах при ЮММЛ ограничено малым числом пациентов, включенных в проспективные исследования, и фрагментарными представлениями о биологии заболевания. В исследовании F. Locatelli в мультивариантном анализе неблагоприятное прогностическое значение сохранили только женский пол и возраст > 4 лет [6]. Выявленная в нашем исследовании парадоксальная ассоциация низкого уровня тромбоцитов и высокого уровня ЛДГ на этапе установления диагноза с лучшей БСВ не имеет, на наш взгляд, очевидного биологического объяснения и требует проверки. В перспективе расшифровка молекулярных механизмов

патогенеза ЮММЛ позволит точнее классифицировать пациентов и определять прогноз заболевания. Так, в исследовании S. Bresolin et al. показано, что генетический экспрессионный профиль коррелирует с исходом трансплантации при ЮММЛ точнее, чем любой из существующих клинических и лабораторных показателей [27].

Заключение

Современная тактика ведения пациентов с ЮММЛ включает аллогенную ТГСК как основной терапевтический элемент. Тактика предтрансплантационной терапии определяется индивидуально в зависимости от агрессивности миелопролиферации и организационных аспектов. Технически в выборе кондиционирования сохраняется установка на использование миелоаблативных доз бусульфана и его аналогов. При выборе донора предпочтение отдается родственным и неродственным совместимым донорам. Принимая во внимание неудовлетворительные, в целом, результаты ТГСК при ЮММЛ, представляется необходимым и оправданным включение всех пациентов с ЮММЛ в исследования II–III фазы с использованием инновационных медикаментозных и иммунотерапевтических подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. de Vries A.C., Zwaan C.M., van den Heuvel-Eibrink M.M. Molecular basis of juvenile myelomonocytic leukemia. Haematologica 2010;95(2):179–82.
2. Loh M.L. Childhood myelodysplastic syndrome: focus on the approach to diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010;2010:357–62.
3. Arico M., Biondi A., Pui C.H. Juvenile myelomonocytic leukemia. Blood 1997;90(2):479–88.
4. McCallister J.A., Baehner R.L. Juvenile chronic granulocytic leukemia and the rationale and indications for bone marrow transplantation in leukemia. Pediatrics 1979;63(1):165–6.
5. Chan H.S., Estrov Z., Weitzman S.S. et al. The value of intensive combination chemotherapy for juvenile chronic myelogenous leukemia. J Clin Oncol 1987;5(12):1960–7.
6. Locatelli F., Nollke P., Zecca M. et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. Blood 2005;105(1):410–9.
7. Sanders J.E., Buckner C.D., Stewart P. et al. Successful treatment of juvenile chronic granulocytic leukemia with marrow transplantation. Pediatrics 1979;63(1):44–6.
8. Locatelli F., Niemeyer C., Angelucci E. et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a report from the European Working Group on Myelodysplastic Syndrome in Childhood. J Clin Oncol 1997;15(2):566–73.
9. Bunin N., Saunders F., Leahey A. et al. Alternative donor bone marrow transplantation for children with juvenile myelomonocytic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 1999;21(6):479–85.
10. Donadieu J., Stephan J.L., Blanche S. et al. Treatment of juvenile chronic myelomonocytic leukemia by allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1994;13(6):777–82.
11. Korthof E.T., Snijder P.P., de Graaff A.A. et al. Allogeneic bone marrow transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: a single center experience of 23 patients. Bone Marrow Transplant 2005:35(5):455–61.
12. Lutz P., Zix-Kieffer I., Souillet G. et al. Juvenile myelomonocytic leukemia: analyses of treatment results in the EORTC Children's Leukemia Cooperative Group (CLCG). Bone Marrow Transplant 1996;18(6):1111–6.
13. Manabe A., Okamura J., Yumura-Yagi K. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. Leukemia 2002;16(4):645–9.
14. Matthes-Martin S., Mann G., Peters C. et al. Allogeneic bone marrow transplantation for juvenile myelomonocytic leukaemia: a single centre experience and review of the literature. Bone Marrow Transplant 2000;26(4):377–82.
15. Sanders J.E., Buckner C.D., Thomas E.D. et al. Allogeneic marrow transplantation for children with juvenile chronic myelogenous leukemia. Blood 1988;71(4):1144–6.
16. Yabe M., Sako M., Yabe H. et al. A conditioning regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan for allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia, Pediatr Transplant 2008;12(8):862–7.
17. Yusuf U., Frangoul H.A., Gooley T.A. et al. Allogeneic bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndrome or juvenile myelomonocytic leukemia: the Seattle experience. Bone Marrow Transplant 2004;33(8):805–14.
18. Tanoshima R., Goto H., Yanagimachi M. et al. Graft versus leukemia effect against juvenile myelomonocytic leukemia after unrelated cord blood transplantation. Pediatr Blood Cancer 2008;50(3):665–7.
19. Worth A., Rao K., Webb D. et al. Successful treatment of juvenile myelomonocytic leukemia relapsing after stem cell transplantation using donor lymphocyte infusion. Blood 2003;101(5):1713–4.
20. Yoshimi A., Bader P., Matthes-Martin S. et al. Donor leukocyte infusion after hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. Leukemia 2005;19(6):971–7.
21. Хачатрян Л.А, Масчан М.А., Самочатова Е.В. и соавт. Дифференцировочная терапия с использованием 13-цис-ретиноевой кислоты и низких доз цитозин-арабинозида у детей с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом. Онкогематол 2008;1–2:34–8.
22. Maschan A.A., Khachatrian L.A., Solopova G.G. et al. Development of T-cell acute lymphoblastic leukemia in a patient in very long lasting complete remission of juvenile myelomonocytic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 2011;33(1):32–4.
23. Matsuda K., Sakashita K., Taira C. et al. Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol 2010;148(4):593–9.
24. Stachel D.K., Leipold A., Kuhlen M. et al. Simultaneous control of third-degree graft-versus-host disease and prevention of recurrence of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) with 6-mercaptopurine following fulminant JMML relapse early after KIR-mismatched bone marrow transplantation. J Pediatr Hematol Oncol 2005;27(12):672–4.
25. Yoshimi A., Mohamed M., Bierings M. et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) results in outcome similar to that of first HSCT for patients with juvenile myelomonocytic leukemia. Leukemia 2007;21(3):556–60.
26. Chang Y.H., Jou S.T., Lin D.T. et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: case report and literature review. J Pediatr Hematol Oncol 2004;26(3):190–3.
27. Bresolin S., Zecca M., Flotho C. et al. Gene expression-based classification as an independent predictor of clinical outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. J Clin Oncol 2010;28(11):1919–27.

Лечение больных с резистентной иммунной тромбоцитопенией: обзор литературы и клинические наблюдения

В.В. Птушкин[1], С.В. Миненко[1], Э.Р. Биячуев[1], А.В. Пшонкин[1], А.В. Шубина[2]
[1]ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва;
[2]ГКБ им С.П. Боткина, Москва

Контакты: *Вадим Вадимович Птушкин vadimvadim@inbox.ru*

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) — редкое хроническое аутоиммунное заболевание, сопровождающееся изолированным снижением содержания тромбоцитов крови с пропорциональным повышением риска кровотечений. Стандартные методы лечения (кортикостероиды, иммуноглобулины и спленэктомия) эффективны у 70–90 % пациентов, однако у 10 % больных уровень тромбоцитов не повышается. Новая группа препаратов — стимуляторов рецепторов ТПО способна помочь этим больным. В ряде исследований показана их высокая эффективность при хронической ИТП, однако опыт их применения для подготовки к проведению оперативных вмешательств ограничен.

В статье представлены 3 случая эффективного использования ромиплостима у пациентов с хронической резистентной ИТП перед операцией (включая 2 спленэктомии и 1 резекцию опухоли носа). Первая пациентка 19 лет в течение года получала множественные курсы стероидов, иммуноглобулинов, ритуксимаба без эффекта: тромбоциты — 7–15×10^9/л, макрогематурия, стероидные некрозы большеберцовых костей. Было решено провести спленэктомию. В связи с риском геморрагических осложнений больная получала ромиплостим в конечной дозе 3 мкг/кг в течение 4 недель. При достижении уровня тромбоцитов 240×10^9/л проведена спленэктомия. Послеоперационный уровень тромбоцитов составил 1200×10^9/л, через 3 недели — 400×10^9/л. Вторая пациентка 64 лет с 3-летним анамнезом ИТП поступила в клинику для плановой спленэктомии, однако низкое содержание тромбоцитов в крови (5–7×10^9/л) и геморрагический синдром с постоянной потребностью в трансфузиях тромбоконцентрата несмотря на высокие дозы стероидов и иммуноглобулина препятствовали безопасному проведению операции. Получала ромиплостим с повышением дозы в течение 6 недель (максимально 10 мкг/кг). При уровне тромбоцитов 148×10^9/л выполнена спленэктомия. После операции уровень тромбоцитов составил 380×10^9/л, через 3 недели — 120×10^9/л. Третий пациент 22 лет с 15-летним анамнезом ИТП поступил в клинику с массивным носовым кровотечением. При обследовании выявлена опухоль носа. Получал в/в иммуноглобулины и стероиды, и при показателе тромбоцитов 50×10^9/л была попытка биопсии с повторным массивным кровотечением. Перед повторной операцией больной получал ромиплостим в дозе 1 мкг/кг, при повышении тромбоцитов до 250×10^9/л после 2 введений препарата проведено удаление опухоли. Побочных действий ромиплостима не отмечено, тромботических осложнений в послеоперационном периоде не было. Представленные данные вместе с аналогичными описаниями случаев успешного оперативного вмешательства при использовании стимуляторов ТПО позволяют рассматривать назначение ромиплостима как эффективный метод разрешения тромбоцитопении при проведении плановых хирургических вмешательств у больных ИТП.

Ключевые слова: *иммунная тромбоцитопения, ИТП, стимуляторы рецепторов тромбопоэтина*

Treatment of patients with refractory immune thrombocytopenia: literature review and case report

V.V. Ptushkin[1], S.V. Minenko[1], E.R. Biyachuev[1], A.V. Pshonkin[1], A.V. Shubina[2]
[1]Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;
[2]Botkin Municipal Clinical Hospital, Moscow

ITP is a rare chronic autoimmune disease with isolated platelets decrease and high risk of bleeding complications. Standard treatment (steroids, HD of immunoglobulin and splenectomy) are effective in 70–90 % of patients, but in 10 % of them platelet count is not increased. A new group of drugs — TPO receptor agonists — is able to help to these patients. Their high efficacy in chronic ITP has shown in several studies, but the experience of their application before surgery is limited.

We used romiplostim in 3 patients with chronic refractory ITP before surgery (2 — splenectomy and 1 — resection of nasal tumor). The first patient, 19 years old, received multiple steroids, immunoglobulins and rituximab courses without effect during the last year. Platelets count was 7–15×10^9/l and hematuria and steroid tibia necrosis were revealed. Splenectomy was decided to be done. Because of the risk of hemorrhagic complications patients received romiplostim (3 mkg/kg) during 4 weeks. Upon reaching platelet counts 240×10^9/l splenectomy was performed. A postoperative platelet count was 1200×10^9/l, 3 weeks later — 400×10^9/l. The second patient, 64 years old, with a 3-year ITP history was admitted to the hospital for splenectomy, but the platelet count (5.7×10^9/l) and a hemorrhagic syndrome with a constant need for platelet transfusions despite high doses of steroids and immunoglobulin received, interfere with the safety of operations. Romiplostim was administered in increasing doses during 6 weeks to a maximum 10 mg/kg. Platelet count was 148×10^9/l and splenectomy

was performed. Postoperative platelet count was 380 × 10⁹/l, 3 weeks later — 120 × 10⁹/l. The third patient, 22 years old, with a 15-year ITP history admitted with severe epistaxis. Nasal tumor was revealed. Patient was treated with immunoglobulins and steroids, and biopsy was attempt when platelet count increased to 50 × 10⁹/l. This procedure ended with severe bleeding. Patient received 1 mg/kg of romiplostim and a week later platelet count was 250 × 10⁹/l. Successfully tumor resection was done. No romiplostim side effects or thrombotic complications during postoperative period were found.

The obtained data together with similar case reports of successful surgery after TPO-agonists administration allow considering romiplostim as an effective method of thrombocytopenia therapy before surgery in ITP patients.

Key words: *immune thrombocytopenia, ITP, TPO receptors agonists*

Первичная иммунная тромбоцитопения (идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура — ИТП) — это приобретенное иммунологическое заболевание, характеризующееся изолированным снижением содержания кровяных пластинок < 100 × 10⁹/л при отсутствии иных определяемых причин, способных вызвать это состояние [1]. Длительное время основным механизмом снижения содержания тромбоцитов при ИТП было принято считать их повышенное разрушение аутоантителами. Позднее стало известно, что к этим механизмам следует добавить также Т-клеточные механизмы их разрушения [2] и нарушение продукции кровяных пластинок в костном мозге [3].

Лечение персистирующей и хронической ИТП

Начальное лечение при ИТП (глюкокортикоиды, иммуноглобулины) бывает успешным у 80–90 % больных. Тем не менее, до 10 % пациентов не повышают уровень тромбоцитов, и более чем у половины развивается рецидив в течение нескольких месяцев или лет от начальной терапии. Обычно при рецидиве повторно вводят препараты 1-й линии, и вопрос о необходимости проведения альтернативной терапии ставится в тех случаях, когда начальное лечение или лечение рецидива оказались не эффективными. Выбор терапии 2-й линии представляет определенные сложности из-за токсичности и высокой стоимости ряда препаратов резерва. В настоящее время, согласно рекомендациям Международного консенсуса, решение о начале и выборе терапии 2-й линии для каждого отдельного пациента должно учитывать индивидуальные показания и противопоказания. Главной целью служит достижение минимального содержания тромбоцитов, достаточного для предупреждения геморрагических осложнений. Эта величина зависит от характера активности больного, его возраста и индивидуальных особенностей гемостаза. В тех случаях, когда уровень тромбоцитов превышает 50 × 10⁹/л, отсутствует геморрагический синдром, пациент не занимается травмоопасным видом деятельности и ему не планируется оперативное вмешательство, следует ограничиться динамическим наблюдением.

При сокращении количества тромбоцитов < 20–30 × 10⁹/л, их повышение до безопасного уровня может быть достигнуто путем длительной поддерживающей терапии низкими дозами кортикостероидов (5–10 мг преднизолона). Однако в 30 % случаев хронической ИТП кортикостероиды оказываются не эффективными или есть противопоказания к их применению (сахарный диабет, остеопороз, катаракта, инфекция и т. д.). В этих случаях может быть рассмотрен вопрос о проведении спленэктомии с целью удаления основного плацдарма разрушения тромбоцитов [4].

Спленэктомия. Спленэктомия позволяет быстро и надежно решить проблему тромбоцитопении у большинства пациентов с ИТП. Долговременная эффективность метода по данным анализа K. Kojouri (2004) составляет 66 %, а частота смертельных осложнений при лапароскопическом методе удаления селезенки не превышает 0,2 % [5]. Рецидив заболевания наблюдается в 25–40 % случаев, чаще в первый год после операции. По мнению большинства авторов, у взрослых больных ИТП спленэктомия не должна проводиться ранее 6 месяцев от дебюта ИТП, в связи с тем, что в ряде случаев (6–10 % у взрослых) наблюдается спонтанное восстановление уровня тромбоцитов до нормальных цифр. В ретроспективном анализе, включившем данные опроса специалистов в 6 странах Европы и опубликованном в 2008 г., было показано, что большинство врачей (91 %) считают предпочтительным вариантом 1-й линии терапии ИТП применение кортикостероидов, а 2-й (71 %) — спленэктомию. В то же время 74 % респондентов готовы отложить спленэктомию или отказаться от нее при опасениях больного или наличии противопоказаний [6]. В реальности лишь 6 % от 610 первичных больных по данным этого анализа перенесли спленэктомию. Что же ограничивает более широкое применение данного эффективного и недорогого метода лечения персистирующей или хронической ИТП. В первую очередь это опасение инфекции. Известно, что больные после спленэктомии более подвержены инфекции, вызываемой инкапсулированными микробами (стрептококки, нейссерия, гемофилюс, клебсиелла). Эти патогены после присоединения антител или компонентов комплимента C3b эффективно задерживаются макрофагами селезенки, но при ее отсутствии могут вызывать инфицирование внутренних органов. Общий риск не превышает 5–7 % в течение жизни, однако развивающаяся инфекция, как правило, крайне

агрессивна (менингит, сепсис), и смертность составляет 40–70 % [7]. Единственным путем недопущения инфекции служит иммунизация против инкапсулированных патогенов и антибиотикопрофилактика. Помимо повышения риска инфекции спленэктомия сопровождается увеличением содержания циркулирующих микрочастиц (эритроцитарные, лейкоцитарные), способных активировать свертывание и способствовать прогрессии сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Также отмечено, что после спленэктомии повышается риск легочной гипертензии [9].

Лекарственная терапия 2-й линии. До 30–40 % пациентов после спленэктомии или отказавшиеся от нее вследствие сопутствующих заболеваний имеют содержание тромбоцитов $< 50 \times 10^9$/л. В таких случаях при наличии риска геморрагических осложнений в соответствии с рекомендациями экспертов может быть использован широкий спектр препаратов, относящихся к цитостатикам (циклофосфамид, азатиоприн, винкристин), иммуносупрессорам (ритуксимаб, циклоспорин, микофенолата мофетил, алемтузумаб) или гормонам (даназол) [10–13]. Начальная эффективность этих средств обычно составляет 30–80 %, однако длительное действие достигается существенно реже. В одном из исследований было показано, что смертность взрослых пациентов с ИТП, ответивших на начальную терапию глюкокортикоидами и иммуноглобулинами, принципиально не отличается от популяционной, в то время как необходимость использования препаратов второго ряда увеличивает этот показатель в 4,2 раза [14]. При этом гибель больных от геморрагических осложнений и от осложнений терапии (инфекция, вторичные опухоли) происходит с равной частотой. Недостаточная эффективность и высокая токсичность имеющихся средств подталкивали к поиску новых направлений поддержания безопасного уровня тромбоцитов, в том числе у пациентов после спленэктомии. В качестве одного из таких направлений рассматривалось применение ритуксимаба — химерного моноклонального антитела, которое специфически связывается с антигеном CD20, локализованном на мембране большинства В-лимфоцитов и приводит к разрушению этих клеток с последующим ослаблением многих иммунологических реакций. Ритуксимаб оказался эффективным при лечении некоторых аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка) и в том числе ИТП. Препарат назначается в дозе 100–375 мг/м^2 1 раз в неделю при количестве введений от одного до четырех. Увеличение содержания тромбоцитов крови при назначении ритуксимаба может отмечаться после 1–2 введений, однако у некоторых пациентов действие препарата реализуется только к 6–8-й неделе [15]. Общая эффективность лечения достигает 60 % при частоте полных ремиссий около 40 % [16], однако необходимо учитывать, что практически все данные по ритуксимабу получены вне рамок сравнительных контролируемых исследований. Недавно проведенный ретроспективный анализ долговременной эффективности ритуксимаба показал, что лишь 1 пациент из 5 удерживает ремиссию в течение нескольких лет [17]. В настоящее время проводятся исследования по применению ритуксимаба в режиме поддерживающего лечения. Многие эксперты считают, что, несмотря на хорошую переносимость этого препарата, его долговременную токсичность нельзя считать серьезно исследованной (указания на случаи мультифокальной лейкоэнцефалопатии) [18].

Рекомбинантные тромбопоэтины. Основным цитокином, регулирующим тромбоцитопоэз у человека и животных, является тромбопоэтин. Данный белок, связываясь со специфическим рецептором (ТПО-R), запускает ряд молекулярных событий, определяющих выживание и пролиферацию как предшественников мегакариоцитов, так и стволовых кроветворных клеток [19]. Тромбопоэтин служит основным регуляторным фактором поддержания безопасного уровня тромбоцитов в организме. До последнего времени считалось, что содержание этого белка определяется уровнем тромбоцитопении, однако данная зависимость у пациентов с ИТП может изменяться. Если снижение содержания тромбоцитов крови при апластической анемии сопровождается существенным ростом уровня ТПО, то аналогичная степень тромбоцитопении при ИТП не приводит к сопоставимому росту тромбопоэтина крови [20]. Это может быть связано с особенностями его продукции. В отличие от эритропоэтина и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора продукция основной фракции тромбопоэтина конституциональна [21], т. е. препарат продуцируется в относительно постоянном количестве печенью и утилизируется путем соединения с рецептором на макрофагах и тромбоцитах. При снижении количества тромбоцитов за счет их низкой продукции (апластические состояния) связывание препарата с рецептором сокращается, и его концентрация в крови возрастает. При ИТП продукция тромбоцитов на первом этапе заболевания повышена, но повышено и их разрушение макрофагами вместе с присоединившимся ТПО. Увеличение потребления ТПО при стабильной продукции может приводить к снижению его концентрации и снижению стимуляции мегакариоцитов — фабрики кровяных пластинок. Подобная концепция позволяет предполагать возможное позитивное действие назначения экзогенного ТПО у пациентов с хронической резистентной ИТП. В то же время создание искусственного агониста рецепторов к тромбопоэтину встретило немало трудностей. Ген ТПО был выделен и клонирован в 1994 г. и его продукт — белок был получен в рекомбинантной форме [22, 23]. Этот препарат оказывал биологические эффекты как природный ТПО, однако при его клиническом использовании возникло серьезное осложнение.

Почти у 10% здоровых доноров и 2–4% пациентов, получавших рекомбинантный препарат, стали вырабатываться нейтрализующие антитела как к ТПО, введенному извне, так и к своему собственному белку [24]. Клинически это проявлялось длительными глубокими тромбоцитопениями с высокой потребностью в заместительных трансфузиях тромбоконцентрата, что привело к запрету клинического применения рекомбинантного человеческого ТПО (агонисты рецепторов ТПО I поколения).

Сохранявшаяся потребность в стимуляторах тромбоцитарного звена гемопоэза стимулировала поиск альтернативных по молекулярной структуре агонистов рецепторов ТПО (агонисты II поколения). Условно их можно разделить на 2 группы: альтернативные молекулы, взаимодействующие с внеклеточным участком рецептора, аналогично природному ТПО, и малые молекулы, взаимодействующие с трансмембранным участком рецептора. К 1-й группе относится ромиплостим (AMG531), а ко 2-й — элтромбопаг (SB49711) и AKR-501 (YM 477). Ромиплостим назначается подкожно 1 раз в неделю, а препараты 2-й группы — ежедневно перорально.

Молекула ромиплостима представляет собой сложную структуру, называемую пептителом, включающую 2 Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина IgGl, каждый из которых соединен с двумя ТПО-рецептор-связывающими пептидами [25]. Аминокислотная последовательность ромиплостима абсолютно отлична от аминокислотной последовательности эндогенного ТПО, поэтому перекрестная реакция антител к ромиплостиму с эндогенным ТПО отсутствует. В доклинических и клинических исследованиях было показано, что использование ромиплостима не приводило к развитию тромбоцитопении. Препарат назначается в дозе от 1 до 10 мкг/кг подкожно 1 раз в неделю. Начальная доза составляет 1 мкг/кг, она увеличивается еженедельно на 1 мкг/кг до достижения количества тромбоцитов > 50×10^9/л. Количество тромбоцитов следует оценивать еженедельно до тех пор, пока не будет достигнут стабильный показатель (≥ 50×10^9/л по крайней мере в течение 4 недель без коррекции дозы препарата). В дальнейшем следует оценивать количество тромбоцитов ежемесячно. Не следует превышать максимальную еженедельную дозу 10 мкг/кг. Элтромбопаг (революйд) — непептидный стимулятор рецептора ТПО, связывается с трансмембранной частью рецептора, что сопровождается индукцией пролиферации и дифференцировки предшественников мегакариоцитов в костном мозге. Элтромбопаг назначается ежедневно перорально в дозе 50 мг в сутки. При недостаточном эффекте (тромбоциты < 50×10^9/л) доза может быть увеличена до 75 мг в сутки [26].

В двух параллельных плацебо-контролируемых рандомизированных исследованиях III фазы тромбопоэтин (ромиплостим) использовали у 63 пациентов с резистентной ИТП после спленэктомии и у 62 пациентов без спленэктомии. Эффективной терапия считалась при повышении уровня тромбоцитов > 50 тыс. × 10^9/л длительностью не менее 4 недель. Терапия ТПО оказалась эффективной у 79% и 88% пациентов соответственно [27]. В группе плацебо у всех пациентов после спленэктомии тромбоцитопения сохранялась. В группе пациентов, не подвергавшихся спленэктомии повышение уровня тромбоцитов было отмечено только у 14% больных, получавших плацебо. Сопоставимые данные были получены и в исследованиях с элтромбопагом, при меньшей длительности наблюдений [28].

Переносимость тромбопоэтинов в цитируемых работах была удовлетворительной, не отмечено каких-либо серьезных побочных действий за исключением редкого развития ретикулинового фиброза костного мозга. Данное осложнение не сопровождалось нарушением гемопоэтической функции костного мозга и имело тенденцию к обратному развитию после отмены агонистов рецептора ТПО [29]. Если препараты ТПО первой генерации были способны усиливать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, то для ромиплостима и элтромбопага подобного действия *in vitro* не выявлено [30]. В контролируемых клинических исследованиях у пациентов с ИТП частота тромботических осложнений в группе плацебо и ромиплостима была сопоставимой (2,4%). Для революйда описано несколько случаев развития или прогрессирования катаракты, а также транзиторное повышение уровня печеночных ферментов и непрямого билирубина [28].

Наиболее крупное и хорошо прослеженное с точки зрения долговременной эффективности и токсичности исследование эффективности агонистов рецепторов ТПО включило 234 пациента с диагнозом ИТП [31]. После рандомизации 2:1 157 пациентов получали ромиплостим, а остальные 77 — терапию 2-й линии на усмотрение исследователей. Период наблюдения составил 52 недели. Основными изучаемыми критериями были частота неэффективности (содержание тромбоцитов < 20×10^9/л на протяжении 4 недель при максимальной дозе ромиплостима) и частота спленэктомий. Также сравнивалось время от начала исследования до проведения спленэктомии, частота тромбоцитарного ответа и качество жизни, определяемое по специальному опроснику для пациентов с ИТП (ITP-PAQ). Опросник включал 44 пункта в 10 шкалах, затрагивающих различные аспекты качества жизни, изменяющиеся при данном заболевании. По основным показателям (пол, возраст, предшествующая длительность заболевания и характер начальной терапии) сравниваемые группы были эквивалентны. Частота тромбоцитарного ответа (содержание тромбоцитов > 50×10^9/л в течение всего времени наблюдения) оказалась в 2,3 раза выше в группе ромиплостима (95% конфиденциаль-

ный интервал, 2,0–2,6; $p<0,001$). По основным изучаемым критериям ромиплостим также показал существенное преимущество. Так, частота неудач лечения (11% против 30%) и частота спленэктомий (9% против 36%) оказались существенно ниже в группе стимулятора рецепторов к ТПО. Кроме того, необходимость назначения терапии резерва (азатиоприн — 1% против 9%, ритуксимаб — 1% против 20%, даназол — 2% против 9%) у этих пациентов возникала в несколько раз реже. Потребность в глюкокортикоидных гормонах дополнительно к основной терапии — 37% против 63% и иммуноглобулинах — 7% против 33% была ниже у пациентов, принимавших ромиплостим. При существенно более высокой эффективности применение ромиплостима сопровождалось меньшим числом серьезных осложнений (23% и 37% соответственно). Пациенты, применявшие ромиплостим, имели существенно меньшую общую частоту кровотечений ($p=0,001$) и частоту тяжелых кровотечений (3-я степень тяжести и выше $p=0,02$). Тромботические осложнения имели место у 4% больных в группе ромиплостима и у 3% — в группе сравнения. Гематологические новообразования развились у 2 пациентов (3%) в группе контроля (МДС и лимфома) и не были отмечены в группе стимулятора тромбопоэтина. Контроль состояния костного мозга, осуществляемый путем мониторинга формирования ретикулина в трепанобиоптатах, показал, что только у 1 пациента из 152, исходно не имевшего отложений ретикулина, отмечено его появление. При этом отложения ретикулина не носили патологического характера. К моменту начала исследования показатели качества жизни между группами принципиально не различались, однако в процессе лечения отмечено их улучшение у больных, получавших ромиплостим. По большинству из исследуемых параметров (общие симптомы, физическая активность, социальная активность, чувство страха, общее качество жизни) выявлено значимое преимущество в группе больных, получавших стимулятор рецепторов к ТПО.

Всего за время лечения (1 год) и последующего наблюдения (0,5 года) умер 1 пациент в основной группе (0,7%) и 5 пациентов из группы контроля (7%). Различия представляются существенными, однако они получены на относительно малочисленном контингенте и за короткое время наблюдения. В работе T. Gernsheimer (2010) [32] проведен анализ общей выживаемости пациентов с ИТП, включенных в несколько исследований. Всего было прослежено 354 больных в сроки до 87–215 недель. Большая часть из них (238) получали ромиплостим и 116 были включены в группу плацебо (41) или стандартного лечения 2-й линии (75). Больные, получавшие и не получавшие ромиплостим, были сопоставимы по клиническим характеристикам. Смертность в группе ромиплостима оказалась в 5 раз ниже, чем в группе плацебо/поддерживающая терапия (HR, 0,187; 95% CI, 0,048–0,931; $p=0,04$). Учитывая различную продолжительность наблюдения (пациенты, получавшие ромиплостим, наблюдались дольше) был проведен дополнительный анализ с компенсацией этих различий, показавший даже большее позитивное влияние агониста ТПО на показатели выживаемости (HR, 0,120; 95% CI, 0,035–0,410; $p=0,0007$).

Высокая эффективность и хорошая (в отличие от большинства препаратов резерва) переносимость делает данную группу препаратов весьма привлекательной для лечения больных с резистентной ИТП. Ниже представлено описание трех клинических случаев использования ромиплостима у пациентов с резистентной формой ИТП в качестве терапии, направленной на повышение уровня тромбоцитов перед плановой операцией.

Клинический случай № 1

Пациентка М. 19 лет, заболела в марте 2010 г., когда появилась петехиальная сыпь на коже нижних и верхних конечностей, в анализе крови изменений выявлено не было. Через 2 месяца возникло массивное носовое кровотечение, для купирования которого бригадой СМП больная была доставлена в клинику. При обследовании изменений со стороны органов и систем, за исключением уменьшения количества тромбоцитов в периферической крови (8×10^9/л) и признаков раздражения мегакариоцитарного ростка в костном мозге, выявлено не было. Больной был поставлен диагноз иммунная тромбоцитопения и начата терапия глюкокортикостероидами (ГКС).

Пациентка получала преднизолон в дозе 2 мг/кг/сутки в течение 4 недель без существенного эффекта. Уровень тромбоцитов составил $15–30\times10^9$/л. При снижении дозы ГКС уровень тромбоцитов снизился до 10×10^9/л. Доза преднизолона была восстановлена, через неделю при повторной попытке ее снижения у пациентки развилась макрогематурия. Назначение дексаметазона (40 мг в сутки 4 дня — 2 курса с интервалом 2 недели) не сопровождалось существенным повышением содержания тромбоцитов, но осложнилось болями в левом коленном суставе. При рентгенографии левого коленного сустава патологии не отмечено, однако по данным МРТ выявлен асептический некроз бедренной кости с патологическим переломом в зоне некроза и некроз большеберцовой кости левого коленного сустава. Глюкокортикоиды были отменены и, в связи с сохраняющейся тромбоцитопенией, была начата терапия ритуксимабом. Больная получила 4 инфузии препарата по 375 мг/м² с интервалом в 1 неделю. Ко 2-й неделе терапии отмечалось повышение уровня тромбоцитов до 200 тыс./мкл, однако к окончанию курса уровень тромбоцитов снизился до первоначальных значений, прогрессировал кожный геморрагический синдром. В связи с резистентным характером и длительностью тромбоцитопении > 6 месяцев было решено провести

спленэктомию, однако течение болезни свидетельствовало о риске неуспешности операции и высоком риске интра- и послеоперационных геморрагических осложнений. Принято решение о терапии агонистами рецепторов ТПО (ромиплостим) с целью достичь стабильного временного повышения уровня тромбоцитов.

Была начата терапия ромиплостимом (Nplate, AMGEN) в дозе 1 мг/кг подкожно 1 раз в неделю при исходном уровне тромбоцитов 8×10^9/л. В связи с минимальным увеличением количества тромбоцитов через неделю (10×10^9/л) доза была увеличена до 3 мг/кг, затем до 5 мг/кг. Побочных действий препарата не отмечено. Уровень тромбоцитов на 4-й неделе терапии повысился до 240×10^9/л, что сопровождалось уменьшением болезненности в области переломов нижней конечности, существенным увеличением активности пациентки. В ноябре 2010 г. была выполнена лапароскопическая спленэктомия. Послеоперационный период протекал гладко, клинических и данных УЗИ за тромботические осложнения не выявлено. В анализах крови на следующие сутки после операции отмечался тромбоцитоз до 1500×10^9/л с постепенным снижением числа тромбоцитов до 400×10^9/л к 5–6-й неделе после операции.

Клинический случай № 2

Пациентка Л. 64 лет, была направлена в клинику для выполнения плановой спленэктомии в связи с длительным анамнезом ИТП, плохо контролируемой лекарственными препаратами. Впервые тромбоцитопения была выявлена около 4 лет назад после аппендэктомии (уровень тромбоцитов составил 14×10^9/л). Тогда было проведено комплексное обследование, которое позволило исключить диагноз вторичной тромбоцитопении. При терапии ГКС (метилпреднизолон 1 мг/кг) в течение 4 недель уровень тромбоцитов повысился до 280×10^9/л. Через 6 месяцев отмечен рецидив заболевания. Пациентка получала иммуноглобулин в дозе 0,4 г/кг в/в в течение 5 дней, уровень тромбоцитов повысился до 158×10^9/л и оставался таким в течение 3 месяцев, но затем снова была отмечена глубокая тромбоцитопения. Проводилась терапия иммуноглобулином и ГКС в течение 5 месяцев с положительным эффектом. Следующий рецидив заболевания развился через 14 месяцев, уровень тромбоцитов снизился до 7×10^9/л. Пациентка получала ритуксимаб (375 мг/м^2, всего 8 курсов). Уровень тромбоцитов оставался низким (38×10^9/л), а через месяц уменьшился до 11×10^9/л, в связи с чем было принято решение об удалении селезенки, для чего пациентка была госпитализирована. При обследовании данных за наличие другой патологии, кроме ИТП, не выявлено. Терапия преднизолоном (1 мг/кг) сопровождалась резким повышением сахара крови до 20 ммоль/л, плохо поддающимся коррекции инсулином, повышением АД. Содержание тромбоцитов в крови оставалось низким ($7–11 \times 10^9$/л), прогрессировало маточное кровотечение. В связи с недостаточным эффектом и плохой переносимостью ГКС было решено провести предоперационную подготовку ромиплостимом. Начальная доза препарата в связи с упорным характером тромбоцитопении была увеличена до 3 мкг/кг. Через неделю содержание тромбоцитов крови составило 14×10^9/л, доза была увеличена до 5 мкг/кг, затем до 7 мкг/кг, что привело к повышению тромбоцитов только до 48×10^9/л. Препарат был назначен в максимальной дозе 10 мкг/кг, к 5-й неделе терапии содержание тромбоцитов повысилось до 148×10^9/л. Была выполнена спленэктомия; содержание тромбоцитов крови к 5-й неделе после операции составило 150×10^6/л с максимальным подъемом через 3 дня после операции до 380×10^9/л. Переносимость ромиплостима была удовлетворительной.

Клинический случай № 3

Пациент О. 22 лет, поступил в клинику с массивным носовым кровотечением. Диагноз ИТП впервые установлен в 4-летнем возрасте, наблюдался в МДКБ, с подросткового возраста регулярно гематологом не наблюдался. Терапии по поводу ИТП в течение последних 2 лет не получал, геморрагических проявлений не отмечалось. С мая больного стала беспокоить заложенность носа, в связи с чем обратился к отоларингологу по месту жительства, получал симптоматическую терапию без эффекта, в связи с чем была выполнена КТ придаточных пазух носа и выявлено опухолевое образование в правой верхнечелюстной пазухе 3×2 см с деструкцией медиальной стенки правой верхнечелюстной пазухи, средней носовой раковины справа, правосторонний этмоидит и сфеноидит. Рекомендована биопсия образования, однако в процессе дообследования у больного возникло некупируемое носовое кровотечение, что привело к госпитализации с дальнейшим дообследованием и определением тактики терапии. В общем анализе крови выявлено снижение числа тромбоцитов (43×10^9/л). Дополнительные лабораторные тесты не подтвердили вторичной тромбоцитопении. Была проведена биопсия образования, сопровождавшаяся массивным кровотечением, полученный материал был не информативен. В связи с ранее нестабильным эффектом глюкокортикоидных препаратов и необходимостью достижения стабильно высокого содержания тромбоцитов проведена кратковременная терапия ромиплостимом. Препарат вводился в дозе 1 мг/кг подкожно 1 раз в неделю. Уровень тромбоцитов на 2-й неделе терапии повысился до 300×10^9/л, была успешно выполнена расширенная биопсия образования полости носа справа. Послеоперационный период протекал без особенностей. Переносимость препарата была хорошей, побочных явлений не отмечалось.

Обсуждение

Длительное назначение агонистов ТПО при ИТП показало высокую эффективность в клинических исследованиях, однако в ряде случаев существует потребность в относительно кратковременном

подъеме содержания тромбоцитов крови. Нередко у больных ИТП имеется сниженный, но относительно безопасный уровень тромбоцитов ($20–40 \times 10^9$/л), что достаточно для предотвращения геморрагических осложнений при малотравматичном образе жизни, но недостаточно для проведения оперативного вмешательства. До последнего времени основным способом решения вопросов такого рода оставалось применение высоких доз иммуноглобулинов с или без кортикостероидов. Эффект иммуноглобулинов развивается быстро (одни-двое суток при введении в дозе 1 г/кг в сутки), но не во всех случаях, и длительность его вариабельна. Общая частота позитивных ответов, по мнению большинства авторов, составляет 80–85% [33, 34], однако эффект во многих исследованиях оценивался как положительный при достижении содержания тромбоцитов крови $> 20 \times 10^9$/л в течение 72 часов от момента введения. Если же его оценивать по числу полных ремиссий (уровень тромбоцитов $> 100 \times 10^9$/л), то действенность данного варианта терапии составляет не более 48–56% [35, 36]. Кроме того, при хронической ИТП длительность и выраженность подъема тромбоцитов крови существенно ниже, чем при лечении первичных больных. В одном из исследований введение IgG пациентам с хронической ИТП повышало исходный уровень тромбоцитов лишь на 1–2 недели с возвращением к изначально низкому числу тромбоцитов у 13 из 17 пролеченных пациентов [37]. Продление эффекта требует повторного назначения препаратов иммуноглобулинов. Помимо краткости и нестабильности действия при хронической ИТП к недостаткам IgG также относятся высокая стоимость и часто встречающиеся трансфузионные реакции (головная боль, озноб, боли в мышцах, тошнота и рвота), выраженность которых можно уменьшить, назначив премедикацию или снизив скорость введения. Реже назначение препаратов этой группы осложняют гемолиз, тромбозы, отек легких и асептический менингит [38]. Все это делает назначение иммуноглобулинов далеко не идеальным методом коррекции уровня тромбоцитов при хронической ИТП. Стимуляторы тромбопоэтиновых рецепторов могут теоретически служить альтернативным вариантом терапии для решения вопроса о временном увеличении содержания тромбоцитов крови в случаях высокого риска геморрагических осложнений. В одном небольшом исследовании повторное кратковременное (6 недель) назначение агонистов ТПО (элтромбопаг) показало возможность быстрого подъема тромбоцитов с максимумом тромбоцитов ко 2-й неделе и сохранением безопасно высокого уровня на протяжении времени терапии [39]. Отмена препарата приводила к снижению содержания тромбоцитов, но 2-й и 3-й циклы показали сохранение позитивного эффекта ТПО на увеличение тромбоцитов и уменьшение риска кровотечений. В другом исследовании пациенты, получающие стимуляторы ТПО, подвергались медицинским манипуляциям с высоким риском геморрагий — трансуретральной резекции, колоноскопии, экстракции зуба, полипэктомии и никаких осложнений авторами не было отмечено [40]. В то же время число подобных наблюдений пока крайне незначительно и речь идет о минимальных по объему хирургических вмешательствах.

Безопасное количество тромбоцитов при проведении спленэктомии и в послеоперационном периоде остается вопросом дискуссионным. С одной стороны, относительная редкость тяжелых геморрагических осложнений показана во многих сериях, когда спленэктомия проводилась при низком содержании тромбоцитов крови в надежде на их быстрый подъем сразу после удаления селезенки. С другой стороны, такой эффект бывает далеко не у всех больных, особенно при сочетанной (печеночно-селезеночной) секвестрации тромбоцитов и при длительном анамнезе заболевания. Эти больные могут иметь тяжелые кровотечения в послеоперационном периоде. Геморрагические осложнения служили главной причиной 30-дневной летальности при спленэктомии (в 11 из 48 случаев при открытой и в 1 из 3 случаев при лапароскопической) в самой большой серии наблюдений [5]. Методов, позволяющих точно предсказать эффект спленэктомии, за исключением определения области основной деструкции тромбоцитов, меченных радиоактивным индием, не существует. Последнее исследование позволяет предсказать недостаточную действенность данного метода лечения при преимущественно печеночном (10% эффекта) или смешанном (38% эффекта) типе деструкции тромбоцитов [41]. В то же время, этот метод мало распространен и не является абсолютно точным. Открытым также остается вопрос риска тромбозов. Известно, что спленэктомия нередко осложняется тромбозом селезеночной вены и вен нижних конечностей. Этот риск существенно разнится между пациентами с гематологическими новообразованиями и гепатомегалией или случаями спленэктомии у пациентов с ИТП и травмой селезенки. В последней группе он составляет около 1% против 10% при миелопролиферативных заболеваниях [42]. Тем не менее, учитывая риск постспленэктомического тромбоцитоза, необходимо тщательно анализировать каждый случай оперативного вмешательства у пациентов, получающих тромбопоэтины, и рассматривать вопросы профилактики с возможным добавлением антиагрегантов. У 3 пациентов с хронической резистентной ИТП, обсуждаемых в настоящей статье, назначение ромиплостима позволило относительно быстро и стабильно увеличить уровень тромбоцитов до нормального и провести оперативные вмешательства без геморрагических осложнений.

Литература

1. Rodeghiero F., Stasi R., Gernsheimer T. et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. Blood 2009;113(11):2386–93.
2. Olsson B., Andersson P.O., Jernas M. et al. T-cell mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Nat Med 2003;9(9):1123–4.
3. McMillan R., Wang L., Tomer A., Nichol J., Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. Blood 2004;103(4):1364–9.
4. Provan D., Stasi R., Newland A.C. et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia Blood 2010;115(2):168–186.
5. Kojouri K., Vesely S.K., Terrell D.R., George J.N. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. Blood 2004;104(9):2623–34.
6. Rodeghiero F., Besalduch J., Michel M. et al. Treatment practices in adults with chronic immune thrombocytopenia â a European perspective. European Journal of Haematology 2010;84(2):160–8.
7. Schwartz P.E., Sterioff S., Mucha P. et al. Postsplenectomy sepsis and mortality in adults. Journal of the American Medical Association 1982;248(18):2279–83.
8. Fontana V., Jy W., Ahn E.R. et al. Increased procoagulant cell-derived microparticles (C-MP) in splenectomized patients with ITP. Thromb Res 2008;122(5):599–603.
9 Jaïs X., Ioos V., Jardim C. et al. Splenectomy and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Thorax 2005;60:1031–4.
10. Verlin M., Laros R.K., Penner J.A. Treatment of refractory thrombocytopenic purpura with cyclophosphamine. Am J Hematol 1976;1(1):97–104.
11. Quiquandon I., Fenaux P., Caulier M.T. et al. Re-evaluation of the role of azathioprine in the treatment of adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a report on 53 cases. Br J Haematol 1990 Feb;74(2):223–8.
12. Provan D., Moss A.J., Newland A.C., Bussel J.B. Efficacy of mycophenolate mofetil as single-agent therapy for refractory immune thrombocytopenic purpura. Am J Hematol 2006;81(1):19–25.
13. Maloisel F., Andres E., Zimmer J. et al. Danazol therapy in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: long-term results. Am J Med 2004;116(9):590–4.
14. Portielje J., Westendorp R., Kluin-Nelemans H. et al. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2001;97:2549–54.
15. Stasi R., Stipa E., Forte V., Meo P., Amadori S. Variable patterns of response to rituximab treatment in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2002;99(10):3872–3.
16. Arnold D.M., Dentali F., Crowther M.A. et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 2007;146(1):25–33.
17. Patel V.L., Mahévas M., Stasi R. Long-Term Outcome Following B-Cell Depletion Therapy with Rituximab In Children and Adults with Immune Thrombocytopenia (ITP) Absracts of 52nd ASH Annual Meeting Orlando, Abstr.72.
18. Fianchi L., Rossi E., Murri R. et al. Severe infectious complications in a patient treated with rituximab for idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Hematol 2007;86(3):225–6.
19. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production. Thromb Haemost 1995;74(1):521–5.
20. Nichol J.L. Endogenous TPO (eTPO) levels in health and disease: possible clues for therapeutic intervention. Stem Cells 1998;16(Suppl 2):165–75.
21. Fielder P.J., Gurney A.L., Stefanich E., Marian M., Moore M.W., Carver-Moore K., de Sauvage F.J. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. Blood 1998;92(6):2189–91.
22. Mignotte V., Vigon I., Boucher de Crevecoeur E. et al. Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL). Genomics 1994;20:5–12.
23. Bartley T.D., Bogenberger J., Hunt P. et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor mpl. Cell 1994;77:1117–24.
24. Li J., Yang C., Xia Y. et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. Blood 2001;98(12):3241–8.
25. Bussel J.B., Kuter D.J., George J.N. et al. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. N Engl J Med 2006;355:1672–81.
26. Bussel J.B., Cheng G., Saleh M.N. et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 2007;357(22):2237–47.
27. Kuter D.J., Bussel J.B., Lyons R.M. et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomized controlled trial. Lancet 2008;371(9610):395–403.
28. Cheng G., Saleh M.N., Marcher C. et al. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. Lancet 2011;377:393–402.
29. Kuter D.J., Mufti G.J., Bain B.J., Hasserjian R.P., Davis W., Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. Blood 2009;114:3748–56.
30. Kumagai Y., Fujita T., Ozaki M. et al. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of AMG 531, a Thrombopoiesis-Stimulating Peptibody, in Healthy Japanese Subjects: A Randomized, Placebo-Controlled Study. J Clin Pharmacol 2007;47:1489–97.
31. Kuter D., Rummel M., Boccia R. et al. Romiplostim or Standard of Care in Patients with Immune Thrombocytopenia. The new England journal of medicine established in 1812 November 11, 2010;363(20):1889–999.
32. Gernsheimer T., Kuter D.J., Cines D.B. et al. Analysis of Mortality Rates During Romiplostim Clinical Studies of Patients (Pts) with Immune Thrombocytopenia (ITP) Absracts of 52nd ASH Annual Meeting Orlando, Abstr.3701.
33. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. Br J Haematol 2003;120(4):574–96.
34. Blanchette V., Imbach P., Andrew M., Randomised trial of intravenous immunoglobulin G, intravenous anti-D, and oral prednisone in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. Lancet 1994;344(8924):703–7.
35. Newland A.C., Treleaven J.G., Minchinton R.M., Waters A.H. High-dose intravenous IgG in adults with autoimmune thrombocytopenia. Lancet 1983 Jan 15;1(8316):84–7.
36. Carroll R.R., Noyes W.D., Rosse W.F., Kitchens C.S. Intravenous immunoglobulin administration in the treatment of severe chronic immune thrombocytopenic purpura. Am J Med 1984 Mar 30;76(3A):181–6.
37. Janvier M., Clauvel J.P., Tobelem G. Treatment of chronic autoimmune thrombopenic purpura with intravenous immunoglobulins. Study of 18 cases. Nouv Rev Fr Hematol 1983;25(4):253–7.
38. Schiavotto C., Ruggeri M., Rodeghiero F. Adverse reactions after high-dose intravenous immunoglobulin: incidence in 83 patients treated for idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and review of the literature. Haematologica 1993;78(6 Suppl 2):35–40.
39. Bussel J.B., Psaila B., Saleh M.N. et al. Efficacy and safety of repeated intermittent treatment with eltrombopag in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [50th ASH Annual Meeting abstract]. Blood 2008;112:3431.
40. Tarantino M., Bussel J., Saleh M. et al. Eltrombopag helps chronic idiopatic thrombocytopenic purpura patients to undergo procedures without bleeding or additional treatment to rise platelet counts. Hematologica 2008;93(Suppl 1):296.
41. Najean Y., Rain J-D., Billotey C. et al. The site of destruction of autologous 111 In-labelled platelets and the efficiency of splenectomy in children and adults with idiopathic thrombocytopenic purpura: a study of 578 patients with 268 splenectomies. British Journal of Haematology 1997;97(3):547–50.
42. Krauth M., Lechner K., Neugebauer E.A.M. et al. The postoperative splenic/portal vein thrombosis after splenectomy and its prevention — an unresolved issue. Haematologica 2008;9(8):1227–32.

Биологические свойства гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови

С.А. Румянцев, Е.Ю. Осипова, С.Е. Ипатов, Т.В. Шаманская, О.А. Майорова, А.Г. Румянцев
ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: *Сергей Александрович Румянцев s.roumiantsev@niidg.ru*

Обзор литературы посвящен анализу эволюции изучения пуповинной крови как источника гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации. Поэтапно описано развитие технологий определения и выделения стволовых клеток, оценки их способности к пролиферации и дифференцировке и функциональных характеристик с помощью методов культивирования in vitro и с помощью выращивания in vivo на животных моделях. Описаны различия стволовых клеток пуповинной крови в сравнении с другими тканевыми источниками. Показана роль микроокружения для самообновления и дифференцировки стволовых клеток. Исследованы возможности моделирования биологических свойств стволовых клеток на примере использования векторной конструкции на основе вируса иммунодефицита человека 1 типа, содержащей гены Notch, для регулирования пролиферации CD133+ и CD34+ гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови человека.

Ключевые слова: *гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, CD133+ клетки, CD34+ клетки*

Biological properties of cord blood hematopoietic stem cells

S.A. Rumiantsev, E.Yu. Osipova, S.E. Ipatov, T.V. Shamanskaya, O.A. Mayorova, A.G. Rumyantsev
Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

This article provides an overview of research evolution of umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation. Phased developments of the technology of stem cells detection and selection, their proliferation, differentiation and function assessment using cultivation in vitro and in vivo in animal model was described. Differences of cord blood stem cells in comparison with those from other sources were described. The role of microenvironment for stem cells self-renewal and differentiation is shown. The possibility of stem cells biological properties modeling on example of using a vector based on HIV type 1 containing Notch genes, to regulate CD133+ and CD34+ cord blood stem cells proliferation is shown.

Key words: *hematopoietic stem cells, cord blood, CD133+ cells, CD34+ cells*

Первая трансплантация клеток пуповинной крови была проведена в октябре 1988 г. Реципиент — 6-летний мальчик, которому ввели пуповинную кровь его сестры [1], — лечился по поводу гематологических проявлений анемии Фанкони, выжил и хорошо себя чувствовал более 16 лет после трансплантации. Эта операция, так же как и последующие трансплантации пуповинной крови по поводу анемии Фанкони [2–4], ювенильного хронического миелолейкоза [5] и других злокачественных и незлокачественных заболеваний [6] проводились клетками от HLA-совместимого донора-сиблинга. До настоящего времени было проведено более 8000 родственных и неродственных трансплантаций, при которых использовалась полностью (шесть шестых) или частично (пять шестых, четыре шестых и три шестых) HLA-совместимая пуповинная кровь [1–6]. Клинические результаты обнадеживают, и нет сомнений, что пуповинная кровь содержит долго живущие, способные восстанавливать популяцию костного мозга, стволовые клетки. Они могут быть использованы для лечения ряда злокачественных и незлокачественных заболеваний.

Однако существует ряд проблем, которые необходимо преодолеть для частого использования трансплантаций пуповинной крови у взрослых и детей с большей массой тела. Большинство процедур трансплантаций пуповинной крови проведено у детей, и, хотя описано успешное приживление у взрослых и детей с большой массой тела, количество клеток, собранных при одной процедуре сбора пуповинной крови, рассматривается недостаточным для большинства взрослых.

Усилия исследователей были направлены на компенсацию лимитирующего количества собранных клеток пуповинной крови. Среди них попытки *ex vivo* экспансии гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из пуповинной крови. Клинические экс-

перименты в направлении *ex vivo* экспансии стволовых клеток не внушают оптимизма, что связано с решением вопроса, можно ли подвергнуть экспансии или даже поддерживать жизнедеятельность клеток, обладающих долговременной способностью восстанавливать популяцию клеток костного мозга, при условиях культивирования, которые, как известно, необходимы для экспансии более зрелых пролиферирующих клеток в пределах категории стволовых клеток. Для продвижения вперед исследований по *ex vivo* экспансии, без сомнения, необходимо лучшее понимание ростовых характеристик стволовых клеток и того, что регулирует их пролиферацию, самообновление и выживаемость.

Продукция клеток крови представляет собой иерархию стволовых и коммитированных клеток-предшественников, продуцируемую конвейерным способом [7]. Самые ранние, наиболее незрелые клетки имеют наибольший потенциал самообновления и долговременную способность к восстановлению популяции костного мозга. В популяции стволовых клеток существуют и другие клетки, но они имеют меньшую способность к самообновлению или существуют среди компартмента впоследствии развивающихся клеток-предшественников. Эти клетки обладают кратковременной способностью к восстановлению популяции костного мозга. В костном мозге взрослых стволовые клетки и клетки-предшественники присутствуют в концентрации менее чем 1/1000 — 1/10 000, но, вероятно, в пуповинной крови их концентрация несколько больше [8]. В настоящее время имеется 2 пути для характеристики ГСК и клеток-предшественников. Один путь — с помощью фенотипических маркеров, которые распознают компоненты поверхности клеток, например, антигены кластеров дифференцировки (cluster of differentiation antigens — CD). Однако фенотип не всегда повторяет функцию клеток, особенно после их культивирования *ex vivo*. Другим путем является характеристика этих клеток через функциональную активность — способность стволовых и клеток-предшественников формировать потомство.

Фенотип, оцененный с помощью поверхностных клеточных маркеров

Наиболее используемым фенотипическим маркером для человеческих стволовых и клеток-предшественников является CD34 — гликофосфопротеин [9, 10], однако о его функции известно очень немного. Хотя CD34 и используется в качестве важного клинического маркера ГСК, он также найден на клетках, которые не являются стволовыми или клетками-предшественниками (например, эндотелиальные клетки) [11]. Само по себе наличие CD34 не отличает стволовые клетки от клеток-предшественников, или даже подтипы клеток в пределах категории стволовых или клеток-предшественников, хотя распределение плотности CD34 антигенов на поверхности клеток иногда используется в этом отношении. Клетки, экспрессирующие наибольшую плотность CD34 антигена ($CD34^{+++}$), соответствуют популяции клеток, высоко обогащенной самыми ранними клетками [10]. Для оценки степени зрелости клетки используются и другие поверхностные клеточные маркеры, включая CD38 [12], Thy1 [13], c-*kit* [14] и Flt3/Flk-2 [15, 16], а также суправитальная окраска родамином-123 [17, 18]. Комбинированное использование этих маркеров является наиболее информативным для определения подтипов стволовых и клеток-предшественников. Так, $CD34^+$-клетки, являющиеся также $CD38^-$, $Thy1^{low}$, c-*kit*$^+$, $Flt3^+$ и/или родамин-123^{low}, рассматриваются как наиболее ранние клетки в процессе развития. Популяция $CD34^+CD38^+$-клеток содержит более зрелые клетки-предшественники, чем те, которые найдены в $CD34^+CD38^-$-популяции. Фенотипическое считывание клеточных типов является более быстрым, чем функциональные исследования, например, измерение пролиферативной способности. Кроме того, фенотипирование служит важным инструментом для физической сепарации и очистки популяций и субпопуляций этих клеток, однако фенотипирование имеет свойственные ему ограничения. Фенотип не обеспечивает достоверной информации относительно способности клеток к самообновлению, пролиферации или дифференцировке, если фенотипический анализ не проводится в комбинации с функциональным исследованием клеток в пределах типируемой популяции, кроме того, фенотипы не всегда устойчиво экспрессируются. Отмечено, что ГСК и клетки-предшественники могут также быть найдены в популяции $CD34^-$-клеток [19—21]. Ситуация относительно $CD34^+$ против $CD34^-$ характеристик стволовых и клеток-предшественников осложняется индуцируемостью и вариабельностью CD34-антигенов на клетках [22]. Кроме того, после проведения экспансии *ex vivo* многие предшественники не экспрессируют CD34-антигены [23]. Фенотипические маркеры полезны, пока исследователи учитывают ограничения в их использовании. Стволовые и клетки-предшественники в свежевыделенной пуповинной крови экспрессируют, вероятно, главным образом те же фенотипические маркеры, как и эти клетки в костном мозге взрослых, исключая экспрессию HLA-DR-антигенов, которая, вероятно, отсутствует или экспрессируется на очень низком уровне на примитивных клетках костного мозга, но высоко экспрессируется на примитивных клетках пуповинной крови [17, 24].

Молекулярное фенотипирование стволовых и клеток-предшественников находится в процессе разработки [25—28] и может, в конечном итоге, позволить более точную характеристику, чем поверхностное фенотипирование.

Оценка пролиферации, дифференцировки и функции клеток с помощью методов культивирования *in vitro*

Имеется несколько путей для функциональной оценки ГСК. Для коммитированных клеток-предшественников и более зрелых подтипов стволовых клеток (тех, которые, вероятно, не имеют долговременной способности к восстановлению популяции *in vivo*) используют методы роста клеток в полутвердой питательной среде, типа агара, агарозы или метилцеллюлозы, или в суспензионной среде [29, 30]. Полутвердые питательные среды позволяют получить характерные колонии. Эти колонии происходят из отдельных клеток, которые являются стволовыми клетками с ограниченной способностью к самообновлению или клетками-предшественниками [10, 31, 32]. Стволовая клетка/клетка-предшественница, дающая начало колонии, может быть распознана по дифференцированному потомству в колонии. Анализ колоний позволяет идентифицировать клетки, называемые стволовыми клетками, колониеформирующие клетки с высоким пролиферативным потенциалом (HPP-CFC), мультипотентные колониеформирующие единицы (CFU-GEMM) и более линейно ограниченные предшественники типа CFU-GM (способность к гранулоцитарной и макрофагальной дифференцировке), CFU-G (способность к гранулоцитарной дифференцировке), CFU-M (способность к макрофагальной дифференцировке), CFU-Mega (способность к мегакариоцитарной дифференцировке) и BFU-E (бурст-формирующая единица — эритроидная, способная к эритроидной дифференцировке). Способность пересаживать отдельные колонии с одной чашки на другую с развитием вторичных колоний предоставляет оценку способности к самообновлению первоначальной клетки, которая дала начало первичной колонии, особенно когда и первичная и вторичная колонии являются мультилинейными. Репопуляция стволово-клеточных и HPP-CFC колоний помещает эти клетки в категорию стволовых клеток. Хотя CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Mega и BFU-E рассматриваются как клетки-предшественники без способности к самообновлению, имеются признаки, что некоторые подтипы CFU-GEMM могут быть отнесены скорее к более поздней, более зрелой категории стволовых клеток, чем к категории ранних клеток-предшественников [31, 32].

Пуповинная кровь содержит более высокую концентрацию стволовых клеток, чем костный мозг взрослых [8, 32]. Подсчет концентрации основывался на количестве образованных колоний относительно количества посаженных клеток. Фактически это была оценка количества CFU-GEMM, BFU-E и CFU-GM предшественников, которая привела к возникновению предположения, что пуповинная кровь может служить источником пересаживаемых клеток, и что она может использоваться с этой целью у взрослых, так же как у детей [8]. Кроме того, пролиферативная способность [8, 10, 32, 33] и способность к восстановлению гемопоэза [10, 31, 32] этих типов клеток в пуповинной крови, вероятно, выше, чем в костном мозге.

Анализы с долговременными культурами клеток в суспензионной среде, в которых рост клеток поддерживается компонентами стромальных клеток и/или цитокинами, также демонстрируют ростовые характеристики клеток пуповинной крови [23, 32, 35, 36]. Клетки, инициирующие долговременные культуры (LT-CIC), которые могут быть распознаны с помощью долговременных клеточных культур, растущих с поддержкой стромальных клеток или комбинации экзогенно добавляемых цитокинов, идентифицируют клеточную популяцию более раннюю и более примитивную, чем таковая HPP-CFC, CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM, CFU-G, CFU-M и CFU-Mega [7, 30]. Однако доказательства того, что LT-CIC являются эквивалентными наиболее ранним ГСК, не убедительны. Углубленный анализ LT-CIC показал, что $CD34^{+}CD38^{-}$-клетки пуповинной крови имеют более высокую клоногенную эффективность, быстрее пролиферируют в ответ на стимуляцию цитокинами и генерируют почти в 7 раз больше потомков, чем их костномозговые партнеры [12].

Функция, оцененная с помощью выращивания клеток *in vivo* на животных моделях

Стволовые клетки, обладающие способностью долговременного восстановления популяции костного мозга, были определены и с помощью исследований, использующих животные модели *in vivo*. В этих моделях оценивается долговременная способность восстановления популяции донорскими клетками, введенными мышам, облученным летально при некомпетентном микроокружении, или с добавлением клеток от сингенных мышей [7, 32]. Имеется возможность использования *in vivo* моделей, использующих в качестве реципиентов для приживления человеческих клеток мышей с различными формами тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИН, англ. SCID), при исследовании человеческих стволовых клеток [32, 37—39]. В этих моделях пуповинная кровь, вероятно, имеет более высокую способность к приживлению, чем клетки костного мозга взрослого. Эти человеческие SCID-восстанавливающие клетки (SRC) найдены только во фракции клеток, экспрессирующих высокий уровень CD34-антигена и не имеющих CD38-антигена на своей клеточной поверхности [37]. Концентрация SRC в пуповинной крови при определении с помощью анализа с ограниченным разведением составляет 1 на $9{,}3 \times 10^5$ клеток, что значительно выше, чем концентрация (1 SRC на 3×10^6 клеток) в костном мозге взрослого или 1 на 6×10^6 мобилизованных ростовым фактором клеток периферической крови от

здорового донора [39]. Тот факт, что имеется только около 1 SRC на 600 $CD34^+CD38^-$-клеток [37], еще более подчеркивает необходимость добавления к фенотипическому анализу функциональной оценки с количественной целью. SCID-восстанавливающие клетки найдены среди $CD34^+CD38^-$-популяции клеток, но только небольшая часть $CD34^+CD38^-$-клеток имеет функциональные характеристики SRC. Сравнение стволовых клеток, ответственных за восстановление популяции у NOD-SCID мышей, с таковыми при аутологичной трансплантации у облученных павианов, свидетельствует о том, что у NOD-SCID мышей за восстановление популяции ответственны другие ГСК и клетки-предшественники по сравнению с нечеловекообразными приматами [40]. Однако различия могут быть связаны с разным типом трансплантации (ксеногенная против аутологичной). Жизненно важную роль в способности к приживлению стволовых клеток играет хоуминг-эффект, и возможно, количество человеческих SRC, определенное с помощью NOD-SCID мышей, было недооценено. При использовании внутрибедренных инъекций стволовых клеток у мышей было продемонстрировано увеличение количества стволовых клеток при инфузии различных типов клеток [41], что, очевидно, раскрыло уникальный компартмент человеческих стволовых клеток пуповинной крови с кратковременной способностью восстанавливать популяцию клеток костного мозга у мышей [42].

Стволовые клетки пуповинной крови в сравнении с другими тканевыми источниками

Все используемые исследования свидетельствуют о повышенной концентрации ранних незрелых ГСК в пуповинной крови по сравнению с костным мозгом взрослых. Однако пока нет никаких доказательств наличия истинных уникальных особенностей стволовых/клеток-предшественников пуповинной крови по сравнению с такими же клетками костного мозга. Незрелость клеток пуповинной крови со стволово-клеточным фенотипом документирована с помощью генетических исследований с использованием определения длины теломеры [43]. Исследования с мышиными клетками, наилучшим образом приживляющимися у мышей, наилучшим образом удовлетворяют гипотезе о том, что отдельные стволовые клетки из костного мозга взрослого, крови плода на поздних стадиях развития или крови новорожденного — все продуцируют сходные фракции лимфоидных и эритроидных клеток [44]. Эти результаты свидетельствуют скорее о более высокой концентрации более незрелых клеток, чем о наличии популяции клеток, уникальных для пуповинной крови.

Хотя примитивные клетки пуповинной крови в категории стволовых/клеток-предшественников имеют большую способность к пролиферации [8, 10], анализ кинетики клеточного цикла продемонстрировал, что при выделении из пуповинной крови сразу после рождения ребенка эти клетки находятся в очень медленном или неделящемся состоянии [34, 45]. Это показано с помощью методики нейтрализации меченного тритием тимидина в сочетании с анализом колоний, а также путем проточной цитометрии клеток с определенным фенотипом. Это резко контрастирует с относительно высоким пролиферативным показателем этих клеток в костном мозге. Клетки пуповинной крови вначале находятся в медленном или нециклическом состоянии, но они быстро отвечают на стимуляцию ростовыми факторами своей пролиферацией [8, 10, 34, 45]. Именно этот быстрый ответ на стимуляцию прямо ассоциирован с увеличенной экспансией этих клеток *ex vivo*.

Микроокружение и факторы самообновления

Пролиферация, самообновление, продолжительность жизни и дифференцировка ГСК и клеток-предшественников, вероятно, регулируются их микроокружением. В костном мозге взрослых микроокружение составлено из гемопоэтических и негемопоэтических стромальных клеток. В проведенных исследованиях по определению регуляторных компонентов в пределах интактной структуры микроокружения было выявлено, что остеобласты являются регуляторным компонентом ниши ГСК *in vivo* и влияют на функцию этих незрелых ГСК через активацию Notch [46] и через костный морфогенетический протеин [47]. Клетки и ростовые факторы, вовлеченные в развитие костей, были предварительно связаны с регуляцией гемопоэтических клеток-предшественников [48, 49].

Все больше доказательств существования в постнатальном периоде гемангиобласта, который дает начало и крови, и кровеносным сосудам, хотя они еще не окончательные [50–52]. Информация относительно регуляции роста подразумеваемого взрослого гемангиобласта должна также пролить свет на рост и дифференцировку ГСК.

Цитокины, хемокины и их рецепторы, действующие в одиночестве или в комбинации, осуществляют регуляцию пролиферации миелоидных клеток-предшественников [53, 54]; они осуществляют контроль клеточного цикла и, по существу, контрольных точек клеточного цикла [55]. Цитокины и внутриклеточные сигнальные молекулы, вовлеченные в пролиферацию и/или самообновление ГСК, включают следующие лиганды и их рецепторы: фактор стволовых клеток/steel-фактор/c-*kit* [56], Flt3 лиганд [56], Notch лиганды/Notch [57–63] и Wnt3a/Frizzled [64, 65]. Задействованные внутриклеточные молекулы включают: $p21^{cip1/waf1}$ [66], Hox B4/PBX1 [67-69], Bmi-1 [70] и мембранный белок mKirre, происходящий из стромальных клеток [71]. Представляет инте-

рес, что Nanog [72, 74], Stat3 [75, 76] и Hex [77] участвовали в росте и дифференцировке эмбриональных стволовых клеток. Возможно, что внутриклеточные молекулы, вовлеченные в регуляцию эмбриональных стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников, могут также играть роль в пролиферации и/или самообновлении ГСК. Так, Stat3 связан с регуляцией гемопоэза [78], а фосфорилирование серина в Stat3 связано с пролиферацией клеток-предшественников в ответ на комбинированную стимуляцию steel-фактором и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) или интерлейкином-3 (IL-3) [79]. Экспрессия Hex ассоциирована с усилением пролиферации миелоидных клеток-предшественников [80], Stat5 является важным для Flt3 лиганда при синергичной стимуляции миелоидных предшественников [81]. Внутриклеточная сигнальная молекула SHIP вовлечена в регуляцию гемопоэтических клеток-предшественников [82] и ГСК [83].

Другие цитокины, которые могут влиять на пролиферацию стволовых клеток и/или самообновление — это тромбопоэтин, онкостатин М и IL-20. Тромбопоэтин является рано действующим цитокином [84], который вовлечен в развитие гемангиобластов [85] и служит одним из ингредиентов, наряду со steel-фактором и Flt3 лигандом, используемым исследователями для экспансии ГСК и клеток-предшественников *ex vivo* [86]. Онкостатин М — это цитокин, вырабатываемый Т-хелперами 1, который регулирует гомеостаз клеток-предшественников [87]. IL-20 — новый член семейства интерлейкинов [88, 89] — является кандидатом в группу стволово-клеточных эффекторных молекул, имеющим избирательную активность в отношении CFU-GEMM среди других миелоидных клеток-предшественников [90]. IL-20 способен увеличивать количество CFU-GEMM в костном мозге человека и мыши и в пуповинной крови человека в присутствии steel-фактора и эритропоэтина *in vitro*, тогда как не оказывает влияния на эритроидные, гранулоцитарно-макрофагальные или мегакариоцитарные предшественники. IL-20 трансгенные мыши имеют увеличенное количество CFU-GEMM, находящихся в клеточном цикле, но не других миелоидных предшественников, а введение IL-20 нормальным мышам значительно увеличивает только количество CFU-GEMM и их клеточный цикл [90]. Это первый описанный цитокин с такой специфичностью. Так как CFU-GEMM могут быть накоплены *in vitro* при условии добавления адекватных цитокинов (steel-фактор ± плазма пуповинной крови) [31, 32], возможно, что IL-20 может также вызывать увеличение пролиферации и/или самообновления стволовых клеток. IL-20 связывается с рецепторами IL-20 (R) типа I и II [91]. IL-20R тип I состоит из субъединиц IL-20Rα и IL-20Rβ, тогда как IL-20R тип II состоит из IL-20Rβ субъединицы и одной субъединицы IL-22R. Хотя и IL-19, и IL-24 связываются с мышиной Baf3 клеточной линией, созданной с экспрессией типа I или типа II IL-20R, и стимулируют пролиферацию адекватных рецептор-содержащих клеток, они не показывают влияния на мышиные или человеческие миелоидные клетки-предшественники [90]. Все еще не до конца известно, какой рецептор использует IL-20 и каков его механизм действия. И IL-20RI, и IL-20RII проводят внутриклеточные сигналы через Stat3 [92]. Stat3 играет существенную роль в поддержании врожденного иммунитета [78] и является сигнальным путем, вовлеченным в сигналы самообновления, индуцируемые LIF в эмбриональных стволовых клетках [75], и наряду с JAK2-путем поддерживает самообновление в эмбриональной линии стволовых клеток сперматогонии дрозофилы [76]. При поддержке второго сигнала от steel-фактор/c-*kit* или Flt3 лиганд/Flt3, Stat3 поддерживает самообновление первичных мультипотентных гемопоэтических клеток [92].

Самообновление требует деления клеток без потери «стволовости» и плюрипотентности, по крайней мере, у одной из дочерних клеток (ассиметричное деление клеток) [93]. Процесс, путем которого исходные клеточные детерминанты разделяются при делении клеток [94–96], зависит от поляризации и сегрегации поперек митотического веретена. Контрольные точки клеточного цикла необходимы для поддержания прогрессии событий деления клеток [97]. Были описаны некоторые из этих контрольных точек [98]. Контрольная точка сборки митотического веретена (MSAC) определяет, что клеточный цикл не будет развиваться от метафазы к анафазе, пока все парные сестринские хроматиды не выстроятся должным образом поперек метафазной пластинки. MSAC, вероятно, является критической для адекватной регуляции самообновления и дифференцировки, и в процесс могут быть вовлечены митотические белки контрольной точки.

Ингибитор циклин-зависимой киназы $p21^{cip1/waf1}$ вовлечен в синергичную стимуляцию steel-фактором пролиферации клеток-предшественников [99, 100] и в функционирование стволовых клеток [66]. Так как $p21^{cip1/waf1}$ связан с адекватным функционированием MSAC [101], MSAC может быть вовлечена в пролиферацию и/или самообновление стволовых клеток. Кроме того, так как $p21^{cip1/waf1}$ связан с цитокиновой синергией, а цитокиновая синергия, вероятно, влияет на функцию стволовых клеток [102], цитокины могут действовать на стволовые клетки через $p21^{cip1/waf1}$ и MSAC.

Вдобавок к их влиянию на рост, цитокины вовлечены в выживаемость/антиапоптоз ГСК и клеток-предшественников. Одной такой молекулой является CXC-хемокин, фактор стромально-клеточного происхождения-1 (SDF-1)/CXCL12, который сигна-

лизирует и индуцирует активность через рецептор — CXCR4 [103, 104]. Возникло предположение, что даже манипуляции с одним генетическим элементом могут влиять на самообновление и дифференцировочный потенциал незрелых гемопоэтических клеток [105]. Если будет доказано использование любого из вышеуказанных цитокинов и/или внутриклеточных сигнальных молекул при *ex vivo* экспансии ГСК, то это может позволить более широкое применение трансплантаций пуповинной крови.

Первый банк пуповинной крови был организован в 1993 г. П. Рубинштейном в Нью-Йорке [8]. Однако одной из проблем при создании банков пуповинной крови служит неизвестный отрезок времени, в течение которого образцы пуповинной крови могут поддерживаться в криоконсервированном состоянии. Теоретически, с момента заморозки стволовые клетки и клетки-предшественники (при наличии постоянного источника жидкого азота) должны быть способны поддерживаться длительный период времени, по крайней мере, в течение нормального периода жизни индивидуума. Самое длительное время хранения пуповинной крови, которая впоследствии использовалась для клинической трансплантации, вероятно, находится в диапазоне от 5 до 8 лет. Три группы исследователей описали восстановление предшественников из пуповинной крови, хранившейся замороженной 12–15 лет [32, 106, 107]. В наиболее крупном исследовании [32] было продемонстрировано, что после 15 лет хранения размороженные ядросодержащие клетки, гранулоцитарно-макрофагальные (CFU-GM), эритроидные (BFU-E) и мультипотентные (CFU-GEMM) предшественники имели среднее воспроизводство (± 1 СО) в 83 ± 12, 95 ± 16, 84 ± 25 и 85 ± 25 клеток соответственно. Отсутствие повреждения функциональных возможностей этих размороженных клеток-предшественников было выявлено экстенсивной пролиферативной способностью CFU-GM, BFU-E и CFU-GEMM, которые генерировали колонии, содержащие до 22 500, 182 500 и 292 500 клеток соответственно, после стимуляции в полутвердой целлюлозной питательной среде с эритропоэтином, ГМ-КСФ, ИЛ-3 и steel-фактором. CFU-GEMM-колонии могли быть пересажены на вторичные чашки с образованием в результате CFU-GEMM-колоний таких же по размеру, как и сформированные на первичных культуральных чашках, а $CD34^+CD38^-$-клетки пуповинной крови, выделенные из размороженных после 15-летнего хранения клеток, демонстрировали более чем в 250 раз большую *ex vivo* экспансию клеток-предшественников. Кроме того, $CD34^+$-клетки, выделенные из этих разморозок, были способны приживляться у NOD-SCID мышей с частотой, эквивалентной таковой у свежевыделенных $CD34^+$-клеток пуповинной крови. Таким образом, клетки пуповинной крови могут храниться замороженными, по крайней мере, 15 лет с вероятностью того, что они будут способны приживляться у человеческих реципиентов.

Моделирование биологических свойств $CD133^+$ и $CD34^+$ ГСК пуповинной крови человека

Возможность воздействовать на механизмы, регулирующие развитие стволовых клеток, открывает широчайшие перспективы применения этих клеток в разных областях медицины.

Изучение возможности моделирования влияния различных генетических агентов и прочих внешних факторов на биологические свойства стволовых клеток представляется актуальной задачей, так как в этом случае можно получить возможность влиять на степень и направленность их дифференцировки [108–110].

Трудности изучения биологических свойств стволовых клеток связаны в первую очередь с тем, что они в большей своей массе находятся вне клеточного цикла, и в таком состоянии недоступны для большинства вирусных векторов.

Таким образом, появилась задача создания нового поколения векторов, способных проникать в неделящиеся клетки. Выходом из этого положения стала генерация новой конструкции на базе вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1). Было замечено, что вирус обладает способностью инфицировать практически все типы клеток, в том числе и находящиеся в покое.

К настоящему времени в распоряжении ученых появились мощные инструменты, способные коренным образом влиять на биологию клетки. К их числу следует, прежде всего, отнести векторы так называемой «третьей генерации» [111–114], способные переносить и встраивать чужеродную ДНК в геном исследуемых клеток, влияя, таким образом, на их функции.

Векторы, переносчики ДНК, полученные от лентивирусов, таких как вирус иммунодефицита человека 1-го типа, применяются при лечении некоторых заболеваний человека (болезнь Альцгеймера) благодаря их способности внедряться практически во все типы клеток независимо от их пролиферативного статуса, как *ex vivo*, так и *in vivo* [112–121].

Векторы на базе ВИЧ 1 — это не способные реплицироваться, гибридные вирусные элементы, состоящие из базовых протеинов лентивируса и имеющие оболочку другого вирусного агента, чаще всего вируса везикулярного стоматита человека (VSV) или MLV — его амфотропной оболочки [114, 118]. Применение VSV дает более устойчивый и высокий вирусный титр, что выражается в высокой стабильности вирусных частиц по сравнению с оболочками, взятыми от других вирусов.

Лентивирусы имеют сложную организацию генома. Наряду с основными структурными генами

(*gag, pol, env*), которые присущи всем ретровирусам, лентивирусы содержат 2 главных регуляторных гена (*tat* и *rev*) и несколько дополнительных генов, принимающих участие в модулировании вирусной генной экспрессии, сборке вирусных элементов, а также структурных и функциональных взаимодействиях в пораженных клетках. Репликация лентивирусов осуществляется частично путем работы cis-активных последовательностей ДНК, которые не кодируют протеины вируса. Большинство cis-активных последовательностей крайне необходимы для функционирования вируса, и они обычно всегда включаются в создаваемый вектор. Также существуют еще и trans-активные последовательности ДНК, которые кодируют 3 группы протеинов: структурные, регуляторные и вспомогательные [111, 115, 116, 122, 123].

Улучшение качества биологической безопасности получаемых векторов было достигнуто в результате полного удаления «ненужных» генов — *Vif*, *Vpr*, *Vpu* и *Nef* из основной конструкции при одновременном сохранении исходного титра получаемого вектора. Это привело к созданию так называемой «второй генерации» векторных систем, без снижения уровня их эффективности [115]. В настоящее время ученые имеют в своем распоряжении третье поколение векторов [111], в которых полностью отсутствуют главные регуляторные гены вируса *tat* и *rev*, что также сделано для достижения наиболее высокого уровня биологической защищенности при работе с вирусом с сохранением высокого уровня активности получаемого вектора. Эта кассета содержит гены *gag* и *pol* [124–126], а также участок, кодирующий протеин, продукт гена *rev* [127], встраиваемый отдельной, не наслаивающейся конструкцией [111]. Высокоактивные промоторы, расположенные перед сайтом старта транскрипции вектора, способны полностью заменить функцию гена *tat* [128]. Это нововведение дало возможность не только существенно повысить титр производимых векторов (около 10^7 TU/ml — на клетках HeLa), но и достичь еще более высокой степени биологической защиты, поскольку теперь любой способный к репликации рекомбинантный вирус, который только может быть произведен в процессе приготовления векторов, будет нуждаться во всех факторах, необходимых для достижения вирулентности и репликации ВИЧ-1 *in vivo*. Поэтому возможно утверждать, что работа с векторами на базе ВИЧ-1 стала практически абсолютно безопасной [115, 116]. К тому же существенный прогресс был достигнут в результате получения векторов, способных после переноса трансгена в клетку-мишень подвергаться самостоятельной инактивации (self inactivating vectors — SIN) [118, 120, 123, 129].

К другим особенностям можно отнести изменения с целью улучшения доставки трансгенов к клетке-мишени и последующей экспрессии. Одна из таких модификаций включает в себя внедрение посттранскрипционного регуляторного элемента [130], который был выделен из генома вируса гепатита североамериканского лесного сурка (Woodchuck posttranscriptional regulatory element — WPRE), в 3'конец переносимого вектора. WPRE действует на уровне посттранскрипции путем стимулирования нуклеарного экспорта транскриптов и/или увеличения реакций полиаденилирования самих транскриптов, тем самым увеличивая количество общей мРНК в клетках. Способность векторов инфицировать неделящиеся и терминально дифференцированные клетки, включая нейроны, фоторецепторные клетки сетчатки, некоторые виды эпителиальных клеток, а также плюрипотентные стволовые клетки крови, делает возможным создание методов, позволяющих применить генную терапию в лечении ряда заболеваний [113].

Этот вектор имеет сайт клонирования (MCS), который позволяет удобно встроить интересующий исследователя ген в его последовательность ДНК, а затем перемещать в другие конструкции, «разрезая» интересующий участок вектора уже с соответствующими промоторами и дополнительными генами устойчивости к ампициллину (*bla*), а также *ori*. Этот вектор был выбран экспериментальным путем (изначально использовались другие векторы в качестве промежуточных), что сильно сказалось на конечном результате — при использовании других типов векторных систем переносимые гены не работали. Возможность эффективного переноса трансгена к клетке-мишени открыла новые возможности в области анализа влияния разных генов на функции ГСК.

В нашем случае исследовательский интерес представляет семейство генов *Notch*, которое известно своим активным участием в регуляции дифференцировки и развития ГСК. *Notch* был идентифицирован впервые в 1919 г., как ген, который обуславливает развитие насечек на краях крыльев мух. Как было выяснено позднее, гены семейства *Notch* играют ключевую роль в эмбриональном развитии дрозофилы и *C. elegans*. У мух ген необходим для нормального нейрогенеза, миогенеза, формации крыльев, развития тканей глаза, оогенеза и других тканей [131, 132].

Усиленное изучение работы генов этого семейства у дрозофилы показали, что ген *Notch* кодирует высоко законсервированный трансмембранный рецептор, который экспрессируется как на эмбриональных клетках, так и на клетках взрослой особи [133, 134]. Механизмы передачи сигнала каскадом *Notch* в животном мире универсальны, ему присущи все характерные свойства сигнальных систем. Белок *Notch*, который служит рецептором для Notch-сигнального пути, выделен как у беспозвоночных, так и у позвоночных: дрозофилы, нематоды, лягушки, рыб, грызунов, человека. Путь *Notch* через ла-

теральное ингибирование или индукцию участвует фактически во всех клеточных контактах у животных и наиболее изучен у Drosophila melanogaster [132].

Рецепторы *Notch* вовлечены в большое количество взаимодействий [135–137], определяющих в конечном итоге судьбу той или иной клетки или клеточной популяции в целом, что не может, естественно, не затронуть общее развитие и функцию многих органов, включая гематопоэз и иммунную систему [138].

У человека известно 4 гена из этого семейства, каждый из которых имеет свой собственный рецептор. Семейство рецепторов *Notch* локализовано на хромосомах 9q34, 1p13-p11, 19p13.2-p13.1 и 6p21.3. Эти рецепторы представляются как довольно гомологичные структуры, что справедливо и для других организмов, включая человека. Все 4 рецептора экспрессируются на клетках кроветворной системы [137, 139]. *Notch 1* — преимущественно на тимоцитах, а также макрофагах и стволовых клетках. *Notch 2*-рецепторы находят на тимоцитах и В-клетках. *Notch 3* экспрессируется на всех типах клеток. Экспрессия *Notch 4* доминирует у эндотелиальных клеток, а также макрофагов. Экстрацеллюлярный домен *Notch 1–2* состоит из 36 epidermal growth factor (EGF)-похожих повторов и 3 Lin-12/Notch-повторов. *Notch 3–4* имеют 34 и 29 EGF-похожих повторов соответственно. Интрацеллюлярный домен рецепторов состоит из RAM-домена, шести ANK-повторов, двух последовательностей ядерной локализации (NLS) и пролин-глутамат-серин-треонин-обогащенного домена (PEST). *Notch 4* имеет более короткий домен из-за отсутствия второй NLS [139].

Как видно, функции этих рецепторов несколько перекрывают друг друга и, кроме того, они могут использовать одни и те же лиганды. Лигандами для *Notch* являются трансмембранные протеины, которые экспрессируются на соседствующих клетках. Пока их известно всего 3 — это Delta, Jagged 1 и Jagged 2. Они расположены на хромосомах 6q27, 20p12-p11 и 14q32. На гемопоэтических клетках Jagged 2 экспрессируется у тимоцитов, Delta, по данным многих исследователей, обнаруживает себя практически на всех клетках кроветворной системы, а также клетках стромы. Jagged 1, наоборот, скорее всего имеет ограниченную экспрессию на клетках нескольких типов, таких как клетки стромы, мегакариоциты и стволовые клетки [137]. Подлинно известно, что все 3 лиганда взаимодействуют как минимум с рецепторами генов *Notch 1* и *Notch 2*. Также известно, что лиганд Jagged 1 взаимодействует с *Notch 3* у мышей. Активация сигнального пути для *Notch* посредством его лигандов не вызывает сомнений: в экспериментах с мышами, у которых отсутствовал лиганд Jagged 1, наблюдалась эмбриональная смерть, как результат дефектов сосудистого морфогенеза. Дефицит Jagged 2 обуславливал перинатальную смертность, как результат дефектов краниофациального морфогенеза. Delta-дефицитные мыши также демонстрировали эмбриональную смертность. Взаимодействие рецептора с лигандом индуцирует дополнительные каскадные протеолитические реакции, заканчивающиеся перемещением интрацеллюлярного домена (активированной формы интрацеллюлярной части рецептора *Notch*-ICN) к ядру. Там ICN взаимодействует с факторами транскрипции, такими как CBF1/RBPJk, активируя тем самым CBF-1-регулируемые гены, как например *Hairy* и *HES 1*. Эти гены в свою очередь регулируют экспрессию тканеспецифичных факторов транскрипции, которые влияют на линейную дифференцировку клеток (применительно к гематопоэзу) и некоторые другие события [137]. Во время этого процесса ICN может контактировать с дополнительными регуляторами сигнальной системы, включающими в себя так называемые позитивные регуляторы Deltex и Mastermind, или с негативным регулятором Numb. Точные молекулярные механизмы этих взаимодействий пока не известны. Кроме того, остаются до конца не изученными условия, при которых происходит переключение от угнетения к активации самих генов *Notch*, индуцируемое присутствием ICN [140]. Активно исследуемый в последние годы ген *Presenilin* также причисляют к участникам *Notch*-пути [141]. Список генов, имеющих отношение к *Notch*-пути, все время расширяется [142, 143]. Однако сеть взаимоотношений очень сложна, и решение вопроса о принадлежности генов к *Notch*-пути или иной цепи передачи информации — задача не из легких. Так, только часть авторов на основании данных о генетическом взаимодействии *Notch* и *Delta* и сходстве мутантных фенотипов относят к Notch-сигнальному пути ген *deltex* [136].

Четко известно, что *Notch 1* принимает участие в развитии и созревании Т-клеток [139]. Также он влияет на развитие $CD8^+$- и $CD4^+$-клеток. Кроме того, ICN способствует приобретению фенотипа $CD44^+CD25^+$ клетками TCR α/β при переходе их к клеткам $CD44^-CD25^-$. Под его регулированием происходит $CD4^+$ Т-клеточный иммунный ответ.

На В-клеточной линии чаще экспрессируется *Notch 2*, который функционирует по-разному на разных стадиях развития этих клеток [139]. Как уже было отмечено, *Notch* угнетает функцию продукта гена *E2A*, протеина E47. *E2A* экспрессируется на всем протяжении В-клеточного развития и является очень важным фактором транскрипции на ранних стадиях дифференцировки. Потеря функции *E2A* блокирует В-клеточное развитие на про В-клеточной стадии [139].

Действие генов *Notch* на клетки миелоидной линии, по мыслям ученых, сводится к тому, что во многих случаях они ингибируют или, по крайней мере, отсрочивают их дифференцировку [137].

Кроме того (и это справедливо для всех типов гемопоэтических клеток), на разных стадиях развития различные сигналы, продуцируемые цитокинами, вносят свою лепту в регуляцию дифференцировки. Скорее всего, сигналы генов *Notch* кооперируют и/или модифицируют эффекты разных цитокинов, что в свою очередь приводит к изменениям направления развития.

При определении колониеобразующей активности CD133$^+$-клеток пуповинной крови оказалось, что гены *Notch 1* и *2* оказывают супрессивное действие независимо от линейной принадлежности колоний, что, как правило, заканчивается их гибелью. YFP-позитивные колонии с момента их формирования до 3–4 дней выглядели вполне жизнеспособными, но затем наблюдалось достаточно резкое угасание их роста и отсутствие формирования новых колоний. Затем в течение 3–4 дней наблюдался распад и гибель колонии в целом. Колонии негативного контроля, напротив, сохраняли способность к росту еще достаточно продолжительное время — около 7–10 дней. Ген *Notch 2* оказывал большее супрессивное воздействие, чем ген *Notch 1*. Наибольший супрессивный эффект генов *Notch* отмечался в популяции клеток, дающих рост смешанных колоний, т. е. наиболее ранних предшественников гемопоэза (при сравнении групп *Notch 1* против негативного контроля и *Notch 2* против негативного контроля) по сравнению с линейно-специфичными клетками-предшественниками [144].

Такая же тенденция наблюдалась при определении уровня спонтанного апоптоза CD133$^+$-клеток. Клетки, инфицированные геном *Notch 1*, имели уровень спонтанного апоптоза 15,78 ± 3,27 %, а *Notch 2* — 29,31 ± 5,64 % . В контрольной популяции этот показатель не превышал 2 % [145].

Таким образом, перспектива создания эффективного механизма для переноса генов в неделящиеся клетки, а также создание и отработка моделей для изучения влияния различных факторов на биологические свойства ГСК с целью возможности модификации их дальнейшей пролиферации и дифференцировки представляется актуальной задачей.

В конечном итоге большое значение имело бы точное понимание, какие клетки необходимы и в каком количестве для гарантии того, что образец пуповинной крови имеет адекватное количество долго- и кратковременно приживляющихся стволовых и клеток-предшественников. Накопление знаний относительно биологии ГСК и клеток-предшественников, без сомнения, расширит полноценность пуповинной крови для трансплантации.

Литература

1. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engi J Med 1989;321:1174–8.
2. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. Blood Cells 1991;17:313–29.
3. Broxmeyer H.E., Gluckman E., Auerbach A. et al. Human umbilical cord blood: A clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Int J Cell Cloning 1990:8:76–91.
4. Kohli-Kumar M., Shahidi N.T., Broxmeyer H.E. et al. Haematopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. Br J Haematol 1993;85:419–22.
5. Wagner J.E, Broxmeyer H.E., Byrd R.L. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloblative therapy: Analysis of engraftment. Blood 1992;79:1874–81.
6. Wagner J.E., Kernan N.A., Steinbuch M. et al. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in forty-four children with malignant and non-malignant disease. Lancet 1995,346:214–9.
7. Broxmeyer H.E. Role of cytokines in hematopoiesis. In: Oppenheim J.J., Rossio J.L., Gearing A.J.H., eds. Clinical aspects of cytokines: Role in pathogenesis, diagnosis and therapy. New York: Oxford University Press, 1993:201–6.
8. Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation of adults. Proc Nati Acad Sci USA 1992;89:4109–13.
9. Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S. CD34: Structure, biology and clinical utility. Blood 1996;87:1–13.
10. Lu L., Xiao M., Shen R.N. et al. Enrichment, characterization and responsiveness of single primitive CD34^{+++} human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells with high proliferative and replating potential. Blood 1993;81:41–8.
11. Broxmeyer H.E., Cooper S., Li Z.H. et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor, a ligand for the tyrosine kinase receptor Flk-1. Int J Hematol 1995;62:203–15.
12. Hao Q.L., Shah A.J., Thiemann F.T. et al. A functional comparison of CD34$^+$ CD38 cells in cord blood and bone marrow. Blood 1995;86:3745–53.
13. Mayani H., Lansdorp P.M. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. Blood 1994;83:2410–7.
14. Laver J.H., Abboud M.R., Kawashima I. et al. Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. Exp Hematol 1993;23:1515–9.
15. Rappold I., Ziegler B.L., Kohler I. et al. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD 135) receptor tyrosine kinase. Blood 1997;90:111–25.
16. Broxmeyer H.E., Lu L., Cooper S. et al. Flt-3-ligand stimulates/co-stimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. Exp Hematol 1995;23:1121–9.
17. Traycoff C.M., Abboud M.R., Laver J. et al. Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol 1994;22:215–22.
18. Cicuttini F.M., Welch K.L, Boyd A.W. The effect of cytokines on CD34$^+$ Rh-123 high and low progenitor cells from human umbilical cord blood. Exp Hematol 1994;22:1244–51.
19. Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic re-constitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science 1996;273:242–5.
20. Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B. et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat Med 1998;4:1038–45.
21. Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Livington A.G. et al. Human bone marrow CD34 cells engraft in vivo and undergo multilineage expression including giving rise to

CD34+ cells. Exp Hematol 1998,26:353–60.
22. Sato T., Laver J.H., Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hemato-poietic stem cells. Blood 1999:94:2548–54.
23. Ruggieri L., Heimfeld S., Broxmeyer H.E. Cytokine-dependent ex vivo expansion of early subsets of CD34+ cord blood myeloid progenitors is enhanced by cord blood plasma, but expansion of the more mature subsets of progenitors is favored. Blood Cells 1994;120:436–54.
24. Traycoff C.M., Abboud M.R., Laver J. et al. Human umbilical cord blood hemato-poietic progenitor cells: Are they the same as their adult bone marrow counterparts? Blood Cells 1994;20:382–91.
25. Hao Q.L., Zhu J., Price M.A. et al. Identi-fication of a novel, human multilymphoid pro-genitor in cord blood. Blood 2001;97:3683–90.
26. Phillips R.L., Ernst R.E., Brunk B. et al. The genetic program of hematopoietic stem cells. Science 2000;288:1635–40.
27. Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y. et al. Sternness: Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science 2002;298:597–600.
28. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C. et al. A stem cell molecular signature. Science 2002;298:601–4.
29. Cooper S., Broxmeyer H.E. Clonogenic methods in vitro for the enumeration of granu-locyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) in human bone marrow and mouse bone marrow and spleen. J Tissue Culture Methods 1991;3:77–82.
30. Cooper S., Broxmeyer H.E. Measurement of interleukin-3 and other hematopoietic growth factors, such as GM-CSF, G-CSF, M-CSF, erythropoietin and the potent co-stimulating cytokines steel factor and Flt-3 ligand. In: Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H. et al. (eds). Current protocols in immunology. Vol 1, Suppe 18. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996:6.4.1–6.4.20.
31. Carow C.E., Hangoc G., Broxmeyer H.E. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: An effect enhanced by cord blood plasma. Blood 1993;81:942–9.
32. Broxmeyer H.E., Srour E.F., Hangoc G. et al. High efficiency recovery of hemato-poi-etic progenitor cells with extensive proliferative and ex vivo expansion activity and of hema-topoietic stem cells with NOD/SCID mouse repopulation ability from human cord blood stored frozen for 15 years. Proc Nail Acad Sci USA 2002;00:645–50.
33. Xiao M., Broxmeyer H.E., Horie M. et al. Extensive proliferative capacity of single iso-lated CD34+++ human cord blood cells in sus-pension culture. Blood Cells 1994;20;455–67.
34. Moore M.A.S., Hopkins I. Ex vivo expan-sions of cord blood derived stem cells and progenitors. Blood Cells 1994:20:468–81.
35. Piacibello W., Sanavio F., Garretto L. et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. Blood 1997;89:2644–53.
36. Lu L., Ge Y., Li Z.H. et al. CD34+++ stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by a retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fanconi anemia complementa-tion C gene. Cell Transplant 1995;4:493–503.
37. Bhatia M., Wang J.C.Y., Kapp U. et al. Purification of primitive human hematopoi-etic cells capable of repopulating immune-deficient mice. Proc Nati Acad Sci USA 1997;94:5320–5.
38. Hogan C.J., Shpall E.J., McNulty O. et al. Engraftment and development of human CD34(+)-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice. Blood 1997;90:85–96.
39. Wang J.C.Y., Doedens M., Dick J.E. Pri-mitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone mar-row or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. Blood 1997;89:3919–24.
40. Horn P.A., Thomasson B.M., Wood B.L. et al. Distinct hematopoietic stem/progenitor cell populations are responsible for repopulat-ing NOD/SCID mice compared with nonhu-man primates. Blood 2003;102:4329–35.
41. Yahata T., Ando K., Sato T. et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. Blood 2003;101:2905–13.
42. Mazurier F., Doedens M., Gan O.I. et al. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. Nat Med 2003;9:959–63.
43. Vaziri H., Dragowska W., Allsopp R.C. et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. Proc Nati Acad Sci USA 1994;91:9857–60.
44. Harrison D.E., Astle C.M. Short- and long-term multilineage repopulating hema-topoietic stem cells in late fetal and newborn mice: Models for human umbilical cord blood. Blood 1997;90:174–81.
45. Movassagh M., Caillot L., Baillou C. et al. Optimization of the cycling of clonogenic and primitive cord blood progenitors by various growth factors. Stem Cells 1997;15:214–22.
46. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003;425:841–6.
47. Zhang J., Niu C., Ye L. et al. Identi-fication of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 2003;425:836–41.
48. Bellido T., Jilka R.L., Boyce B.F. et al. Regulation of interleukin-6, osteoclasto-genesis, and bone mass by androgens: The role of the androgen receptor. J Clin Invest 1995;95:2886–95.
49. Jilka R.L., Passeri G., Girasole G. et al. Estrogen loss causes an upregulation of several hematopoietic bone marrow progenitors in the mouse: A mediating role of interleukin-6. Exp Hematol 1995;25:500–6.
50. Temple S. Embryonic stem cell self-renewal, analyzed. Cell 2003;15:247–53.
51. Kyba M., Daley G.Q. Hematopoiesis from embryonic stem cells: Lessons from and for ontogeny. Exp Hematol 2003;31:994–1006.
52. Bailey A.S., Fleming W.H. Converging roads: Evidence for an adult hemangioblast. Exp Hematol 2003;31:987–93.
53. Broxmeyer H.E. Regulation of hematopoi-esis by chemokine family members. J Hematol 2001;74:9–17.
54. Bagby G.C. Jr, Henrich M. Growth fac-tors, cytokines and the control of hematopoi-esis. In: Hoffman R., Shattil S., Furie B. et al. (eds). Hematology: Basic principles and prac-tice, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1999:154–201.
55. Mantel C.R., Gelfanov V.M., Kim Y.J. et al. P21waf-1-Chk1 pathway monitors G1 phase microtubule integrity and is crucial for restriction point transition. Cell Cycle 2002;1(5):327–36.
56. Lyman S.D., Jacobsen S.E.W. C-kit ligand and Flt3 ligand: Stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. Blood 1998;91:1101–34.
57. Li L., Milner L.A., Deng Y. et al. The human homolog of Rat Jagged 1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with notch 1. Immunity 1998;8:43–55.
58. Milner L.A., Bigas A. Notch as a me-diator of cell fate determination in hema-topoiesis: Evidence and speculation. Blood 1999;93:2431–48.
59. Varnum-Finney B., Wu L., Yu M. et al. Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of Notch signaling. J Cell Sci 2000:113:4313–18.
60. Karanu F.N., Murdoch B., Miyabayashi T. et al. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. Blood 2001;97:1960–7.
61. Kojika S., Griffin J.D. Notch recep-tors and hematopoiesis. Exp Hematol 2001;29:1041–52.
62. Maillard I., He Y., Pear W.S. From the yolk sac to the spleen: New roles for notch in regulating hematopoiesis. Immunity 2003;18:587–9.
63. Kumano K., Chiba S., Kunisata A. et al. Notch1 but not notch2 is essential for genera-ting hematopoietic stem cells from endothelial cells. Immunity 2003; 18:699–711.
64. Reya T., Duncan A.W., Allies L. et al. A role for Wnt signaling in self-renewal of haemato-poietic stem cells. Nature 2003;423:409–14.
65. Willert K., Brown J.D., Danenberg E. et al. Wnt proteins are lipid-modifled and can act as stem cell growth factors. Nature 2003;423:448–52.
66. Stier S., Cheng T., Forkert R. et al. Ex vivo targeting of p21Cip1/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. Blood 2003;102:1260–6.
67. Buske C., Feuring-Buske M., Abramovich C. et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. Blood 2002;100:862–8.
68. Krosi J., Austin P., Beslu N. et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by re-combinant TAT-HOXB4 protein. Nat Med 2003;9:1428–32.

69. Amsellem S., Pflumio F., Bardinet D. et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. Nat Med 2003;9:1423–7.
70. Lessard J., Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature 2003;423:255–60.
71. Ueno H., Sakita-Ishikawa M., Morikawa Y. et al. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. Nat Immunol 2003;4:457–63.
72. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 2003;13:631–42.
73. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 2003;13:643–55.
74. Cavaleri F., Scholer H.R. Nanog: A new recruit to the embryonic stem cell orchestra. Cell 2003;13:551–7.
75. Raz R., Lee C.K., Cannizzaro L.A. et al. Essential role of Stat3 for embryonic stem cell pluripotency. Proc Nati Acad Sci USA 1999;96:2846–51.
76. Kiger A.A., Jones D.L., Schulz C. et al. Stem cell self-renewal specified by Jak-Stat activation in response to a support cell cue. Science 2001;294:2542–5.
77. Guo Y., Chan R., Ramsey H. et al. The homeoprotein Hex is required for heman-gioblast differentiation. Blood 2003;102:2428–35.
78. Welte T., Zhang S.S.M., Wang T. et al. Stat3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of Stat3 in innate immunity. Proc Nati Acad Sci USA 2003;100:1879–84.
79. Gotoh A., Takahira H., Mantel C. et al. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. Blood 1996;88:138–45.
80. Mack D.L., Leibowitz D.S., Cooper S. et al. Down-regulation of the myeloid homeobox protein Hex is essential for normal T-cell development. Immunology 2002;107:444–51.
81. Zhang S., Fukuda S., Lee Y.H. et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5B for Flt3-dependent signaling. J Exp Med 2000;192:719–28.
82. Kim C.H., Hangoc G., Cooper S. et al. Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP. J Clin Invest 1999;104:1751–9.
83. Helgason C.D., Antonchuk J., Bodner C., Humphries R.K. Homeostastis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in SHIP-deficient mice. Blood 2003;102:3541–7.
84. Carver-Moore K., Broxmeyer H.E., Luoh S.M. et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in TPO and *c*-mpl-*deficient mice*. Blood 1996:88:803–8.
85. Perlingeiro R.C.R., Kyba M., Bodie S. et al. A role for thrombopoietin in hemangioblast development. Stem Cells 2003;21:272–80.
86. Lewis I.D., Almeida-Porada G., Du J. et al. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. Blood 2001;97:3441–9.
87. Broxmeyer H.E., Bruns H., Zhang S. et al. Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M. Immunity 2002; 16:815–25.
88. Blumberg H., Conklin D., Xu W. et al. Interleukin 20: Discovery, receptor identification, and role in epidermal function. Cell 2001;104:9–19.
89. Rich B.E., Kupper T.S. Cytokines: IL-20 — a new effector in skin inflammation. Curr Biol 2001;11(13):531–4.
90. Liu L., Zeng W., Ding C. et al. Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20. Blood 2003:102:3206–9.
91. Dumoutier L., Leemans C., Lejeune D. et al. Cutting edge: Stat activation by I L-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J Immunol 2001;167:3545–9.
92. Zhao S., Zoller K., Masuko M. et al. Jak2, complemented by a second signal from c-kit or flt3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hematopoietic cells. EMBO J 2002;21:2159–67.
93. Bums C.E., Zon L.I. Portrait of a stem cell. Dev Cell 2002;3:612–3.
94. Momson S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 1997;88:287–98.
95. Jan Y.N., Jan L.Y. Asymmetric cell division. Nature 1998,392:775–9.
96. Brummendorf T.H., Dragowska W., Zijimans J.M. et al. Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. J Exp Med 1998;188:1117–24.
97. Hartwell L., Weinert T. Checkpoints: Controls that control the order of cell cycle events. Science 1989;246:629–34.
98. Murray A. Cell cycle checkpoints. Curr Opin Cell Biol 1994;6:872–6.
99. Mantel C., Luo Z., Canfleld J. et al. Involvement of $p21^{cip-1}$ and $p27^{kip-1}$ in the molecular mechanisms of steel factor induced proliferative synergy in vitro and of $p21^{cip-1}$ in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. Blood 1996;88:3710–9.
100. Braun S.E., Mantel C., Rosenthal M. et al. A positive effect of $p21^{cip-1/waf-1}$ in the colony formation from murine myeloid progenitor cells as assessed by retroviral-mediated gene transfer. Blood Cells Mol Dis 1998;24:138–48.
101. Mantel C., Braun S.E., Reid S. et al. p21(cip-1/waf-1) deficiency causes deformed nuclear architecture, centriole overduplication, polyploidy, and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells. Blood 1999;93:1390–8.
102. Mantel C., Hendrie P., Broxmeyer H.E. Steel factor regulates cell cycle asymmetry. Stem Cells 2001;19:483–91.
103. Broxmeyer H.E., Kohli L., Kirn C.H. et al. Stromal cell derived factor-1/CXCL 12 enhances survival/anti-apoptosis of hematopoietic stem and myeloid progenitor cells: Direct effects mediated through CXCR4 and Gai proteins. J Leuk Biol 2003;73:630–8.
104. Lee Y., Gotoh A., Kwon H.J. et al. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. Blood 2002;99:4307–17.
105. Mulloy J.C., Cammenga J., Berguido F.J. et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human $CD34^+$ hematopoietic cells using a single genetic element. Blood 2003;102:4369–76.
106. Kobylka P., Ivanyi P., Breur-Vriesendorf B. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. Transplantation 1998;65:1275–8.
107. Mugishima H., Harada K., Chin M. et al. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant 1999;23:395–6.
108. Medcalf D. The molesular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in hematopoietic cells. Nature 1989;399:27–30.
109. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993;81:2844–53.
110. Varnum-Finney B., Pulton M.E., Yu M. et al. The Notch ligand, Jagged 1, influences the development of primitive hematopoietic precursors cells, Blood 1998;91:4084.
111. Dull T., ZuJerey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D. and Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol 1998;72:8463–71.
112. Marino M.P., Luce M.J., Reiser J. Small- to large-scale production of lentivirus vectors. Methods in Molecular Biology, vol.229: Lentivirus Gene Engineering Protocols. Edited by M. Federico, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2002:43–50.
113. Sutton R.E. Production of Lentiviral Vector Supernatants and Trasduction of Cellular Targets. Methods in Molecular Biology, vol.229: Lentivirus Gene Engineering Protocols. Edited by M. Federico, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2002:147–58.
114. Sutton R.E., Henry T., Wu M., Rigg R., Bohnlein E. and Brown P.O. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors Efficiently Transduce Human Hematopoietic Stem Cells. Journal of Virology 1998;72(7):5781–8.
115. Antonia Follenzi and Luigi Naldini Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. 2002 Academic press:454–6.
116. Finer M.H., Dull T.J., Quin L., Farson D. and Roberts M.R. Kat: a high efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. Blood 1994;83:43–50.
117. Hawley R.G., Covarrubias L., Hawley T. and Mintz B. Handicapped retroviral vectors efficiently transduce foreign genes into hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad. Sci USA 1987;84:2406–10.
118. Zufferey R., Dull T., Mandel R.J., Bukovsky A. et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. Journal of virology 1998;72(12):9873–80.
119. Yee K., Moores C., Jolly D.J., Wolff J.A., Respress J.G. and Friedmann T. Gene

expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:5197–5201.
120. Yu S.F., von Ruden T., Kantoff P.W., Graber C., Sciberg M., Ruther U., Anderson W. F. and Gilboa E.. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:3194–8.
121. Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L. and Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat Biolcchnol 1997;15:871–5.
122. Ingham P.W. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. Science 2001;294:1879–81.
123. Hwang J.J., Li L., Anderson W.F. A conditional self-inactivating retrovirus vector that uses a tetracycline-responsive expression system. J Virol 1997;71:7128–31.
124. Cullen B.R., Lomedico P.T. and Ju G. Transcriptional interference in avian retroviruses — implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. Nature 1984;307:241–5.
125. Dougherty J.P., Temin H.M. A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:1197–201.
126. Kafri T., Blomer U., Peterson D.A., Gage F.H., Verma M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lenti viral vectors. Nat Genet 1997;17:314–7.
127. Olson P., Temin H.M., Dornburg R. Unusually high frequency of reconstitution of long terminal repeats in U3-minus retrovirus vectors by DNA recombination or gene conversion. J Virol 1992;66:1336–43.
128. Michael N.L., D'Arcy L., Ehrenberg P.K. and Redfield R.K. Naturally occuring genotypes of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat display a wide range of basal and Tat-induced activities. J Virol 1994;68:3163–74.
129. Olson P., Nelson S., Dornburg R. Improved self-inactivating retroviral vector derived from spleen necrosis virus. J Virol 1994;68:7060–6.
130. Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L. and Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat Biolcchnol 1997;15:871–5.
131. Arias A.M. New alleles of Notch draw a blueprint for multifunctionality. Trends in Genet 2002;18:168–70.
132. Baonza A., Freeman M. Notch signalling and the initiation of neural development in the Drosophila eye. Development 2001;128:3889–98.
133. Barolo S., Stone T., Bang A.G., Posakony J.W. Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. Genes Dev 2002;15:1964–76.
134. Klein T., Seugnet L., Haenlin M., Arias A.M. Two different activities of Suppressor of Hairless during wing development in Drosophila. Development 2000;127:3553–66.
135. Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortiny M.E. Notch signalling II. Science 1995;268:225–32.
136. Diederich R.J., Matsuno K., Hing H., Artavanis-Tsakonas S. Cytosolic interection between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the signalling pathway. Development 1994;120:473–81.
137. Satoru Kojika, James D. Griffin. Notch receptors and hematopoiesis. Experimental Hematology 2001;29(Issue 9):1041–52.
138. Wu L., Aster J., Griffin J.D. Notch receptor signal transduction. Experimental Hematology 2000;28(Issue 7), Supplement 1:92.
139. Singh N., Phillips R.A., Iscove N.N. and Egan S.E. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis Experimental Hematology 2000;28(Issue 5):527–34.
140. Lawrence N., Klein T., Brennan K., Arias A.M. Structural requirements for Notch signalling with Delta and Serrate during the development and patterning of the wing disc of Drosophila. Development 2000;127:3185–95.
141. Struhl G., Greenwald I. Presenilin mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:229–34.
142. Cadigan K.M., Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev 1997;11:3286–305.
143. Doherty D., Feger G., Younger-Shepherd S., Jan L.Y., Jan Y.N. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation. Genes Dev 1996;10:421–34.
144. Ипатов С.Е., Румянцев С.А., Sutton R.E., Румянцев А.Г. Создание генных векторов на базе вируса иммунодефицита человека типа I для работы со стволовыми гемопоэтическими клетками человека. Вопр гематол/онкол и иммунопатол в пед 2005;4(2):92–7.
145. Ипатов С.Е., Румянцев С.А., Sutton R.E., Румянцев А.Г. Способность $Cd133^{+}Cd34^{-}$ и $CD133^{-}Cd34^{+}$ клеток пуповинной крови человека обеспечивать донорский гемопоэз у NOD/SCID мышей. Вопр гематол/онкол и иммунопатол в пед 2005;4(2):97–102.

Молекулярные механизмы лейкозогенеза

Лекция № 2

Механизмы реализации сигнальной трансдукции

Д.А. Домнинский
ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: *Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru*

Molecular mechanisms of leukaemogenesis
2. Mechanisms of signal transduction

D.A. Domninskiy
Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Предисловие

В лекции № 1 было показано, как множество различных белков могут объединяться в комплексы активации или репрессии транскрипции РНК, меняя активность генов. Генетические аберрации, приводящие к нарушению функционирования таких комплексов при лейкозах, относятся к так называемым мутациям класса II (лекция № 1, рис. 1). Но не следует забывать, что для синтеза белка важна не только скорость трансляции мРНК, но и ее стабильность, которая весьма эффективно контролируется микроРНК. В этой лекции будут рассмотрены геномные аберрации из числа мутаций класса I, активирующие пути сигнальной трансдукции. К классу I относятся также мутации, которые нарушают регуляцию клеточного цикла и запрограммированной смерти клеток (апоптоза). Эти клеточные процессы здесь обсуждаться не будут, они подробно освещены в серии публикаций [1–3].

Глава I. Основные сигнальные пути в клетке

Передача сигналов между клетками (сигнальная трансмиссия) может быть эндокринной, паракринной и аутокринной. Сигналами для клеток крови служат гормоны, факторы роста, цитокины, хемокины и т. п. Процесс преобразования сигнала на пути от клеточной мембраны к ядру называется сигнальной трансдукцией. Здесь мы рассмотрим компоненты сигнальной трансдукции, которые наиболее часто подвергаются нарушениям при лейкозах. В силу того, что такие нарушения специфичны для каждого типа гематологической опухоли, их принято считать рекуррентными (от англ. *recurrence* — повторение).

К компонентам сигнальной трансдукции относятся молекулы, воспринимающие сигнал на поверхности клетки (мембранные рецепторы), и разнообразные молекулы-эффекторы (исполнители), которые с помощью белок-белковых взаимодействий передают этот сигнал к ядру, активируя на конечном этапе специфичные факторы транскрипции. Рецептор и связанные с ним эффекторы формируют сигнальный путь (signalling pathway). Между разными сигнальными путями за счет использования идентичных эффекторов может происходить перекрестное соединение (интеграция сигналов), в результате чего в клетке образуются так называемые сигнальные сети (signalling network). Поэтому сигнальную трансдукцию можно представить как скоординированную эстафету, в которой информация, полученная от внеклеточных сигналов, передается к внутриклеточным эффекторам, и далее — к ядру. Для успешного прохождения любого сигнала необходимо, чтобы все компоненты сигнального пути были собраны в нужном месте и именно в то время, когда это необходимо [4]. Поэтому разные клетки (или одна и та же клетка, но в разное время) будут по-разному реагировать на сигналы одинаковой интенсивности. Чувствительность клетки к уровню интенсивности сигнала, т. е. к концентрации лиганда в окружающей среде, зависит от количества и стабильности рецепторных комплексов на ее поверхности (см. Приложение 1). После того как рецептор связался с лигандом, для передачи сигнала необходимо, чтобы внутри клетки были надлежащим образом собраны комплексы эффекторов, передающих сигнал в ядро (см. Приложение 2). Таким образом, как и в случае дифференцировки HSCs (hematopoietic stem cell; гемопоэтическая клетка; ГСК), клеточный ответ на внешние стимулы зависит от тонкой «настройки» молекулярных механизмов, индуцируемых внешними (инструктивными) и внутренними (стохастическими) сигналами (см. лекцию № 1).

На рис. 1 показаны основные типы мембранных клеточных рецепторов (немембранные, так называемые ядерные рецепторы, будут рассмотрены в сле-

Приложение 1. *Липидная сигнализация [5, 24–27]*

Физико-химические исследования клеточных мембран показали, что липидная часть мембран неоднородна и находится в постоянном изменении. Мембраны содержат липиды различного типа (стероиды, фосфоглицериды, сфинголипиды и т. п.), обладающие разными свойствами и неравномерно распределенные в мембране. В мембранах постоянно образуются и диссоциируют скопления липидов определенного типа (микродомены), которые получили название «липидных плотиков» (lipid rafts) в связи с тем, что они обладают способностью «дрейфовать» по мембране. Одной из важнейших функций липидных плотиков считается локальное формирование молекулярных ансамблей, состоящих из различных сигнальных молекул (рецепторов и эффекторных белков). Такие ансамбли могут «собираться» из-за повышенного сродства трансмембранных доменов рецепторов к определенному липидному окружению, а также в результате специфичных белок-белковых или белок-липидных взаимодействий. Таким образом, липидные плотики, несущие предварительно собранные сигнальные комплексы, способствуют быстрому и эффективному ответу рецепторов на связывание лиганда.

Тропность сигнальных белков к определенным липидным плотикам может быть обусловлена и модификацией белков. Действительно, многие сигнальные белки подвергаются модификации — ковалентному присоединению к белку различных жирных кислот, которые получили название «якорь» из-за их способности «привязывать» белки к определенным участкам клеточных мембран. Такие «заякоренные» белки являются не только компонентами системы сигнальной трансдукции, но и играют важную роль в жизни клеточных мембран, так как могут быть сигналами для индукции различных перестроек мембранного комплекса (формирование и слияние мембранных пузырьков, пиноцитоз, фагоцитоз, интернализация участков клеточных мембран, несущих рецепторы, и т. п.).

Белки (на рис. 1П окрашены голубым цветом) связываются с жирными кислотами (красный цвет) через различные химические радикалы, которые определяют тип якоря. Ацильные (арильные) якоря, с помощью которых с мембраной связываются, например, протеинкиназы SRC и ABL, обычно содержат миристиновую (C14, имеет 14 атомов углерода) или пальмитиновую (C16) жирные кислоты (миристилирование является важным фактором регуляции активности этих ферментов). Пренильные якоря, используемые G-белками, например RAS, содержат фарнезиловую (C15) и геранилгераниловую (C20) жирные кислоты (процесс прениляции также существенен для функционирования G-белков). Из рис. 1П видно, что эти 2 типа якорей связываются с разными аминокислотами (цистеин или глицин), находящимися на разных (COOH или NH_2) концах белковых молекул. GPI якоря (glycosylphosphatidylinositol), содержащие 2 молекулы жирной кислоты, используются белками, контактирующими с внешней поверхностью клеточной мембраны.

Мембранные липиды могут сами быть сигнальными молекулами. Для сигнальной трансдукции наиболее важными являются различные производные фосфатидилинозитола, (PI, phosphatidylinositol), которые выполняют в клетке разнообразные сигнальные функции.

Возможность фосфорилировать и дефосфорилировать сахарный остаток (инозитол) по нескольким позициям делает PI универсальным стыковочным (или докинг, docking) сайтом для целого ряда белков. В верхней части рис. 2П показаны различные фосфорилированные производные PI (волнистые линии — жирные кислоты, внедренные в липидный бислой мембран). $PI(4,5)P_2$, например, обозначает PI, в котором остаток инозитола фосфорилирован (P в желтом кружке) в 2 позициях (P2): по 4-му и 5-му атому углерода в сахарном кольце (4, 5), и т. п. Реакции фосфорилирования PI осуществляются тирозинкиназами, наиболее известной из которых является фосфоинозитол 3-киназа (PI3K, phosphoinositide 3-kinase), катализирующая образование $PI(3,4,5)P_3$, который, в свою очередь, служит стыковочным сайтом для протеинкиназы B (PKB, также известной как AKT). $PI(3,4,5)P_3$ «узнается» и другими белками, имеющими PH-домены (pleckstrin homology — название дано по белку плекстрину, у которого впервые был обнаружен такой домен). Связывание PKB с $PI(3,4,5)P_3$ приводит к активации фермента и запуску PI3K-AKT-mTOR сигнального пути. Ингибируют этот процесс 2 фосфатазы: SHIP (SH2 domain containing inositol 5-phosphatase) и PTEN (phosphatase and tensin homologue), которые дефосфорилируют стыковочный сайт для PKB и прерывают индукцию сигнализации. С точки зрения онкологии в этой группе ферментов *PI3K* является потенциальным онкогеном, а *SHIP* и *PTEN* — генами-супрессорами опухоли.

Кроме этой важной функции, PI-производные могут сами активировать некоторые клеточные сигнальные пути, выступая в роли так называемых вторичных посредников (наряду с цАМФ, цГМФ, ионами Ca^{2+} и закисью азота). В нижней части рис. 2П показано, как под воздействием фосфолипазы Cγ2 (PLCγ2) PI-липиды могут распадаться на свободный инозитолтрифосфат (IP_3) и связанный с мембраной диацилглицерин (DAG, diacylglycerol). При этом DAG представляет собой активирующий стыковочный сайт для протеинкиназы C, а высвобождение IP_3 приводит к тому, что он мигрирует в цитоплазму и «открывает» Ca^{2+} каналы в эндоплазматическом ретикулуме, вызывая тем самым целый спектр сигнальных реакций.

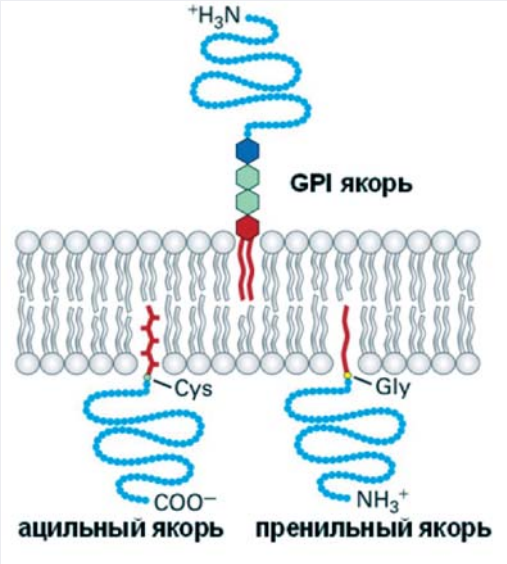


Рис. 1П. *Адаптирован из работы H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira et al. [5]*

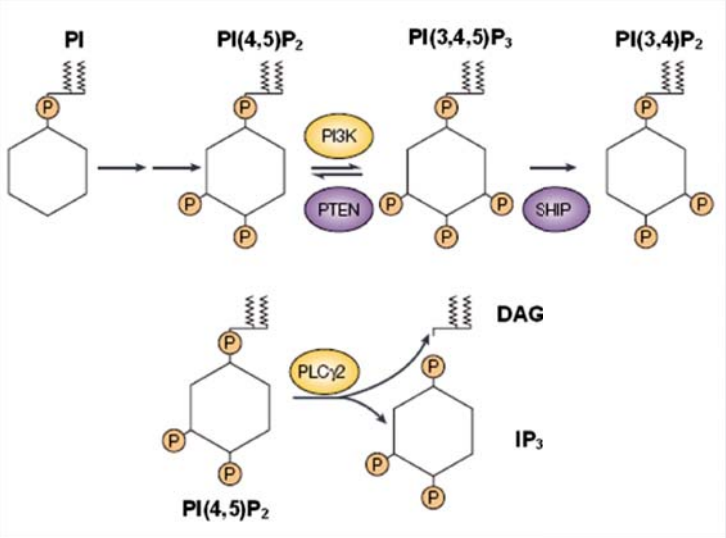


Рис. 2П. *Адаптирован из работы T. Kurosaki [27]*

Приложение 2. *Модификация сигнальных белков. Способы рекрутирования сигнальных белков [4, 28–29]*

Основным типом модификации белков сигнальной трансдукции является их фосфорилирование и дефосфорилирование. В зависимости от участка белка, подвергаемого фосфорилированию, эта реакция может вызвать противоположные эффекты — активацию белка или его ингибирование. Кроме того, фосфорилированные аминокислотные остатки часто служат стыковочными сайтами для других белков. Фосфорилирование происходит по остаткам аминокислот, содержащих гидроксильную группу. Таких аминокислот всего 3 (тирозин, серин и треонин), поэтому протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование белков, подразделяются на 2 большие группы: тирозиновые и серин-треониновые протеинкиназы (или просто «киназы»). Протеинкиназной активностью обладают многие клеточные рецепторы, которые относят к группе рецепторных протеинкиназ (тирозиновых и серин-треониновых, см. главу II). Процессы дефосфорилирования белков осуществляются протеинфосфатазами, которые тоже делятся на тирозиновые и серин-треониновые фосфатазы, в зависимости от того, какой аминокислотный остаток они дефосфорилируют. Фосфатазы, связанные с клеточной мембраной, относят к группе рецептор-подобных (receptor-like) протеинфосфатаз.

Кроме фосфорилирования сигнальные белки иногда подвергаются гидролизу, как, например, Notch рецепторы (см. рис. 3П). Но значительно чаще модуляция активности сигнальных белков осуществляется с помощью их убиквитинирования (см. Приложение 3).

Для эффективного прохождения сигнала от клеточной мембраны к ядру необходимо, чтобы различные эффекторные белки сигнальной трансдукции, поочередно активирующие друг друга фосфорилированием (так называемый «киназный каскад»), были сближены в пространстве и времени. Такую работу выполняют различные вспомогательные (адапторные) белки, которые содержат стыковочные сайты (как правило, представляющие собой фосфорилированные остатки аминокислот в окружении определенного набора других аминокислот), специфичные для связывания нескольких сигнальных белков.

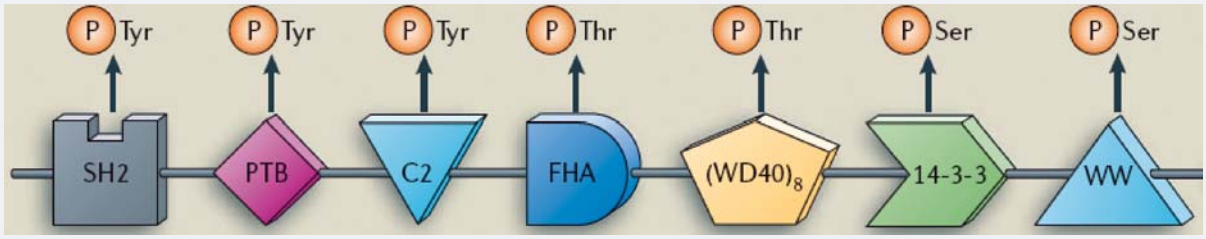


Рис. 3П. *Адаптирован из работы B. Seet, I. Dikic, M. Zhou, T. Pawson [28]*

На рис. 3П показаны некоторые домены белков, распознающие и связывающиеся с фосфорилированными остатками тирозина или серина. Аббревиатуры: SH2 (Src-homology domains 2); PTB (phosphotyrosine-binding domain); C2 (conserved region 2 of protein kinase C); FHA (forkhead-associated); (WD40)8 — домен впервые выявлен в белке, содержащем WD40-повтор (W — триптофан, D — аспартат); 14-3-3 (домен впервые выявлен в белке 14-3-3, чье название просто соответствует его позиции при классификации белков нервной ткани с помощью гель-электрофореза); WW (домен содержит 2 соседних остатка триптофана).

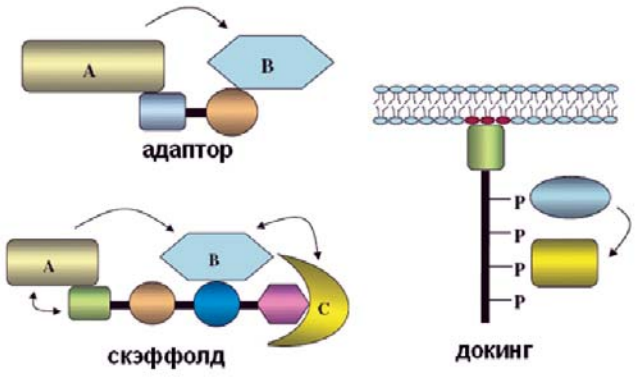


Рис. 4П. *Адаптирован из работы L. Buday, P. Tompa [29]*

Адапторные белки, имеющие модульное строение (содержат несколько различных стыковочных сайтов), условно подразделяют на несколько категорий.

Адапторы — как правило, небольшие белки, имеющие 2 участка связывания для 2 белков-эффекторов (на рисунке стрелкой указаны взаимодействия таких белков — A и B, связанных с адаптором). «Платформы» или «скэффолд» (scaffolds) белки — крупные молекулы, имеющие несколько доменов для взаимодействия, способные связывать и регулировать несколько белков сигнального пути. Стыковочные или докинг (docking) белки имеют аналогичные структурные и функциональные особенности, что и у скэффолд белков, но их отличительной чертой является способность локализоваться на мембране (поэтому эти белки иногда называют «якорями») рядом с активированным рецептором.

дующей лекции). По биологической функции эти рецепторы можно условно (учитывая процессы интеграции сигналов) подразделить на 2 группы: рецепторы, индуцирующие сигналы выживания и пролиферации клеток (1–4) и рецепторы, индуцирующие клеточную дифференцировку (5–7). В соответствии с этим, геномные аберрации, влияющие на те или иные сигнальные пути, можно, с той же оговоркой, отнести к мутациям класса I (рецепторы типа 1–4) и класса II (рецепторы типа 5–7). Мутации или хромосомные транслокации в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей рецепторов типа 1–4, относятся к самому обширному классу рекуррентных генетических аберраций при лейкозах. Мутации в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей рецепторов типа 5–7, встречаются в основном на терминальных стадиях развития опухоли. Хотя здесь есть одно исключение: мутации и хромосомные транслокации, затрагивающие гены, кодирующие Notch рецепторы, очень часто встречаются при острых Т-клеточных лейкозах [6]. Рецепторы типа 1–4 подробнее будут рассмотрены в последующих главах.

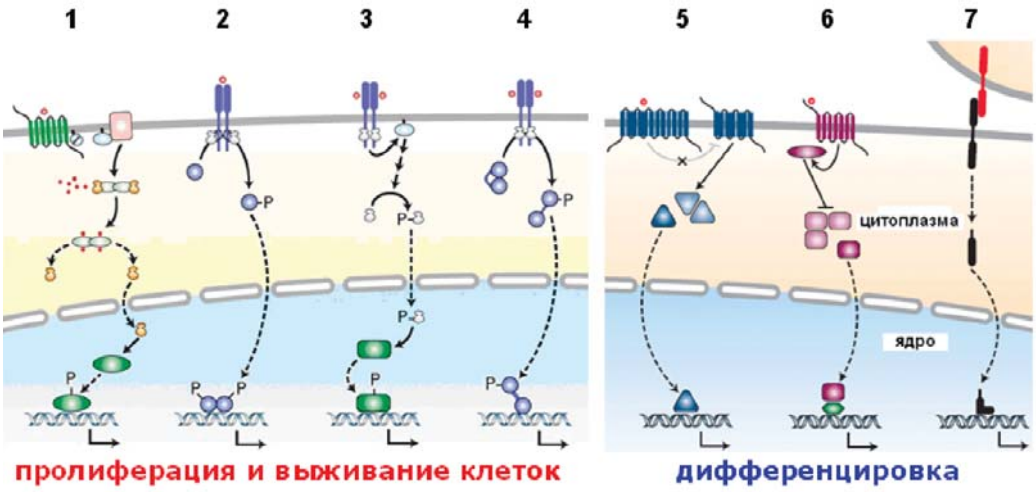


Рис. 1. *Семь основных типов рецепторов клеточной поверхности*

Представлена схема семи основных типов мембранных рецепторов: 1 — рецепторы, связанные с большими, трехсубъединичными G-белками (см. главу III); 2 — рецепторы цитокинов, связанные с цитоплазматическими JAK (Janus kinase) тирозинкиназами; 3 — тирозинкиназные рецепторы (цитоплазматическая часть рецептора обладает тирозинкиназной активностью); 4 — TGF-β (transforming growth factor β) рецепторы, цитоплазматическая часть рецептора обладает серин-треонин киназной активностью; 5 — Hedgehog (Hh) рецепторы, в стимулированном (связанном с лигандом) состоянии путем протеолиза активируют освобождение факторов транскрипции из ингибирующих белковых комплексов; 6 — WNT рецепторы, в стимулированном состоянии индуцируют освобождение фактора транскрипции (β-катенина) из мультибелкового комплекса (происхождение названий двух последних рецепторов см. в лекции № 1, Приложение 1); 7 — Notch рецепторы (от англ. notch — метка, зарубка; название связано с тем, что рецептор реагирует со своими лигандами, которые также прикреплены к поверхности клеток путем простого физического «сцепления» — один из его лигандов так и называется — Jagged, «зазубрина»); в стимулированном состоянии претерпевают протеолитическое расщепление, в результате которого высвобождаются их цитоплазматические домены, являющиеся факторами транскрипции. По расположению в мембране рецепторы можно разделить на 2 группы: интегральные рецепторы (2, 3, 4 и 7) и змеевидные (serpentine) рецепторы (1, 5 и 6), белковая часть которых несколько раз (обычно 7 раз) пересекает липидный бислой мембраны. P — фосфатные группы. Подробности см. в тексте. Рис. адаптирован из работы H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira et al. [5].

Если рассматривать систему сигнальной трансдукции в общем виде, то выявляется определенная закономерность. На «входе» в систему существует множество лигандов и их рецепторов (известно более 200 видов рецепторов, причем для некоторых из них не выявлены лиганды — такие рецепторы получили название «орфановых», от англ. orphan — сирота). На «выходе» из системы активируется несколько сотен факторов транскрипции, которые имеют своей мишенью около 20 тыс. генов. При этом сегодня известно всего около 30 внутриклеточных сигнальных путей, которые совместно используются рецепторами разных типов. На рис. 2 эта закономерность показана графически на примере семейства тирозинкиназных рецепторов ERBB (avian erythroblastic leukemia viral v-Erb-b oncogene homolog), также известных как рецепторы эпидермального фактора роста — HER (human epidermal growth factor receptor) [7]. Из рисунка видно, что «узким» местом в цепи сигнальной трансдукции является область передачи сигнала от рецептора к факторам транскрипции, так как количество эффекторов здесь ограничено. В то же время, считается, что именно на этом участке сигнализации, называемом одними авторами «основным процессом» (core process) [7], а другими — критическими «узлами» (critical nodes) [8], осуществляется формирование разнообразия клеточных ответов на внеклеточные сигналы. Ограниченное число эффекторных молекул компенсируется большим количеством их комбинаций на адапторных белках (адапторы, скэффолд и докинг белки, см. Приложение 2). То, что именно адапторные белки определяют специфичность сигнальной трансдукции, недавно было продемонстрировано в серии изящных экспериментов на дрожжах. В этих работах с помощью генно-инженерных манипуляций были получены искусственные химерные гены белков-эффекторов, в которых те части молекул, которые отвечают за активацию определенного набора факторов транскрипции (и, соответственно, за определенный клеточный ответ), были соединены со стыковочными доменами белков-эффекторов из других сигнальных сетей. То есть полученные химерные гены кодировали эффекторные белки, у которых каталитическая активность оставалась неизменной, но стыковаться они могли только с «чужими» адапторными белками. Введение таких генов в клетки дрожжей приводило к формированию «неправильных» комплексов на адапторных белках, что вызывало изменение клеточного ответа на анализируемую внешнюю стимуляцию ([9], а также обзоры [10, 11]).

Следует также отметить, что именно в верхней и нижней области «песочных часов» сигнальной трансдукции сосредоточены белки, кодирующие гены которых наиболее часто подвергаются аберрациям при лейкозах. Причем в верхней части схе-

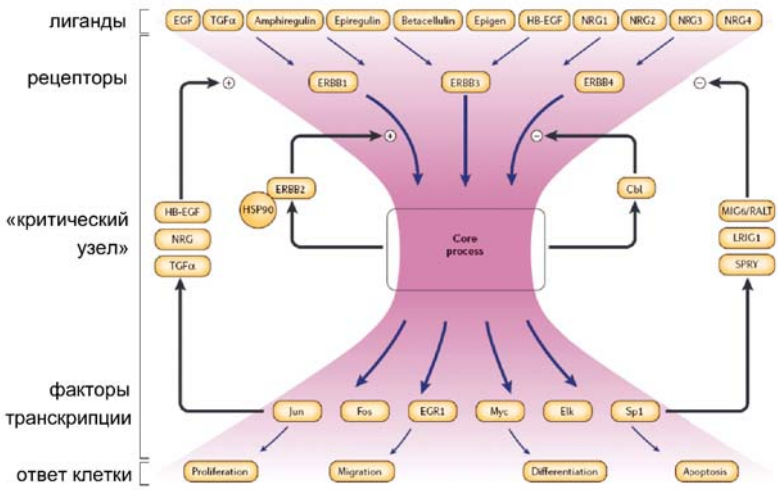


Рис. 2. *Система сигнальной трансдукции ERBB-семейства рецепторов*

Слева отмечены основные участники процесса сигнальной трансдукции. Здесь мы не будем «расшифровывать» компоненты данной системы, чтобы не усложнять общую картину, а отметим только ключевые моменты (см. также текст лекции). Выделенная цветом часть рисунка отражает количественный состав различных «отделов» системы сигнальной трансдукции — от лигандов до факторов транскрипции. По форме это напоминает песочные часы, «узким местом» которых является центральная часть, где передача сигнала контролируется небольшим количеством эффекторных молекул (см. Приложение 2). Именно эта область, названная авторами «основным процессом» (core process), может вносить существенный вклад в определение вида клеточного ответа на сигналы извне (см. текст лекции). Следует также отметить наличие позитивных и негативных (на рис. — слева и справа от «узкого места» соответственно) петель обратной связи, когда нижестоящие компоненты индуцируют или подавляют активность вышестоящих компонентов цепи сигнальной трансдукции. В позитивных петлях нижестоящие эффекторы (протеинкиназы) могут, например, активировать сигнализацию за счет фосфорилирования вышестоящих эффекторов и/или вызывать диверсификацию сигнальных путей путем создания на адапторных белках дополнительных стыковочных сайтов для других эффекторов. В негативных петлях обратной связи одной из мишеней сигнального пути может быть, например, протеинфосфатаза, активация которой приводит к дефосфорилированию (уничтожению) стыковочных сайтов рецепторного комплекса или к инактивации вышестоящих эффекторов. Очень часто эффекторами негативных петель регуляции являются Ub-лигазы, активация которых приводит к деградации рецептора (см. Приложение 3). Рис. адаптирован из работы A. Citri, Y. Yarden [7].

мы, приведенной на рис. 2, находятся белки, мутации генов которых относятся к классу I, а в нижней части — к классу II. Вполне вероятно, что одной из причин такого эффекта может служить большое количество потенциальных опухолеродных мишеней в верхней и нижней частях сети сигнальной трансдукции. В средней части («горлышко» песочных часов) сети сигнальной трансдукции, отвечающая за модулирование и разнообразие ответов и используемая совместно многими типами рецепторов, имеется на 1–2 порядка меньше потенциальных мишеней.

Глава II. Фосфорилирование — важнейший механизм сигнализации

Важнейшими регуляторами путей сигнальной трансдукции являются протеинкиназы, поэтому их активность обычно строго контролируется и регулируется. Почти любое нарушение в системе протеинкиназной сигнализации, происходящее в результате генетических изменений, приводит к нарушению регулировки их активности и инициации злокачественной трансформации клетки [12]. По своей структуре и клеточной локализации протеинкиназы подразделяются на рецепторные и цитоплазматические, а по каталитической активности — на тирозиновые и серин-треониновые (см. Приложение 2).

Рецепторы, ассоциированные с протеинкиназной активностью, подразделяют на 3 основные группы (рис. 1).

Первая группа. Тирозинкиназные рецепторы (RTKs, receptor tyrosine kinases), цитоплазматическая часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Лигандами RTKs обычно являются различные факторы роста.

Вторая группа. Рецепторы цитокинов не обладают собственной киназной активностью, но их цитоплазматический домен содержит стыковочные сайты для связывания с нерецепторными JAK (Janus kinase) тирозинкиназами, которые и производят фосфорилирование эффекторных белков при стимулировании рецептора. Такое название (в честь двуликого бога Януса) JAK киназы получили из-за того, что в отличие от других протеинкиназ они имеют 2 киназных домена (один из них, правда, неактивен). Основной мишенью JAK киназ является семейство цитоплазматических факторов транскрипции STAT (signal transducer and activator of transcription), которые после активации перемещаются в ядро и активируют транскрипцию своих генов-мишеней.

Третья группа. Цитоплазматическая часть рецепторов трансформирующего фактора роста β (TGF-β) обладает серин-треонин киназной активностью. TGF-β рецепторы активируют цитоплазматические

факторы транскрипции SMAD (similar to mothers against decapentaplegic), которые могут, как и STAT, активировать в ядре транскрипцию определенных генов-мишеней или взаимодействовать в цитоплазме с эффекторами других путей сигнальной трансдукции (интеграция сигналов). Такое странное название белки SMAD получили из-за их гомологии с MAD белком дрозофилы, мутации гена которого вызывают репрессию морфогена *DPP* (decapentaplegic), причем это воздействие наблюдается только у самок (результат так называемого «материнского эффекта»). В итоге к имени морфогена была добавлена фраза из названия популярных в США общественных организаций — «матери против...».

Активность протеинкиназ подвергается в клетках строгому контролю и «самоконтролю», и при отсутствии внешнего воздействия они находятся в состоянии автоингибирования [12–14]. На рис. 3 показаны и обсуждены механизмы автоингибирования цитоплазматических и рецепторных протеинкиназ, а также способы их активации. К уже сказанному стоит добавить, что для активации цитоплазматических протеинкиназ большое значение имеет их окружение, т. е. место, где они располагаются. В клетке наибольший «уровень» протеинкиназной активности сосредоточен в областях инициации сигнальной трансдукции, т. е. в участках, соседствующих с мембранными микродоменами, несущими рецепторы (см. Приложение 1). Именно в этих клеточных «отсеках» (цитоплазматических компартментах) концентрируется наибольшее число различных протеинкиназ и адапторных белков (см. Приложение 2), готовых к взаимодействию друг с другом при стимуляции рецепторов. Для того чтобы попасть в эти компартменты и активироваться, многим протеинкиназам необходимо претерпеть модификацию и приобрести «якорь», который направит их к активным мембранным участкам (см. Приложение 1).

Активное состояние рецептора после взаимодействия с лигандом недолговечно. Специфичный липидный состав мембранных микродоменов рецепторов и локально повышенная киназная активность вокруг активированных рецепторов приводят к рекрутированию в эти компартменты различ-

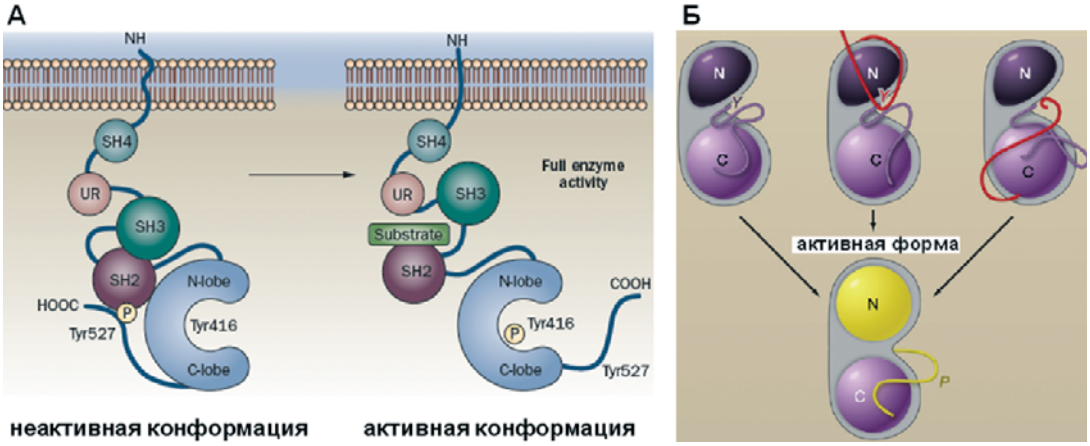


Рис. 3. *Механизм активации протеинкиназ*

На рис. 3А представлен механизм активации цитоплазматической тирозинкиназы SRC. SRC была первой протеинкиназой, у которой была детально изучена структура, поэтому некоторые белковые домены и многие белки, содержащие подобные домены, имеют в своем названии аббревиатуру SH (Src-homology domains). У SRC выделяют 4 функциональных SH домена: SH1 — каталитический домен, состоящий из N- и C-концевых частей (lobe), содержащий в C-части так называемую A-петлю (петлю активации); белковый домен, определяющий каталитическую активность фермента (не показана); SH2 — домен, связывающийся с фосфорилированным тирозином (Tyr); SH3 — домен, связывающийся с богатыми пролином участками других белков; SH4 — домен, содержащий сигналы для модификации SRC остатками жирных кислот (миристилирование, см. Приложение 1). Фосфорилирование C-концевого Tyr527 приводит к связыванию с ним SH2 домена и автоингибированию SRC (компактная, неактивная конформация белка). Дефосфорилирование Tyr527 фосфатазами и связывание SH2 и/или SH3 доменов SRC с белками-субстратами приводит к формированию активной конформации фермента. Фосфорилирование Tyr416 в A-петле приводит к ее смещению и «открыванию» каталитического участка для связывания субстрата.

На рис. 3Б вы можете видеть рецепторные тирозинкиназы (RTKs), которые состоят из нескольких функциональных доменов: внеклеточный домен (ED, extracellular domain), осуществляющий взаимодействие с лигандом; трансмембранный домен (TM, transmembrane), определяющий локализацию рецептора в определенном участке мембраны (см. Приложение 1), и цитоплазматический подмембранный домен (JM, juxtamembrane, эти домены на рис. не показаны). За JM-доменом располагается киназный домен, который, как и у SRC, состоит из N- и C-концевых частей. Автоингибирование RTKs у разных рецепторов осуществляется с помощью различных механизмов. Например, взаимодействие A-петли (фиолетовая полоска) с каталитическим участком препятствует его связыванию с субстратом (левый верхний рис.). Ингибирование может осуществляться JM-доменом (красная полоска), который, взаимодействуя с каталитическим центром и A-петлей, стабилизирует неактивную конформацию RTK. Фосфорилирование определенных Tyr в JM-домене снимает это ингибирующее взаимодействие (центральный верхний рис.). У некоторых RTKs неактивная конформация вызывается, как и у SRC, взаимодействием C-концевого участка белка (красная полоска) с киназным доменом (правый верхний рис.). Активация RTKs при всех типах автоингибирования происходит после связывания ED-доменов с «двухвалентным» лигандом, что приводит к димеризации рецепторов и разрушению неактивной конформации их цитоплазматических доменов. Активация рецептора всегда сопровождается фосфорилированием (P) A-петли (желтая полоска на нижнем рис.) в киназном домене. Рис. адаптирован из работ M. Lemmon, J. Schlessinger и C. Swanson, R. Paniagua, T. Lindstrom, W. Robinson [13, 15].

ных белков, служащих сигналами к эндоцитозу (интернализации рецепторов) [16]. Надо отметить, что даже в эндосомах многие рецепторные комплексы продолжают активно индуцировать пути сигнальной трансдукции, а некоторые рецепторы, например EGFR (epidermal growth factor receptor), даже попадают в ядро [17, 18]. Но в конце концов весь этот сложный белковый комплекс сигнальной трансдукции подвергается деградации в 26S протеасомах (см. Приложение 3).

Глава III. RAS-сигнализация

Рецепторы, связанные с так называемыми G-белками (GPCRs, G protein-coupled receptors), относятся к змеевидным рецепторам, белковая часть которых имеет 7 трансмембранных α-спиралей и 7 раз пересекает мембрану (рис. 1). Цитоплазматический домен рецепторов ассоциирован с «заякоренными» на мембране G-белками (название связано с тем, что эти белки активируются ГТФ (GTP)). С GPCRs связаны так называемые гетеротримерные G-белки, состоящие из 3 субъединиц (α, β и γ). Лигандами GPCRs являются многие гормоны (глюкагон, серотонин, вазопрессин, АКТГ и т. п.) и хемокины. Пути сигнальной трансдукции, индуцированные этими рецепторами, в основном связаны с проводящими путями вторичных посредников, включая цАМФ и IP_3/DAG (см. Приложение 1) [19].

При лейкозах рекуррентные аберрации затрагивают другой класс G-белков — так называемые малые G-белки, к которым относятся белки RAS-семейства [20]. Эти небольшие белки (20–35 КДа), состоящие из одной субъединицы, имеют на удивление очень много функций в клетке и взаимодействуют с большим количеством других белков, хотя, как видно на примере адапторных белков — чем больше взаимодействий, тем сложнее должна быть структура. G-белки находятся в активном состоянии, когда они связаны с ГТФ, в этом состоянии они принимают активную конформацию, позволяющую им взаимодействовать и активировать другие белки (в частности, белки-эффекторы сигнальной трансдукции). Так как G-белки, в особенности онкобелки RAS, обладают огромным онкогенным потенциалом, то природа позаботилась о строгом контроле их активности. Во-первых, как и протеинкиназы, они обладают мощным «самоконтролем», который заключается в том, что они являются ГТФазами, т. е. могут сами гидролизовать ГТФ до ГДФ и переходить в неактивное состояние. Кроме этого, существует большое число ферментов, которые регулируют активность G-белков. Активация G-белков зависит от действия белков GEFs (guanine nucleotide-exchange factors), которые катализируют ГДФ → ГТФ реакцию, а дезактивация — от действия белков GAPs (GTPase activating proteins), ак-

Приложение 3. *Убиквитинирование как один из важнейших способов регулировки [30–32]*

Посттрансляционная модификация аминокислотных остатков (фосфорилирование, метилирование, прениляция и т. п.) является основным способом изменения физико-химических свойств белков, определяющим их активность и функцию. В последние годы стало ясно, что важную роль в регулировке активности белков играет их убиквитинирование, т. е. ковалентное связывание с небольшим регуляторным белком убиквитином (Ub, ubiquitin), состоящим всего из 76 аминокислот. Первоначально Ub считался своеобразной «меткой», с помощью которой отбраковывались ненужные или патогенные (например, с дефектной третичной структурой) белки. Помеченные Ub белки транспортируются к 26S протеасомам, где подвергаются деградации до олигопептидов (журналисты придумали для Ub романтическое название — «поцелуй смерти»).

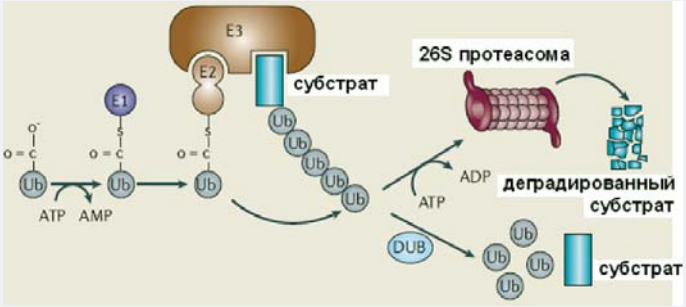


Рис. 5П. *Адаптирован из работы D. Hoeller, C.-M. Hecker, I. Dikic [31].*

АТФ-зависимый комплекс убиквитинирования состоит из нескольких белков: Ub-активирующего фермента (E1), Ub-конъюгирующего фермента (E2) и Ub-лигазы (E3), которая катализирует присоединение Ub к субстрату (белку-мишени) с последующей достройкой поли-Ub цепочки. Ub-лигаза является ключевым ферментом комплекса убиквитинирования. По структуре каталитического домена Ub-лигазы подразделяются на 2 типа: ферменты, содержащие RING- (really interesting new gene) или HECT- (homologous to E6-associated protein C-terminus) домены. Причем, если HECT-лигазы являются мономерными белками, то RING-лигазы функционируют в составе сложных мультибелковых комплексов. Процесс убиквитинирования обратим, его можно остановить с помощью ферментов, разрушающих поли-Ub цепочки (DUB, de-ubiquitylating enzyme). Убиквитинирование является важным регуляторным механизмом, с помощью которого можно быстро остановить какой-либо процесс, разрушив белки, принимающие в нем участие. Деградация белков в 26S протеасоме имеет и другое значение — образующиеся при этом пептиды используются клетками иммунной системы в реакциях презентации антигена.

Сигналом для деградации белка служат именно поли-Ub цепочки, однако частичное убиквитинирование, т. е. введение в белок-мишень одной или двух молекул Ub, является важным регуляторным механизмом. Это связано с тем, что единичные молекулы Ub могут служить сигналом для связывания белка-мишени с другими регуляторными белками. В зависимости от контекста (так же как и при фосфорилировании или метилировании белков) Ub-связанный белок может при этом активироваться или, наоборот, ингибироваться. В последнее время выявлен еще целый ряд Ub-подобных белков, например, SUMO (ubiquitin-related modifier), которые принимают участие в регулировке многих клеточных процессов.

тивирующих ГТФазную активность G-белков, т. е. ускоряющих их переход в неактивную конформацию. Степень активности RAS белков зависит от баланса между активностями *GEFs* и *GAPs*. Так как *GEFs* и *GAPs* модулируют активность потенциальных онкобелков (*RAS*), то с точки зрения онкологии *GEFs* можно отнести к онкогенам, а *GAP* — к генам-супрессорам опухоли. Совместная локализация *RAS*, *GEFs*, *GAPs* и эффекторных белков является ключевым условием для RAS-зависимой сигнальной трансдукции. Большое значение для ее реализации имеют посттрансляционные модификации RAS (см. Приложение 1).

Онкогенные мутации в *RAS*-генах наблюдаются в ~ 30 % опухолей человека. Удивительным является уникальная «стандартизация» этих мутаций: во всех мутантных RAS-белках, обнаруженных и в ретровирусах, в которых онкогены *RAS* были впервые идентифицированы (см. лекцию № 1, Приложение 1), и при крупномасштабном молекулярном скрининге больных — выявляется один и тот же комплект активирующих мутаций, которые затрагивают 12, 13 и 61-й кодоны онкогена. Такие мутации приводят к конститутивной (постоянной) активации RAS-белка и онкогенезу [21].

Заключение

Описанные выше процессы проиллюстрированы на рис. 4 на примере сигнализации от рецептора инсулин-подобного фактора роста (IGF1R). Показаны основные компоненты RAS-RAF-MAPK-сигнального пути, главного пути активации клеточной пролиферации, и PI3K-AKT-mTOR-сигнального пути, активирующего выживаемость клеток. RAS-RAF-MAPK-сигнальный путь сопряжен с последовательной активацией ряда MAP киназ (MAPK, mitogen-activated protein kinase), получившей название «киназный каскад», который заканчивается фосфорилированием серин-треонин киназ ERK (extracellular signaling regulated kinase). Активация ERK приводит к изменению конформации белка и «открытию» на его поверхности сигнальной последовательности аминокислот — NLS (nuclear localization signal), которую узнают транс-

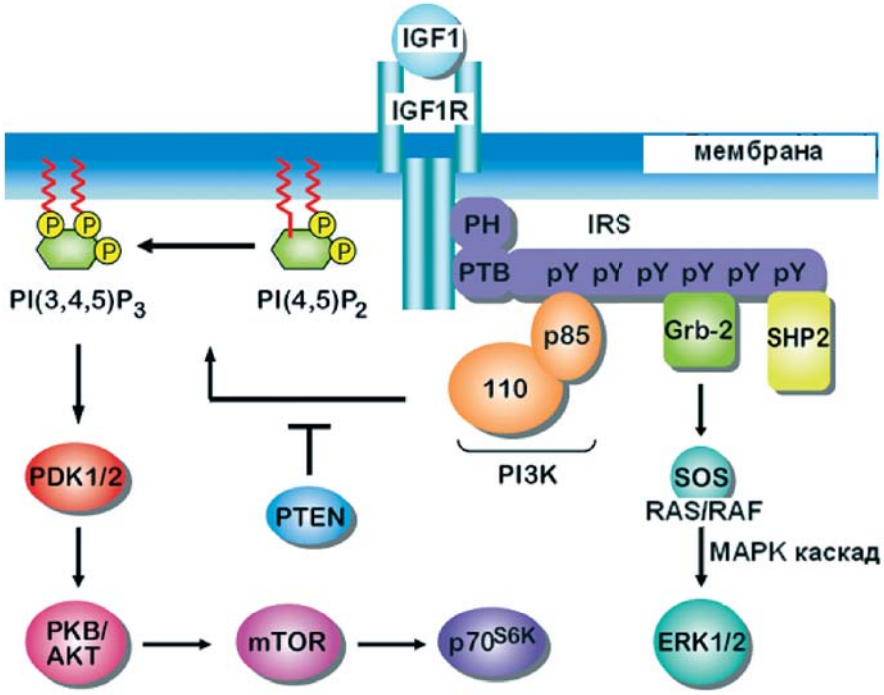


Рис. 4. *Сигнализация инсулин-подобного фактора роста IGF1 (insulin-like growth factor 1) через его рецептор IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor)*

Особенностью инициации этого типа сигнальной трансдукции является ассоциация рецептора с крупным докинг белком IRS (insulin receptor substrate), который рекрутируется к активированному рецептору с помощью PH- (связь с мембраной) и PTB- (связь с рецептором) доменов на его N-конце (см. Приложение 2). После связывания рецептор активирует (фосфорилирует) остатки тирозина (Y) на C-конце IRS, что приводит к созданию набора стыковочных сайтов (pY) для рекрутирования нижестоящих сигнальных эффекторов. Одним из таких эффекторов является киназа PI3K, состоящая из каталитической (p110) и регуляторной (p85) субъединиц. Активация PI3K приводит к инициации PI3K-AKT-mTOR-пути сигнальной трансдукции (см. Приложение 1 и текст лекции). С IRS также связываются GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) и SHP2 (SH2 domain-containing phosphatase), причем фосфатаза SHP2 активирует адапторный белок GRB2. Дальнейшее взаимодействие GRB2 с G-белком RAS и факторами обмена нуклеотидов (GEFs), такими как SOS (son of sevenless), приводит к активации RAS (см. главу III). RAS инициирует рекрутирование к мембране и активацию серин-треонин киназы RAF (v-raf murine leukemia viral oncogene homolog), которая, в свою очередь, активирует MAP-киназный каскад (RAS-RAF-MAPK-путь сигнальной трансдукции). Рис. адаптирован из работы K. Mardilovich, S. Pankratz, L. Shaw [22].

портные белки и перемещают ERK в ядро. В ядре молекулы ERK активируют определенные наборы факторов транскрипции.

Стимулирование клеточной выживаемости (т. е. снижение чувствительности к сигналам запрограммированной гибели клеток) при активации PI3K-AKT-mTOR-пути реализуется с помощью 2 основных механизмов. Во-первых, в результате фосфорилирования и инактивации ключевого проапоптотического белка BAD (BCL2 antagonist of cell death), а во-вторых, с помощью активации сигнальных комплексов серин-треонин киназы mTOR (mammalian target of rapamycin), один из которых (mTORC1) ингибирует процессы аутофагии клеток [23].

Следующая лекция будет посвящена рекуррентным генетическим аберрациям, характерным для гематологических опухолей миелоидного происхождения.

Литература

1. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкемогенеза (цикл лекций). М.: Династия, 2007.
2. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия 2000;65:5–33.
3. Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров, 2002 (есть несколько электронных версий этого обзора, см., например: http://longevity-library.narod.ru/1/1.1/1.1.21.htm).
4. Scott J., Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. Science 2009;326:1220–4.
5. Lodish H., Berk A., Matsudaira P. et al. Molecular cell biology. UK, Freeman & Co, 5 ed., 2004.
6. Ferrando A. The role of Notch1 signaling in T-ALL. Hematology 2009:353–61.
7. Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:505–16.
8. Taniguchi C., Emanuelli B., Kahn R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:85–96.
9. Peisajovich S., Garbarino J., Wie P., Lim W. Rapid diversification of cell signaling phenotypes by modular domain recombination. Science 2010;328:368–72.
10. Pryciak P. Designing new cellular signaling pathways. Chem Biol 2009;16:249–54.
11. Lim W. Designing customized cell signalling circuits. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:293–403.
12. Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001;411:355–65.
13. Lemmon M., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2010;141:1117–34.
14. Hubbard S. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:464–71.
15. Swanson C., Paniagua R., Lindstrom T., Robinson W. Tyrosine kinases as targets for the treatment of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatology 2009;5:317–24.
16. Le Roy C., Wrana J. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:112–26.
17. Sorkin A., von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:609–22.
18. Wang Y-N., Yamaguchi H., Hsu J-M., Hung M-C. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. Oncogene 2010;29:3997–4006.
19. Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. J Cell Physiol 2007;213:589–602.
20. Hancock J. Ras proteins: different signals from different locations. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:373–85.
21. Schubbert S., Shannon K., Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:295–308.
22. Mardilovich K., Pankratz S., Shaw L. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. Cell Comm Signaling 2009;7:14–28.
23. Bhaskar P., Hay N. The two TORCs and Akt. Develop Cell 2007;12:487–502.
24. Simons K., Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1:31–9.
25. Wymann M., Schneiter R. Lipid signalling in disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9:162–76.
26. Groves J., Kuriyan J. Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. Nat Structur Mol Biol 2010;17:659–65.
27. Kurosaki T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. Nat Rev Immunol 2002;2:354–63.
28. Seet B., Dikic I., Zhou M., Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:473–83 (см. также постер этих авторов — http://www.nature.com/nrm/posters/modifications/nrm0706-poster-web.pdf).
29. Buday L., Tompa P. Functional classification of scaffold proteins and related molecules. FEBS J 2010;277:4348–55.
30. Welchman R., Gordon C., Mayer J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:599–609.
31. Hoeller D., Hecker C-M., Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer 2006;6:776–88.
32. Chen Z., Sun L. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. Mol Cell 2009;33:275–86.

Спрайсел одобрен в России для взрослых пациентов с впервые выявленным хроническим миелоидным лейкозом

Первая с 2001 г. новая одобренная терапия в России с эффективностью, превосходящей иматиниб, Спрайсел предоставляет врачам дополнительные возможности для терапии пациентов с впервые выявленным хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) в хронической фазе [i] с удобной дозировкой 1 раз в день без ограничений относительно приема пищи.

- ***Решение Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации о внесении изменений в инструкцию по медицинскому применению препарата Спрайсел. Препарат Спрайсел одобрен для терапии взрослых пациентов с впервые выявленным ХМЛ в хронической фазе (ХМЛ в ХФ) с положительной филадельфийской хромосомой.***
- ***В основном исследовании DASISION Спрайсел продемонстрировал эффективность, превосходящую эффективность иматиниба, с более быстрым достижением более высоких уровней молекулярного и подтвержденного цитогенетического ответов [ii] к 12 месяцам.***

Москва, Россия, 10 февраля 2011

Сегодня компания Bristol-Myers Squibb объявила о получении решения Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации о внесении изменений в инструкцию по медицинскому применению препарата Спрайсел. Препарат Спрайсел (дазатиниб) 100 мг 1 раз в сутки одобрен для терапии взрослых пациентов с впервые выявленным ХМЛ с положительной филадельфийской (Ph+) хромосомой в ХФ. Спрайсел является первой с 2001 г. новой одобренной терапией с эффективностью, превосходящей эффективность иматиниба для данного показания. Разрешение получено на основании результатов открытого исследования III фазы DASISION (Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naïve CP-CML Patients — Дазатиниб в сравнении с иматинибом для терапии ранее нелеченных пациентов в ХФ ХМЛ), результаты которого были представлены на 46-м Ежегодном Конгрессе Американского общества клинической онкологии в формате абстракта, содержащего самую последнюю новейшую информацию, в рамках секции *Best Abstracts (Лучшие рефераты)* Президентского симпозиума на 15-м Конгрессе Европейской гематологической ассоциации и опубликованы в *The New England Journal of Medicine* в июне 2010[1]. Исследование продолжается, и потребуются дополнительные данные для определения долгосрочных результатов терапии.

Спрайсел также зарегистрирован для терапии пациентов с впервые диагностированным ХМЛ в ХФ в 27 странах Европы. «Регистрационное удостоверение Европейской комиссии является важной вехой для пациентов с ХМЛ и их лечащих врачей в Европе, у которых теперь в арсенале имеется возможность, продемонстрировавшая ответ, превосходящий иматиниб, и предлагающая однократную удобную дозировку без ограничений относительно приема пищи», — говорит Elliott Sigal, исполнительный вице-президент, директор по науке и президент научно-исследовательского отдела. «Данные исследования DASISION убедительно показали, что пациенты с впервые выявленным ХМЛ в ХФ с положительной филадельфийской хромосомой, получавшие дазатиниб, гораздо быстрее достигли более высоких уровней молекулярного и подтвержденного полного цитогенетического ответа к 12 месяцам по сравнению с пациентами, получавшими иматиниб», — комментирует Главный исследователь исследования DASISION профессор Michele Baccarani, университет Болоньи, Италия. «Профиль ХМЛ, одного из четырех наиболее распространенных типов лейкозов, значительно изменился за последние годы с появлением таргетных препаратов; распространенность заболевания растет, поскольку пациенты живут дольше. Европейское Регистрационное Свидетельство и результаты исследования DASISION подтверждают роль дазатиниба как альтернативы 1-й линии терапии ХМЛ с положительной филадельфийской хромосомой».

Дазатиниб продемонстрировал уровни ответов, превосходящие уровни ответов при использовании иматиниба [1]

В исследовании DASISION дазатиниб продемонстрировал эффективность, превосходящую эффективность иматиниба, с более высокими уровнями и более быстрым достижением молекулярного и подтвержденного цитогенетического ответов к 12 месяцам терапии у пациентов с впервые выявленным ХМЛ в ХФ. Семьдесят семь процентов [95% ДИ: 71–82] пациентов в группе дазатиниба по сравнению с 66% [95% ДИ: 60–72] пациентов в группе иматиниба достигли первичного конечного результата — подтвержденного ПЦО (две последовательные оценки ПЦО с интервалом как минимум 28 дней) к 12 месяцам ($p = 0.007$). Медиана времени достижения подтвержденного ПЦО составила 3,1 месяца у 199 пациентов, ответивших на терапию в группе дазатиниба, и 5,6 месяца — у 177 пациентов, ответивших на терапию в группе иматиниба. Медиана времени до достижения большого молекулярного ответа (БМО) [iii] составила 6,3 месяца у 135 ответивших на терапию в группе дазатиниба и 9,2 месяца — у 88 ответивших на терапию в группе иматиниба. Уровень БМО в любой момент времени был выше у пациентов группы дазатиниба (52% [95% ДИ: 45–58]) по сравнению с группой иматиниба (34% [95% ДИ: 28–40]), $p < 0.0001$ [iv]. Трансформация в фазу акселерации или бластного криза наблюдалась у 5 пациентов группы дазатиниба и 9 пациентов группы иматиниба.

Наиболее частые нежелательные явления всех степеней при использовании дазатиниба и иматиниба включали соответственно поверхностные отеки (9% и 36%), плевральные выпоты (10% и 0%), тошноту (8 % и 20 %), сыпь (11% и 17%) и мышечное воспаление (4% и 17%).

Об исследовании DASISION

Исследование DASISION (Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naïve CP-CML Patients — Дазатиниб по сравнению с иматинибом для терапии ранее нелеченных пациентов в ХФ ХМЛ) является открытым, рандомизированным международным исследованием III фазы — применение дазатиниба по 100 мг 1 раз в сутки по сравнению с иматинибом по 400 мг 1 раз в сутки для терапии пациентов с впервые выявленным Ph+ ХМЛ в ХФ. В исследование были включены 519 пациентов: 259 пациентов были рандомизированы в группу, получавшую дазатиниб, и 260 пациентов — в группу, получавшую иматиниб. Первичной конечной точкой исследования служил уровень подтвержденного ПЦО после 12 месяцев лечения. Вторичные конечные точки включали время до подтверждения ПЦО, наличие БМО и время до его достижения.

О Спрайселе [v]

Дазатиниб, пероральный ингибитор BCR-ABL, был впервые одобрен Европейской комиссией в ноябре 2006 г. для терапии взрослых пациентов во всех фазах ХМЛ (хронической, акселерации, миелоидного или лимфоидного бластного криза) с резистентностью или непереносимостью предшествующей терапии, включая иматиниб. Также дазатиниб одобрен для терапии взрослых пациентов с острым лимфобластным лейкозом с положительной филадельфийской хромосомой (Ph+ ОЛЛ) при резистентности или непереносимости предшествующей терапии.

Действующим веществом препарата Спрайсел является дазатиниб. В наномолярных концентрациях дазатиниб редуцирует активность одного или более белков, ответственных за неконтролируемый рост лейкемических клеток у пациентов с ХМЛ или Ph+ ОЛЛ.

О хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ)

ХМЛ является медленно развивающимся видом лейкоза, при котором организм продуцирует неконтролируемое число лейкоцитов всех уровней созревания. ХМЛ наиболее распространен в возрастной группе пациентов 60–65 лет, однако встречается и среди людей 35–50 лет, частота заболевания — 1–2 случая на 100 000[2]. ХМЛ возникает в результате реципрокной транслокации (взаимного обмена частями) 9-й и 22-й хромосом. В результате этого обмена 22-я хромосома имеет укороченное длинное плечо. По названию города, в котором она была открыта, такая хромосома с укороченным длинным плечом получила название филадельфийской. В результате произошедшей транслокации на хромосоме 22 появляется химерный ген *BCR-ABL*, образующийся при слиянии части гена *ABL* с 9-й хромосомы с оставшейся на 22-й хромосоме частью гена *BCR*. Химерный ген *BCR-ABL* кодирует образование белка BCR-ABL, в котором ABL-тирозинкиназа постоянно активирована в связи с отменой ее физиологической супрессии, осуществляемой в норме оставшейся на 9-й хромосоме частью гена *ABL*. Такая постоянная повышенная активность BCR-ABL-тирозинкиназы приводит к активации сигнальных путей, отвечающих за пролиферацию клеток миелоидного ряда и увеличенную продукцию лейкоцитов всех стадий созревания. Показана роль радиации в частоте возникновения ХМЛ, однако в каждом конкретном случае причина его развития остается неизвестной.

О компаниях Bristol-Myers Squibb и Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Bristol-Myers Squibb и Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. являются партнерами по продвижению *Спрайсел* на рынках Соединенных Штатов Америки и Японии. *Спрайсел* был открыт и разработан компанией Bristol-Myers Squibb.

Bristol-Myers Squibb — глобальная фармацевтическая компания, миссия которой заключается в открытии, разработке и поставке инновационных медицинских препаратов, чтобы помочь пациентам одержать победу над серьезными заболеваниями. По всему миру наши инновационные препараты помогают миллионам пациентов в борьбе с такими заболеваниями, как рак, заболевания сердца, ВИЧ/СПИД, психические расстройства, ревматоидный артрит, хронический вирусный гепатит В и диабет.

Основанная в 1964 г. компания Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. является глобальной компанией, работающей в области здравоохранения с корпоративной философией: сотрудники Otsuka создают новые продукты для улучшения здоровья людей во всем мире. Otsuka исследует, разрабатывает, производит и выводит на рынок инновационные и оригинальные продукты, в частности фармацевтические продукты, для терапии заболеваний и потребительские товары для ежедневного сохранения и поддержания здоровья.

Источник:
информационный выпуск
Bristol-Myers Squibb, 8 декабря 2010.

Ссылки

[i] Впервые выявленный хронический миелоидный лейкоз в хронической фазе с положительной филадельфийской хромосомой.
[ii] Полный цитогенетический ответ (ПЦО) определяется как отсутствие метафаз с положительной филадельфийской хромосомой при цитогенетической оценке клеток костного мозга.
[iii] Большой молекулярный ответ (БМО) определяется как уровень транскрипта BCR-ABL ≤0,1% (снижение на 3 log) при оценке образцов периферической крови методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RQ-PCR).
[iv] Скорректировано с учетом шкалы Хасфорд. Приведенная статистическая значимость (достоверность) на ранее заданном номинальном уровне значимости.
[v] Для получения полной информации по препарату СПРАЙСЕЛ (дазатиниб) обращайтесь к Инструкции по медицинскому применению препарата Спрайсел.
[1] Kantarjian H. et al. N Engl J Med 2010 Jun 17;362(24):2260–70.
[2] Baccarani M., Dreyling M. Annals of Oncology 2010;21:165–7.

Если пациент в хронической фазе хронического миелолейкоза **РЕЗИСТЕНТЕН** к иматинибу или **НЕ ПЕРЕНОСИТ** иматиниб...

ПЕРЕВЕДИТЕ ПАЦИЕНТА
НА СПРАЙСЕЛ В ДОЗЕ 100 МГ
ОДИН РАЗ В СУТКИ

НЕУДАЧА НА ИМАТИНИБЕ*

ЭФФЕКТИВНО
НАДЕЖНО
ПРОСТО

Спрайсел показан для лечения взрослых пациентов с хроническим миелолейкозом в хронической фазе, фазе акселерации или фазе миелоидного или лимфоидного бластного криза при резистентности или непереносимости предыдущей терапии, включая иматиниб

Спрайсел также показан для лечения взрослых пациентов с острым лимфобластным лейкозом с положительной Филадельфийской хромосомой при резистентности или непереносимости предыдущей терапии

(1) Спрайсел. Инструкция по медицинскому применению препарата. Росздранадзор.
(*) в соответствии с рекомендациями ELN 2009

Bristol-Myers Squibb

СПРАЙСЕЛ
Дазатиниб

ТЕРАПИЯ ВЫСОКИХ ДОСТИЖЕНИЙ

Показания. *Неходжкинская лимфома* Рецидивирующая или химиоустойчивая В-клеточная, CD20-положительная неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности или фолликулярная. Фолликулярная лимфома III-IV стадии в комбинации с химиотерапией у ранее нелеченных пациентов. Фолликулярная лимфома в качестве поддерживающей терапии после ответа на индукционную терапию. CD20-положительная диффузная В-крупноклеточная неходжкинская лимфома в комбинации с химиотерапией по схеме CHOP. *Хронический лимфолейкоз* в комбинации с химиотерапией у пациентов, ранее не получавших стандартную терапию. Рецидивирующий или химиоустойчивый хронический лимфолейкоз в комбинации с химиотерапией. *Ревматоидный артрит* (активная форма) у взрослых в комбинации с метотрексатом при непереносимости или неадекватном ответе на текущие режимы терапии, включающие один или более ингибиторов фактора некроза опухолей (ФНО-а). Безопасность и эффективность препарата у детей не установлены. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к ритуксимабу, любому компоненту препарата или к белкам мыши, острые инфекционные заболевания, выраженный первичный или вторичный иммунодефицит. **Правила приготовления и хранения раствора.** Необходимое количество препарата набирают в асептических условиях и разводят до расчетной концентрации (1-4 мг/мл) в инфузионном флаконе (пакете) с 0.9% раствором натрия хлорида для инфузий или 5% раствором декстрозы (растворы должны быть стерильными и апирогенными). Приготовленный инфузионный раствор Мабтеры физически и химически стабилен в течение 12 ч при комнатной температуре или в течение не более 24 ч при температуре от 2 до 8 °С. Мабтеру вводят внутривенно, инфузионно (медленно), через отдельный катетер. Нельзя вводить в/в болюсно или в виде в/в инъекций. **Дополнительная информация в инструкции по применению.**

МабТера
Ритуксимаб
В ЦЕНТРЕ УСПЕХА

ЗАО «Рош-Москва»
Официальный дистрибьютор
«Ф. Хоффманн - Ля Рош Лтд.» (Швейцария)
Россия, 107031 Москва
Трубная площадь, дом 2
Бизнес-центр «Неглинная Плаза»
Тел.: + 7 (495) 229-29-99
Факс: + 7 (495) 229-79-99
www.roche.ru

Roche